

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES MICROBIANAS EN AGUAS CONTAMINADAS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN LA BAHÍA DE CARIRUBANA, PENÍNSULA DE PARAGUANÁ

Licda. Laura Rovero. MSc.

lrovers@gmail.com

Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda

Dr. Francisco Yegres

Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda

yegresf@hotmail.com

Recibido: 04 de junio de 2016

Aprobado: 26 de agosto de 2016

RESUMEN

Mediante una investigación explicativa experimental, se muestrearon 3 zonas en el sector Punta Cardón de Carirubana con la Norma COVENIN 2614-94. Se realizó la caracterización química (pH, DBO, salinidad, OD, aceites minerales, fosfatos, nitratos, ST, e HPAs) y microbiológica mediante la Norma COVENIN 1126-89. Los resultados reportan contaminación de HPAs y aceites minerales con valores de 1,4 mg/L y 1,3 mg/L respectivamente. Otros valores fuera de la Norma son: OD 4,5 mg/L en estación 1, fosfato con 40,1 mg/L en estación 2, sólidos totales 63,28 mg/L en estación 3. El pH, DBO, salinidad, oxígeno disuelto, y nitratos se encuentran por debajo de Normativa venezolana. La caracterización microbiológica reportó presencia de *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp* y *Rizhopus sp*, en Estación 1, identificadas mediante características morfológicas (hifas, conidios, células conidiogenas y conidióforos) y claves taxonómicas. Se comprobó que los microorganismos presentes son capaces de sobrevivir en altas concentraciones de Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

Palabras claves: *Aspergillus niger*, antraceno, inmovilización, soporte polimérico, aguas de mar.

IDENTIFICATION OF MICROBIAL SPECIES IN AREAS CONTAMINATED WITH PETROLEUM HYDROCARBONS IN THE BAY OF CARIRUBANA, PARAGUANA PENINSULA WATERS.

SUMMARY

Through an experimental explanatory research, 3 areas were sampled in Punta Cardon de Carirubana sector with the COVENIN 2614-94. microbiological chemical characterization (pH, BOD, salinity, OD, mineral oils, phosphates, nitrates, ST, and PAHs) and was performed by the COVENIN 1126-1189. The results reported contamination of PAHs and mineral oils with values of 1.4 mg / L and 1.3mg / L respectively. Other values outside the standard are: OD 4.5 mg / L in Season 1, phosphate 40.1 mg / L in Season 2, total solids 63.28 mg / L in Station 3. The pH, BOD, salinity, dissolved oxygen and nitrates are below Venezuelan regulations. The microbiological characteristics reported presence of *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp and sp *Rizhopus* in Station 1, identified by morphological characteristics (hyphae, conidia and conidiophores Conidiogenous cells) and taxonomic keys. It was found that microorganisms are able to survive in high concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons.

Keywords: *Aspergillus niger*, anthracene, immobilization, polymeric support, seawater.

INTRODUCCIÓN

El impacto ambiental de los HPAs genera daños a la ecología marina por muerte de organismos por asfixia, envenenamiento, sea por absorción, o por contacto, destrucción de los organismos jóvenes o recién nacidos, disminución de la resistencia e infecciones de las especies y en particular de las aves por absorción de cantidades sub-letales de hidrocarburos de petróleo al igual que la incorporación de carcinógenos en la cadena alimentaria, que generan efectos negativos sobre la reproducción y propagación a la fauna y flora marina.

La problemática de contaminación por HPAs surge cuando las cantidades de hidrocarburos en los suelos, aguas superficiales y/o subterráneas es mayor a la capacidad de degradación de los microorganismos presentes en el medio, responsables de oxidar y mineralizar los HPAs a sustancias inocuas. Las

fracciones de HPAs que no sean degradadas se adherirán a las partículas en el suelo o sedimentos donde pueden permanecer por largo tiempo dando origen a un suelo o agua contaminada por hidrocarburos, en el cual se encuentran presentes hidrocarburos que por sus cantidades y características afecten la naturaleza del medio. (Castro, G. 2007)

Es común encontrar pasivos ambientales debido a las actividades petroleras inadecuadas que han permitido la infiltración de HPAs en el subsuelo, así como a fugas por accidentes o manejo inapropiado en las actividades de refinación, petroquímica, transporte, almacenamiento y comercialización (Malave, 2012). Por consecuencia esta investigación se plantea en un problema manifestado por los pescadores del sector Punta Cardón donde informan accidentes menores que poco a poco han contribuido a la contaminación de dichas playas, muchos de estos a causa de la presencia de "lastre", cuyos responsables son los buques y tanqueros cuando efectúan operaciones de entrega y/o recibo de productos refinados del crudo, así como, también por fugas en los equipos de la refinería que usan agua salada de reflujo para el enfriamiento de sus equipos, y del mismo modo, las actividades pesqueras de embarcaciones menores con motor fuera de borda.

A pesar que no se ha reportado oficialmente contaminación de aguas por altas concentraciones de hidrocarburos, la situación actual es que las Comunidades y el Consejo Comunal del sector La Puntica, han manifestado su preocupación por la inminente contaminación visible de sus playas que han afectado igualmente a la población y la pesca de la zona, alterando la flora, fauna y por consecuencia, daños irreparables si no se toman medidas a tiempo.

Es por ello que esta investigación plantea la identificación de especies microbianas presentes en aguas contaminadas con hidrocarburos del petróleo con el objeto de verificar su capacidad de subsistir bajo altas concentraciones de HPAs y fomentar el uso de las mismas en procesos de biorremediación.

OBJETIVO GENERAL:

1) Identificar las especies microbianas en aguas contaminadas con hidrocarburos del petróleo en la bahía de Carirubana, Península de Paraguaná.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 1) Caracterizar química y microbiológicamente el agua de mar de la bahía de Punta Cardón, Península de Paraguaná.
- 2) Aislar la especie microbiana con mayor presencia en aguas contaminadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

pH: La técnica a utilizar para la medición es la potencio métrica, se empleó un pH metro portátil modelo PHS -3D con electrodo de membrana de vidrio y uno de calomel como referencia.

Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO): EL método utilizado para la determinación de la DBO consistió en el confinamiento de la muestra de agua en la oscuridad a 20°C por un período de 5 a 20 días determinando la cantidad de oxígeno disuelto consumido por los microorganismos en el agua, se introduce un agitador magnético en su interior, y se tapa la boca de la botella con una tapa de goma en el que se introduce hidróxido de sodio. Se cierra la botella con un sensor [piezoeléctrico](#), y se introduce en una estufa refrigerada a 20 °C. Este proceso provoca una disminución interior de la presión atmosférica, que será medida con el sensor piezoeléctrico. El cálculo se basó en la fórmula:

$$DBO = F (T_0 - T_5) - (F - 1)(D_0 - D_5) \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

D_0 = Contenido de oxígeno (mg/L) del agua de dilución al principio del ensayo.

D_5 = Contenido medio de oxígeno (mg/L) del agua de dilución al cabo de 5 días de incubación.

T_0 = Contenido de oxígeno (mg/L) de una de las diluciones de la muestra al principio del ensayo.

T_5 = Contenido de oxígeno (mg/L) de una de las diluciones de la muestra al cabo de 5 días de incubación.

F = Factor de dilución.

Salinidad: Se determinó la concentración de iones cloruros por el Método de Mohr (%clorinidad) titulando el agua con una solución de nitrato de plata utilizando cromato de potasio como indicador, luego se determinó el % de salinidad mediante la fórmula:

$$\text{Salinidad (\%)} = 0,03 + (1,805 \times \% \text{Clorinidad}) \quad (\text{Ecuación 2})$$

Oxígeno disuelto (OD): Se aplicó el método de Winkler para la determinación del oxígeno disuelto que consistió en el tratamiento de la muestra con un exceso de manganeso (II), yoduro de potasio e hidróxido de sodio. El hidróxido de manganeso (II) blanco producido reacciona rápidamente con el oxígeno para formar hidróxido de manganeso (III) marrón. Posteriormente se acidifica la muestra, produciéndose la oxidación del yoduro a yodo, reduciéndose el manganeso (III) a manganeso (II). Finalmente, se valora el yodo, equivalente al oxígeno disuelto, con disolución patrón 0,01 N de tiosulfato sódico. Los cálculos se determinaron por la ecuación:

$$\text{OD (mg/L)} = \frac{VS_2O_3^{\cdot-} \cdot \text{mol/L } S_2O_3^{\cdot-} \cdot 1 \text{ mol } I_2 \cdot 1 \text{ mol } MnO_2 \cdot \text{mol } O_2 \cdot 32gO_2 \cdot 1000mg}{1 \text{ mol } S_2O_3^{\cdot-} \cdot 1 \text{ mol } I_2 \cdot 2 \text{ mol } MnO_2 \cdot 1 \text{ mol } O_2 \cdot 1 \text{ gramo}} \cdot \text{Volumen de la muestra(litros)} \quad (\text{Ecuación 3})$$

Determinación de aceites y minerales. Se aplicó el método de extracción de soxhlet 5520 D, se midieron 40 mL de agua de mar y se colocaron en equipo de extracción Soxhlet, se midieron 180 mL de n-Hexano en unos matraz previamente

secados y pesados, se realizó la extracción continua por 6 horas; luego se rotoevaporaron hasta minimizar la cantidad de solvente, posteriormente se dejaron secar los aceites y grasas en las muestras, y por gravimetría se calcularon los miligramos de aceites y grasas.

$$\text{Aceites y minerales (mg/L)} = \frac{(P_2 - P_1) \cdot 10^6}{V_1} \quad (\text{Ecuación 4})$$

Donde:

P₁: Peso del matraz (libre de humedad) antes de la extracción

P₂: Peso el matraz después de la extracción y el secado

V₁: Volumen de la muestra filtrada

10⁶: Factor de conversión

Fosfatos (PO₄³⁻): Se tomaron 50 mL de la muestra del agua así como de un blanco y de las soluciones estándar preparadas y se le agrega a cada solución una o dos gotas de fenolftaleína. Si la solución adquirió un color rosa significa que la solución es alcalina, por lo que deberá agregarse gota a gota ácido sulfúrico 1 N hasta desaparición del color rosa. A los 50 mL de solución se agregaron 8 mL de reactivo combinado (50 mL de H₂SO₄ 5N, 5 mL de tartrato, 15 mL de molibdato y 30 mL de solución de ácido Ascórbico) y a los 10 minutos (aproximadamente) se efectuaron las lecturas de absorbancia en: blanco, estándares y soluciones problema a 880 nm de longitud de onda.

Nitratos (NO₃⁻): El método de referencia es la determinación ultravioleta, en medio ácido, a una longitud de onda de 220 nm, que proporciona buenos resultados para aguas relativamente limpias sin altos contenidos en materia orgánica.

Sólidos totales: Se determinó mediante el Método gravimétrico por volatilización, donde se colocó una cápsula de porcelana limpia en una mufla a ignición a 550 °C

por 1 hora. Posteriormente se enfrió en un desecador para posteriormente pesar en una balanza analítica y se guardó en un desecador hasta su utilización. Se transfirió un volumen conocido de la muestra a la cápsula (50 mL) y se evaporó a sequedad en un horno de secado a una temperatura de 98 °C para evitar ebullición y salpicadura, el volumen de muestra utilizado garantiza un residuo mínimo de 25 a 250 mg. Se mantuvo la muestra durante 1 hora a 103-105°C una vez evaporada el agua se enfrió el recipiente en un desecador para ser pesada. Se repitió el ciclo a la misma temperatura hasta obtener un peso constante o hasta que la pérdida de peso sea menor al 4% del peso previo. (Bracho, 2010)

$$\text{Sólidos Totales (g/L)} = \frac{(A-B) \cdot 1000}{\text{mL (muestra)}} \quad (\text{Ecuación 7})$$

Donde:

A = peso de la cápsula + muestra (g)

B = peso de la cápsula (g)

Concentración de HPAs: Para la determinación de la concentración del hidrocarburo usado se empleó el método 418.1 U.S. EPA de extracción líquido-líquido modificado, mediante un solvente orgánico en una relación de 1:1 y agitación en mezclador Super-Mixer VM-300 durante 5 minutos para garantizar contacto íntimo entre las fases inmiscibles y aumentar el paso de la mayor cantidad de analito (antraceno) desde el seno de la fase acuosa hasta la fase orgánica. Luego se centrifugó en el equipo 708-T a 12000 rpm durante 20 minutos para lograr una buena separación de las fases. Finalmente se recuperó la fase orgánica para la medición de la absorbancia del agente contaminante a 356 nm en el espectrofotómetro Espectronic 20-D y mediante la curva de calibración obtener la concentración del mismo a diferentes tiempos (González V., 2012)

Análisis Microbiológicos: Se prepararon medios de cultivos bajo la norma COVENIN 1126-89. Se realizó el aislamiento, identificación macro y microbiológico

de los aislados mediante estudios macro y microscópicos de características morfológicas (hifas, conidios, células conidiogenas y conidióforos), la información fue compilada y comparada con claves taxonómicas descritas en bibliografía especializada.

RESULTADOS Y ANALISIS

Los parámetros químicos evaluados se compararon con el Decreto 883 sobre Normas para la Clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos, según se describe a continuación:

Caracterización química:

a) **pH** : En la Figura 1 se reporta la calidad del agua muestreada en función del pH, donde se observa que los valores se encuentran por debajo del máximo permisible de 8,5 en las 3 estaciones muestreadas, con valores de pH de 7,28 7,31 y 7,39 los cuales son óptimos para la actividad microbiana así como para la activación de la solubilidad, adsorción y absorción de contaminantes e iones.

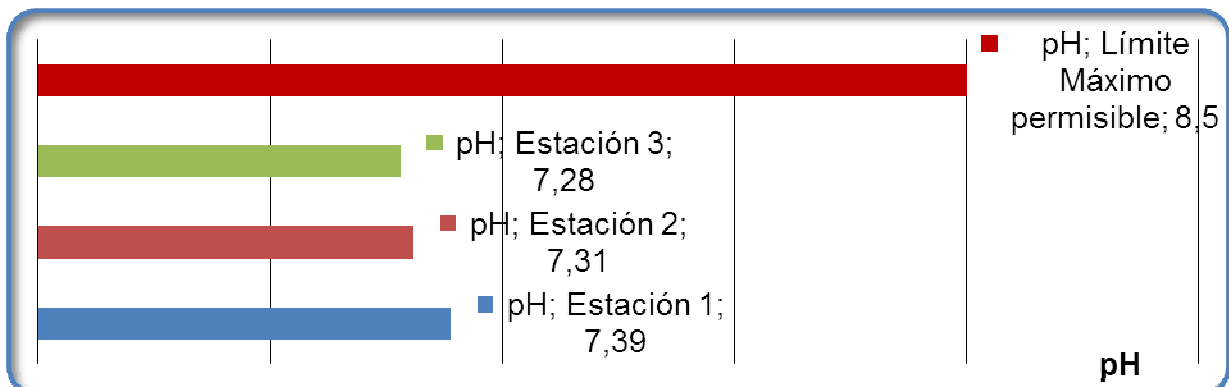


Figura 1. Valores de pH en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón.

Es de considerar que para los sistemas acuáticos se presenta una variabilidad en cuanto al pH, para la mayoría de los organismos autóctonos de estas aguas es casi la neutralidad, algo por encima de 7. El intervalo adecuado para hongos es de 6,5 a 8,5 fuera del cual se pueden desnaturalizar proteínas. Ferraro y col., (2006),

obtuvo que el *Aspergillus niger* muestra la capacidad de procesar sus enzimas a este intervalo neutro de pH.

b) DBO : La Demanda Bioquímica de Oxígeno (DBO) es una medida del contenido de sustancias biodegradables en aguas, las cuales son descompuestas por microorganismos en presencia de oxígeno. Los valores reportados de DBO (Figura 2) durante pruebas de 5 a 20 días fueron de 19, 21,5 y 24 mg/L, observando en la Estación 1 el mayor valor. Esta zona corresponde al área rural de la Bahía de Punta Cardón donde existen descargas de efluentes domésticos, con viviendas cercanas a los 10 metros de la costa, incidiendo en el aumento de la DBO en esta zona muestreada en comparación a la Estación 2 y Estación 3.

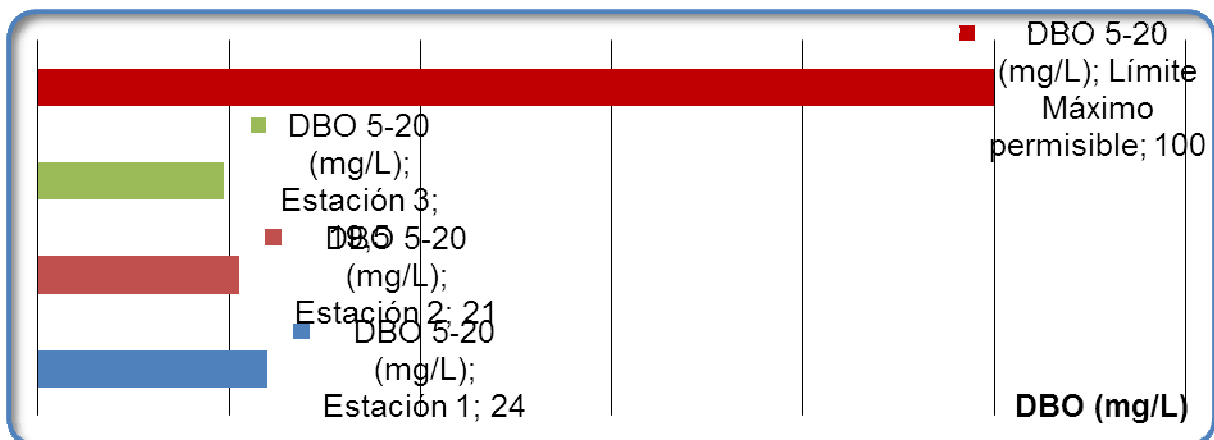


Figura 2. Concentración de DBO en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón.

A pesar que todos los valores reportados se mantuvieron por debajo del valor máximo permisible de 100 mg/L, es de acotar que la proliferación de la actividad microbiana en la zona es capaz de disminuir la materia orgánica presente. Como se refiere Lara y Cáceres (2011) donde aislaron de la zona oeste de Paraguaná microorganismos como *Aspergillus niger*, *Rhizopus ssp* y *Aspergillus flavus*, de igual manera González (2013) aisló de la Bahía de Punta Cardón géneros de *Aspergillus* y *Trichoderma* en sedimentos de la zona.

c) Salinidad : Los valores de salinidad del agua en estudio fueron 3,69 3,7 y 3,71 % m/v en las 3 zonas muestreadas (Figura 3). Aunque las normas venezolanas no fijan un valor en cuanto a este parámetro es de mencionar que concentraciones de salinidad elevada provoca alteraciones en las membranas de las células de los microorganismos y desnaturalización de las enzimas durante el proceso o en su defecto, provocar la desecación osmótica de las células ocasionando su muerte (Barrios, 2011). No obstante, se han obtenido diversos microorganismos capaces de vivir y mantener las tasas de biodegradación en condiciones de salinidad elevadas (González, 2012).

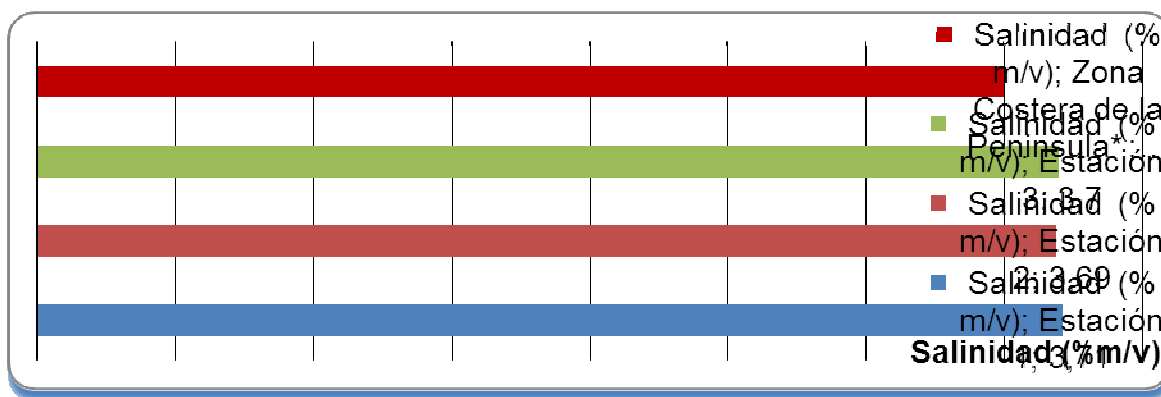


Figura 3. Comportamiento de Salinidad en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón. (*Porcentaje de salinidad del Mar caribe)

d) Oxígeno Disuelto (OD): La concentración de oxígeno disuelto (Figura 4) se encuentra por debajo del límite establecido por la norma ambiental venezolana, que permite valores de OD mayores a 5,0 mg/L. Estos resultados indican la presencia de contaminación con materia orgánica, mala calidad del agua e incapacidad para mantener determinadas formas de vida, según reporta Guadalupe (2012).

Este comportamiento se atribuye a la descarga de los efluentes provenientes de la refinería Punta Cardón, específicamente en la Estación 3 ubicada cerca del muelle de los buques petroleros y de los derrames de derivados del petróleo e hidrocarburos como gasolina, fuel oil y kerosen usados por las embarcaciones que

realizan sus actividades en la zona, entre otros factores, causando la desaparición de organismos y especies sensibles en los medios acuáticos de la zona explorada.

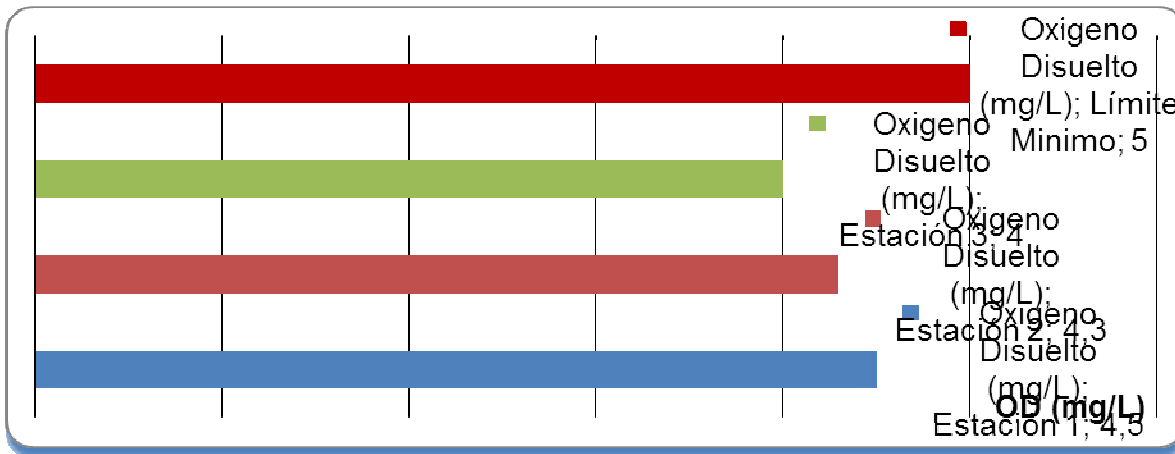


Figura 4. Concentración de oxígeno disuelto en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón.

e) Aceites Minerales : Según se muestra en la Figura 5 se observó que existe una concentración elevada con mayor impacto en la primera estación con un valor de 1,3 mg/L de aceites minerales, al comparar este parámetro con lo establecido en la Norma venezolana (Decreto 883) el límite máximo permisible es igual a 0,3 mg/L. Este resultado se debe a la cercanía con la zona de descarga de los efluentes del Centro refinador Cardón. Además de la pernocta de embarcaciones pesqueras en la orilla, como también de las que navegan dentro del perímetro de la bahía, que al derramar hidrocarburos son transportados desde varios puntos por el oleaje natural hacia las aguas menos profundas cercanas a la primera estación de muestreo, adicionalmente en este sentido tiene incidencia las actividades de los buques y tanqueros cuando efectúan operaciones de entrega y/o recibo de productos refinados del crudo. (Lara y Cáceres 2012)

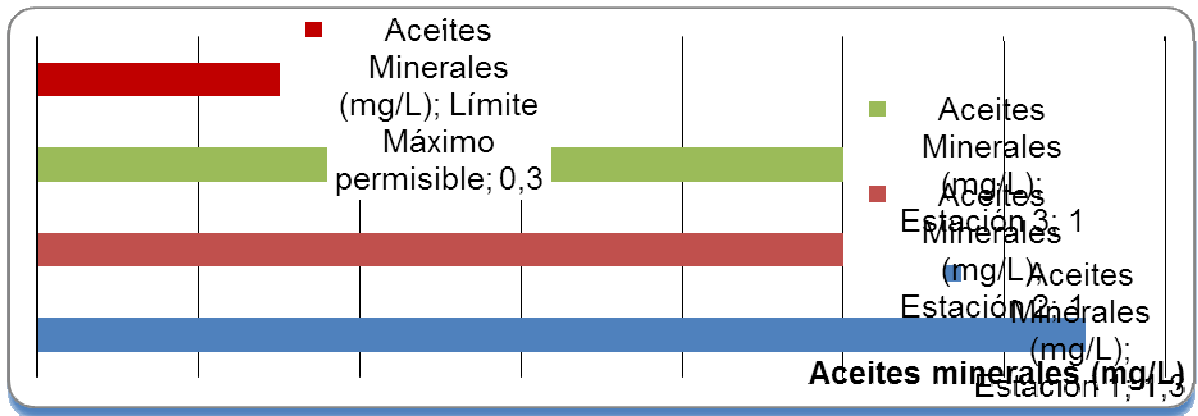


Figura 5. Concentración de Aceites Minerales en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón

Los resultados obtenidos demuestran la necesidad de promover la actuación inmediata de los entes encargados de administrar y preservar los recursos marítimos y costas venezolanas y activar seguidamente evaluaciones de control y prevención a las embarcaciones industriales y/o artesanales que circunda la Bahía de Punta Cardón y sus adyacencias.

f) Fosfatos: La concentración de fosfatos no se reporta en la Legislación venezolana como parámetro para los cuerpos de agua pero la misma se comparó con lo establecido en la Norma Mexicana sobre la calidad ambiental y de descarga de efluentes, la cual establece como límite máximo para los compuestos organofosforados totales un valor de 0,010 mg/L. Sin embargo los resultados obtenidos fueron de 39,6 mg/L, 40,1 mg/L y 39,8 mg/L para las Estaciones 1, 2 y 3 respectivamente, reportando un alto grado de contaminación de este parámetro en la zona estudio.

La carga de fosfato total se compone de ortofosfato, polifosfato y compuestos de fosforados orgánicos, siendo normalmente la proporción de ortofosfato la más elevada. El fosfato favorece el crecimiento de algas y promueve la eutrofización de las aguas y suele ser un factor limitante para el crecimiento de los vegetales. Tan sólo un gramo de fosfato-fósforo (PO_4^{-3} - P) provoca el crecimiento de hasta 100

gramos de algas. Si este crecimiento es excesivo, cuando las algas mueren, los procesos de descomposición pueden dar como resultado una alta demanda de oxígeno, agotando el oxígeno presente en el agua. (Disponible en http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Agua/Documentacion/Parametros/ParametrosNutrientes.htm)

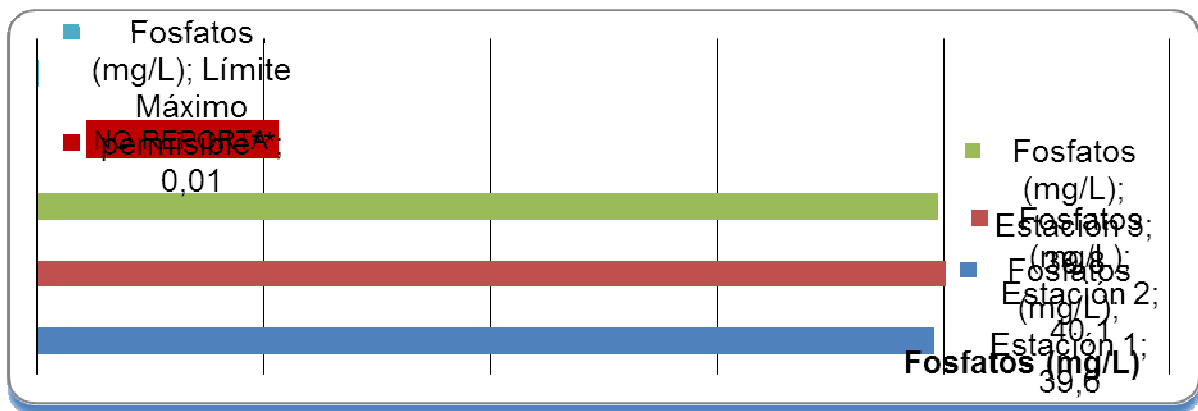


Figura 6. Concentración de fosfatos en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón. (* Norma venezolana, ** Norma Mexicana)

Por tanto se considera que altas concentraciones de fosfatos para los procesos de biorremediación disminuirán la concentración de oxígeno requerido para que microorganismos aerobios metabolicen los contaminantes presentes en la zona. Este parámetro adicionalmente es consecuencia de excreciones humanas y animales; detergentes y productos de limpieza lo que se genera debido a las descargas de los efluentes domésticos circundantes en las 3 estaciones de muestreo evaluadas.

g) **Nitratos** : En la Figura 7 se reportan las concentraciones de nitratos cuyos valores oscilan entre 0,03 y 0,04 mg/L para las tres estaciones de muestreos, a pesar que la Norma venezolana no reporta este parámetro, se comparó con lo establecido en la Norma mexicana la cual establece como límite máximo una concentración de 0,2 mg/L. Estos valores relativamente muy bajos son

consecuencia de una nitrificación del nitrógeno orgánico o proceden de la disolución de los terrenos atravesados por el agua, como contaminantes provienen de contaminación orgánica o de la contaminación por abonos químicos.

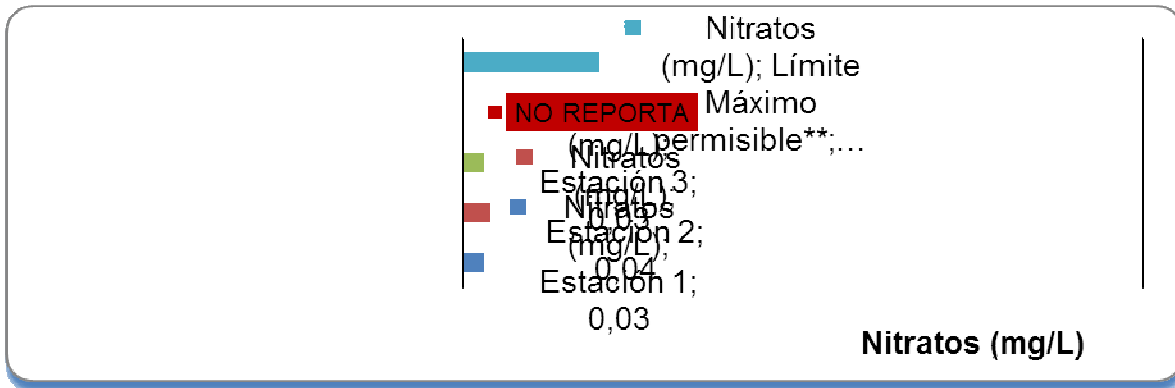


Figura 7. Concentración de Nitratos en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón. (* Norma venezolana, ** Norma Mexicana)

Esto se explica porque cuando hay un vertido de petróleo en ambientes que presentan una baja concentración de nutrientes inorgánicos, se suelen producir elevados cocientes de C:N y/o C:P, los cuales son desfavorables para el crecimiento microbiano. La disponibilidad de N y P limita la degradación microbiana de hidrocarburos. La Environmental Protection Agency (EPA) recomienda utilizar proporciones C:N de 100:10 a 1000:1 para la biodegradación de aguas y suelos contaminados por hidrocarburos.

h) Sólidos Totales: Según se observa en la figura 8 la concentración de sólidos totales en las aguas de la bahía presentó el valor más alto (63,28 g/L) en la Estación 3, cercana al muelle de la Refinería Cardón donde se ubican las embarcaciones petroleras. La norma venezolana especifica que este parámetro debe estar ausente para las aguas muestreadas, por lo que los resultados obtenidos demuestran un grado de contaminación considerable, debido a la presencia de contaminantes químicos, es decir, de la composición química y concentración en sales.

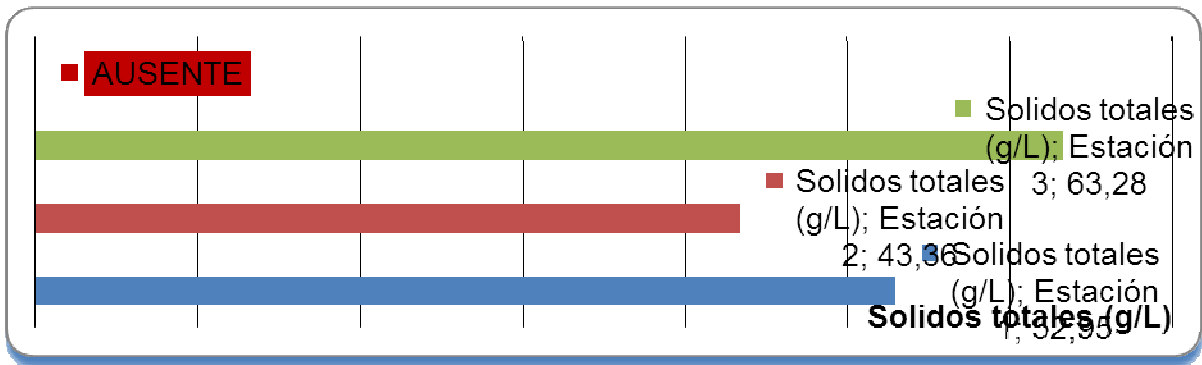


Figura 8. Concentración de Sólidos totales en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardón.

i) **HPAs** : La Ley venezolana no reporta la concentración de HPAs, por tanto fue necesario comparar con Legislaciones internacionales como la Ley ecuatoriana donde establece un límite máximo permisible de HPAs igual a 0,0003 mg/L, siendo un valor muy pequeño debido al peligro que estos compuestos de origen natural o antropogénico representan y de los cuales 16 han sido considerados por la EPA como tóxicos y cancerígenos tales como el antraceno, fluoranteno y pireno. Según Terán (2008) en Venezuela solo la tercera parte de las industrias contaminantes poseen equipos de tratamiento de desechos, a pesar de los esfuerzos de la Comunidad Internacional como la Unión Europea para financiar el saneamiento y preservación del medio ambiente.

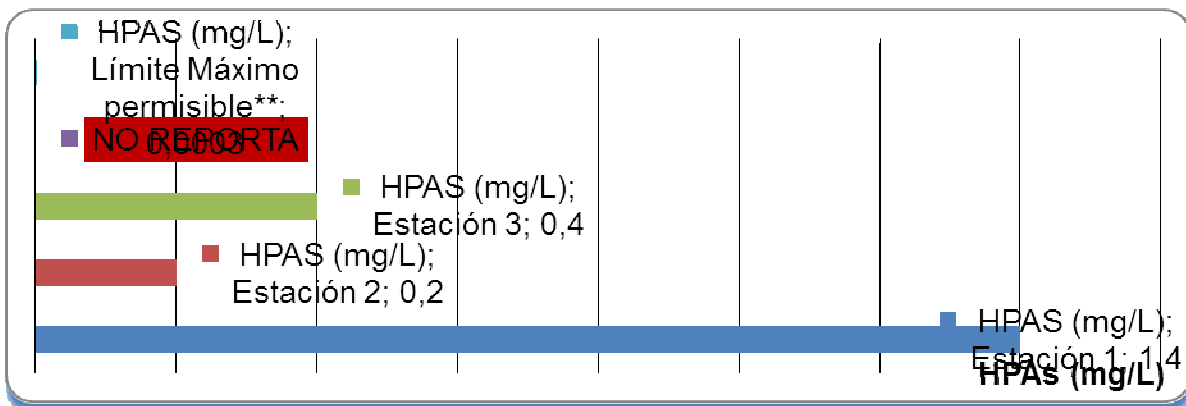


Figura 9. Concentración de Hidrocarburos poli cíclicos aromáticos en las estaciones de muestreo de la Bahía de Punta Cardon. (* Norma venezolana, ** Norma ecuatoriana)

Esta concentración de 0,4 mg/L en la Estación 3 se debe a las operaciones de buques mediante las operaciones de achiques, así como también por fugas en los equipos de perforación marina, y actividades pesqueras de embarcaciones menores con motor fuera de borda, y la vertiente hacia el mar de las aguas utilizadas para el enfriamiento de algunos equipos de la Refinería son las posibles causas de contaminación por HPAs en la Costa de la Bahía de Paraguaná. Éstos se consideran compuestos orgánicos persistentes (COPs), por lo que pueden permanecer en el medio ambiente por largos periodos de tiempo sin alterar sus propiedades tóxicas (Bello y Cuenca, 2008).

La estación 1 reportó máximo valor (1,4 mg/L), representando la más vulnerable de las tres zonas estudiadas debido su ubicación cercana a tierra firme por lo que recibe todos los contaminantes expulsados por las embarcaciones así como los de la refinería aledaña, debido a la dirección de las corrientes y el oleaje natural cuyo sentido es hacia las zonas llanas de la bahía.

Caracterización microbiológica:

a) Aislamiento de las especies microbiológicas presentes en la Bahía de Punta Cardón.

Se logró el aislamiento de los diferentes microorganismos autóctonos del agua de mar de la Estación 1 (debido a que reportó mayor concentración de HPAs entre las 3 estaciones muestreadas) en medio Sabouraud sólido, obteniendo los aislados que se muestran en la Figura 10:

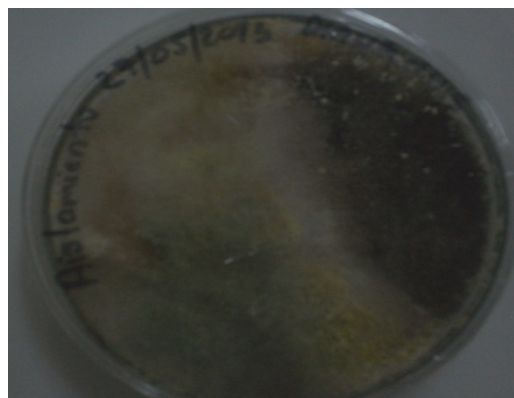
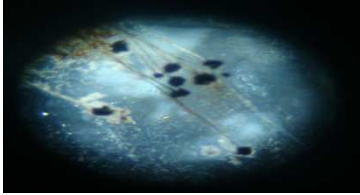
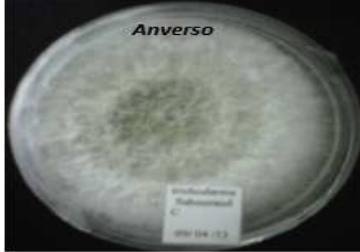
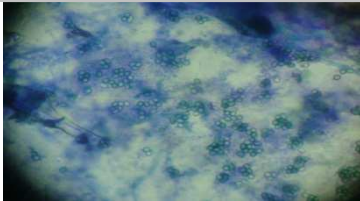

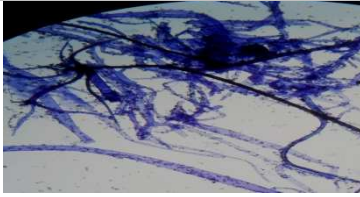


Figura 10. Colonias de especies aisladas en agua de mar de la Bahía de Punta Cardón en medio Sabouraud sólido.

Las colonias aisladas indican crecimiento de diferentes géneros, siendo visible la presencia de un grupo de color negro oscuro, así como, la proliferación de color amarillo verdoso y blanco. La identificación de las especies fúngicas se realizó mediante estudios macro y microscópicos de características morfológicas (hifas, conidios, células conidiogénicas y conidióforos), la información fue comparada con claves taxonómicas, reportando los resultados en la Tabla 1:

Tabla 1. Características macroscópicas y microscópicas de cepas aisladas en medio Sabouraud sólido de las aguas de la Bahía de Punta Cardón.

Características macroscópicas		Género: <i>Aspergillus</i> Especie: <i>niger</i> Forma y elevación: Filamentoso polvoriento y elevado de forma radial.
--------------------------------------	--	---

Características microscópicas		Pigmentación: Al inicio blanco y luego pardo.
Características macroscópicas		Género: <i>Trichoderma</i> Especie: <i>sp</i> Forma y elevación: Filamentoso y elevado. Pigmentación: Al inicio blanco y luego amarillo verdoso
Características microscópicas		Género: <i>Rizhopus</i> Especie: <i>sp</i> Forma y elevación: Rizoide y aspecto consistente micelio elevado
Características macroscópicas		Pigmentación: Al inicio blanco y luego gris oscuro
Características microscópicas		

Lente 400X

Se observó macroscópicamente el crecimiento de *Aspergillus niger* de color negro oscuro en mayor proporción que el resto de microorganismos presentes, aproximadamente 50% (Área = 392,7 cm) del área total de la placa de 785,4 cm. En las características microscópicas se observaron las hifas del hongo, la formación de conidios que dan lugar a un conjunto de conidioforos ramificados irregularmente en forma verticilada. Se observaron las cabezas conidiales globosas y radiales, columnas irregulares de cadenas de conidias globosas,

verrugosas y con estrías longitudinales notables, pigmentación negra y verdosa. También se observó conidióforos ligeramente granulares de paredes gruesas. Todas estas características mencionadas corroboraron que el microorganismo estudiado es de género *Aspergillus* y especie *niger* según Gutiérrez (2011).

El *Trichoderma sp* mostró una coloración inicial blanca y luego amarillo verdosa con conidióforos ramificados en forma piramidal, los filiales se encuentran en ramificaciones en forma de botella, conidios sub globosos en azul de lactofenol, correspondiendo a la clasificación de Gutiérrez (2011), abarcando aproximadamente un 25% del área total de la placa de petri lo que representa un área de 196,35 cm aproximadamente.

El tercer hongo aislado presentó un color blanco que se tornó gris oscuro con hifas septadas, en la base de esporangioforos se forman los rizoides, los esporangios son redondos, oscuros y con muchas esporas ovales de color café claro, y según la clasificación de Gutiérrez (2011) corresponde al *Rizhopus sp*.

En esta investigación se consideró la utilización del hongo *Aspergillus niger* aislado de la Estación 1 (Código LVDU-LIADSA2013) para el mecanismo de inmovilización y degradación de antraceno en función de los resultados previos obtenidos por González (2012) donde dicho hongo reportó mayor degradación de HPAs en sedimentos marinos costeros en comparación a otros aislados como el *Trichoderma sp* y *Phialophora sp*, estos resultados igualmente se corresponden en los obtenidos por Urbina y Villavicencio (2013) donde el *Aspergillus niger* reportó mayor degradación de HPAs en comparación al *Trichoderma sp*.

CONCLUSIONES

- De acuerdo a la caracterización química realizada a las aguas marinas de la Bahía de Punta Cardón, se clasifican del tipo 4A según lo establecido por las Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de agua y vertidos o efluentes líquidos.

- Existe un alto grado de contaminación de hidrocarburos del petróleo en zonas cercanas a la Refinería Cardón y balnearios, según las concentraciones de HPAs y aceites minerales reportados durante la caracterización.
- Los parámetros de oxígeno disuelto, fosfatos y sólidos totales se encuentran fuera de lo establecido en el Decreto 883, evidenciando contaminación de aguas con posibles consecuencias en la desaparición de especies sensibles, proliferación de algas y contaminación por agentes químicos.
- Se comprobó la presencia de microorganismos como el *Aspergillus niger* en mayor proporción, seguido del *Trichoderma sp* y *Rizhopus sp* en las aguas contaminadas, lo que indica que los mismos son capaces de sobrevivir bajos condiciones de altas concentraciones de Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

BIBLIOGRAFIA

- Alvarado, M. (2010). *Remoción de hidrocarburos en efluentes de una planta de tratamiento de aguas petrolizadas*. Trabajo de Grado presentado ante la Universidad del Zulia para optar al Grado Académico de Magister en Ingeniería Ambiental. Disponible en: http://tesis.luz.edu.ve/tde_arquivos/80/TDE-2012-04-24T08:54:34Z-2828/Publico/ortega_alvarado_monica_andreina.pdf
- Antequera, A. (2010). *Biodegradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos totales presentes en aguas de la Bahía de Amuay, utilizando el hongo Aspergillus flavus como agente de biorremediación*. Tesis para optar al título de Ingeniero Químico en la Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Punto Fijo Estado Falcón, Venezuela.
- Arias, F. (2006). *El proyecto de investigación*. Editorial epistemes, 5ta edición. ISBN: 980-07-8529-9. Caracas, Venezuela.
- Barrios, Y. (2011). *Biorremediación: una herramienta para el saneamiento de ecosistemas marinos contaminados con petróleo*. [Científico]. *Biología Aplicada*, 28, 60-68.
- Bello, J. y Cuenca L. (2008). *Evaluación del potencial biodegradador de la microflora fúngica asociada a derrames de hidrocarburos en las aguas de la bahía de Amuay*. Tesis para optar al título de Ingeniero Químico en la

Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Punto Fijo Estado Falcón, Venezuela.

- Bracho, A. (2010). *Biodegradación de altas concentraciones de benzo(a)pireno como única fuente de carbono y energía por Aspergillus terreus en cultivo sólido*. (Biotecnología), Universidad Autónoma Metropolitana, México. Disponible en: <http://148.206.53.231/UAMI14138.PDF>
- Cáceres, J., y Lara, H. (2011). *Determinación de la capacidad biodegradadora de hidrocarburos aromáticos policíclicos de los hongos*. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Punto fijo Estado Falcón Venezuela. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos93/determinacion-capacidad-biodegradadora/determinacion-capacidad-biodegradadora3.shtml>
- Decreto n° 883, (1995) *Normas para la clasificación y el control de la calidad de los cuerpos de aguas y vertidos o efluentes líquidos*. Gaceta oficial de la república de Venezuela, Caracas (Venezuela), 18 de diciembre de 1995, 5021 extraordinaria, sección III, pp. 89-90.
- Ferraro, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón, A., & Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). *Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos*. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 48(2), 179-187.
- González, P. (2013). *Agua en Navarra, parámetros que miden la calidad del agua*. Disponible en: http://www.navarra.es/home_es/Temas/Medio+Ambiente/Agua/Documentacion/Parametros/ParametrosNutrientes.htm.
- González C. Virginia R. (2012). *Propuesta para la Biorremediación de los Sedimentos Marinos impactados por Hidrocarburos Aromáticos POLICÍCLICOS Totales (HAPs) presentes en la Bahía de Carirubana de la Península de Paraguaná*. Tutor académico Ing. Rovero Laura, para optar al título de Ingeniero Químico en la Universidad Nacional experimental Francisco de Miranda, Punto Fijo Estado Falcón, Venezuela.
- Guadalupe, B. L. M. (2012). *Eliminación biológica de nutrientes en un reactor biológico secuencial.-Caracterización y estimulación de las fuentes de carbono del agua residual urbana*. Tesis UPC. Barcelona. Recuperada en Junio de 2009 de <http://www.tdx.cat/TDX-0725105-161032>.
- Gutiérrez, R. (2011). *Hongos contaminantes comunes*. Disponible en: <http://www.aranzadi-zientziak.org/fileadmin/docs/Munibe/1995003006CN.pdf>
- Malave, L. (2012). *Científicos recomiendan estudios multidisciplinarios para vigilar la potabilidad del líquido antes de restablecer el suministro en Monagas Científico, El Nacional*. Retrieved from <http://www.el-nacional.com/noticia/24376/15/Sociedades-cientificas-opuestas-a-utilizar-agua-del-Guarapiche.html>
- Norma mexicana sobre la calidad ambiental y de descarga de efluentes. (2002). Disponible en: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/m127ssa14.html>

- Rincón, N. (2012). *Combinación de tratamientos anaerobio-aerobio de aguas de producción provenientes de la industria petrolera venezolana*. Disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/puertorico29/rincon.pdf>
- Terán, L. (2008). *Daños ambientales en Venezuela*. *Monografias.com*, 2. Retrieved from <http://www.monografias.com/trabajos55/medio-ambiente-venezolano/medio-ambiente-venezolano2.shtml>
- Urbina y Villavicencio. (2013). *Evaluación de la capacidad biodegradable del Aspergillus niger para la disminución de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HPAs) en aguas de la bahía de Punta Cardón*. Tutor académico Ing. Rovero Laura, para optar al título de Ingeniero Químico en la Universidad Nacional experimental Francisco de Miranda, Punto Fijo Estado Falcón, Venezuela.
- Villena y Gutiérrez. (2010). *Biopelículas de Aspergillus niger para la producción de celulasas: algunos aspectos estructurales y fisiológicos*. *Rev. Perú. Biología*. 10 (1): 78-87.