

Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón

Medina, Jhonny^{*,a}, García, Franklin^b, Paricaguán, Belén^a

^a*Departamento de Química, Estudios Básicos, Facultad de Ingeniería, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela.*

^b*Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda, Facultad de Ingeniería, Punto Fijo, Venezuela.*

Resumen.-

El objetivo de la investigación fue estudiar la biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón. Para esto se tomaron muestras en un área contaminada por un derrame de crudo y se colocaron en biorreactores con aporte de los nutrientes necesarios para el desarrollo de los microorganismos. En los suelos contaminados se aislaron e identificaron tres especies autóctonas de hongos del género *Aspergillus*, como lo son: *Aspergillus Níger*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Terreus*. La concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) se determinó por gravimetría, y para un tiempo de 30 días de tratamiento ex situ se obtuvo un valor de remoción de un 85 %. Con lo cual se corrobora la capacidad degradadora de estos microorganismos y su potencial para ser usados en procesos de remediación de suelos contaminados con petróleo.

Palabras clave: biodegradación, bioestimulación, petróleo, microorganismos autóctonos

Petroleum biodegradation by indigenous microorganisms in contaminated soils from Amuay bay of Falcón State

Abstract.-

The objective of the research was to conduct the treatment of different samples of contaminated soil from Amuay Bay through bioremediation of hydrocarbon surfactant biostimulation minimal medium. For this sample was taken on a tainted by an oil spill and placed in bioreactors with input of nutrients necessary for the growth of microorganisms area. In contaminated soils were isolated and identified three native species of fungi of the genus *Aspergillus*, such as *Aspergillus Níger*, *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Terreus*. The concentration of total petroleum hydrocarbons (TPH) was determined by gravimetry, and for a period of 30 days of treatment a value ex situ removal of 85 % was obtained. Whereupon the degrading ability of these microorganisms and their potential to be used in engineering processes in remediation of petroleum contaminated soil was corroborated.

Keywords: biodegradation, biostimulation, oil, indigenous microorganisms

Recibido: febrero 2014

Aceptado: abril 2014.

1. Introducción

Los hidrocarburos son uno de los grupos de sustancias potencialmente contaminantes más im-

portantes, por su abundancia, por su distribución espacial en entornos urbanos y por su persistencia en distintos sectores ambientales [1]. Se considera que son los compuestos dominantes del crudo (petróleo) representando entre el 50 y el 98 % en peso del contenido total. Estos son mezclas complejas de diferentes moléculas, que pueden agruparse en distintas fracciones de hidrocarburos. La fracción de hidrocarburos alifáticos y los

^{*}Autor para correspondencia

Correo-e: jhonnymedina@yahoo.com (Medina, Jhonny)

hidrocarburos polares, conformados por asfaltenos altamente condensados y resinas, en donde cada uno difiere significativamente respecto a su susceptibilidad frente a posibles procesos de biodegradación [2, 3]. Para su mineralización, estos compuestos requieren la acción de más de una especie microbiana, debido a que cada microorganismo tiene una capacidad limitada para degradar las diferentes moléculas que los conforman; mientras que, los consorcios microbianos, al estar compuestos por varias cepas de diferentes géneros, poseen la capacidad enzimática necesaria para transformar las diferentes moléculas constitutivas de los hidrocarburos, transformando las moléculas con características de peligrosidad (inflamabilidad, toxicidad, ecotoxicidad, volatilidad) en subproductos y metabolitos que pueden ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales, generando un menor impacto al ambiente y a la salud humana [4].

El petróleo también posee compuestos orgánicos con sulfuro, nitrógeno y oxígeno, y constituyentes metálicos en poca proporción. Debido a la complejidad de la composición del petróleo, la biodegradación por parte de las bacterias dependerá de las proporciones que tenga de cada una de sus fracciones [5, 6].

Venezuela, un país petrolero y minero, posee regiones donde existen problemas de contaminación ambiental ocasionados por el derrame de hidrocarburos. La Bahía de Amuay, ubicada en la Península de Paraguaná, es una de estas regiones. A mediados del año 2010 ocurrió un derrame de crudo que duró varios días, afectando las poblaciones de Amuay, Villa Marina, Los Taques, Judibana, Las Piedras y Carirubana; poblaciones cuya principal actividad económica es el turismo y la pesca [7]. Una manera de lograr la recuperación de suelos contaminados, en esta región, consiste en el aprovechamiento de la microflora autóctona de los suelos afectados para degradar los contaminantes hasta metabolitos que puedan ser fácilmente removidos y dispersados en el ambiente [8]. Para esto, existen diferentes tecnologías, siendo los métodos biológicos los que han demostrado ser eficientes y adecuados debido a que causan menor impacto en el sitio del problema [9, 10].

La bioestimulación es una técnica que consiste en la provisión activa de cantidades suficientes de oxígeno y nutrientes para mantener a los microorganismos responsables de la degradación de forma que estos puedan continuar proliferando y desarrollando el proceso de biodegradación. Es el método de biorremediación más estudiado, y actualmente se presenta como el de más factible aplicación para la mayoría de los suelos contaminados con hidrocarburos. El éxito de esta tecnología depende de la existencia, en el lugar contaminado, de microorganismos con la capacidad metabólica apropiada para transformar los compuestos xenobióticos, en compuestos que puedan ser reincorporados a los ciclos biogeoquímicos [11]. Por este motivo es importante caracterizar el suelo sobre el cual se trabaja [10].

Dependiendo de las características del suelo y del contenido de materia orgánica, los hidrocarburos de mayor peso molecular y menor solubilidad pueden adsorberse en los microporos de las partículas del suelo, resultando con esto ser inaccesibles como fuentes de carbono y energía para los microorganismos. Ante este escenario los surfactantes actúan logrando incrementar la biodisponibilidad mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante. Sin embargo la toxicidad e inhibición puede reducir el potencial de las aplicaciones en la biorremediación.

Para elegir un surfactante para la biorremediación se debe tener en cuenta, las propiedades del suelo a remediar, así como, las propiedades del propio surfactante. Los surfactantes son esenciales para el proceso de biorremediación, esto confirma el hecho de que algunos microorganismos producen su propio surfactante (biosurfactante) para solubilizar compuestos orgánicos hidrofóbicos [12].

En virtud de lo anterior y dado que existen zonas afectadas con hidrocarburos en las playas de la Bahía de Amuay, es necesario identificar y evaluar el potencial de los microorganismos nativos a fin de poder contar con bases de datos y cultivos que permitan su posterior utilización en procesos de remediación para el saneamiento ambiental de la región.

Es por ello que el objetivo de este trabajo fue

estudiar la biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la bahía de Amuay del Estado Falcón.

2. Metodología

El muestreo del suelo se realizó en un área de 480 m² desde el 07 de marzo hasta el 17 de septiembre del año 2011. La Bahía de Amuay está ubicada al noreste de Venezuela, en el sector oeste de la Península de Paraguaná, localizada a 11°45' Norte y 070°13' Oeste; donde 1,3 km de playa ancha mira hacia la Refinería de Amuay del Centro de Refinación Paraguaná por la costa este. A lo largo de la playa se recolectaron, en nueve puntos aleatorios, un total de dieciocho submuestras a una profundidad de 30 cm. Para obtener una muestra representativa del suelo, se mezclaron dos grupos de nueve submuestras y se formaron dos muestras compuestas. Estas se transportaron al laboratorio en frascos de vidrio estériles colocados en bolsas de polietileno negro. Posteriormente se mezclaron las muestras y se pasó por un tamiz de 2 mm de abertura, y por cuarteos sucesivos se tomó una porción de 2 kg sobre la cual se determinaron las propiedades físicas y químicas de los suelos.

La caracterización de los suelos se realizó en el Laboratorio de Servicios de Suelo, Agua y Planta (LSSAP/UNEFM). El nitrógeno total: se determinó a través del método de Kjeldahl, con 0,0500 gramos de muestra, 3 mL de ácido sulfúrico y 0,1 gramo de mezcla catalizadora (sulfato cúprico pentahidratado y selenio). Para determinar el fósforo se empleó el método colorimétrico azul de molibdeno. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro, a una longitud de onda de 600 nm. El potasio se determinó según norma COVENIN 1141-79. El pH se midió de acuerdo al método potenciométrico, en relación muestra agua 1:10. [13]. La conductividad eléctrica se midió por conductometría. La textura del suelo se midió sobre 25 g de peso seco utilizando el método del tacto [14, 5]. El contenido de hidrocarburos totales (HTP) se determinó por gravimetría (Standard Methods 5420-E).

Los recuentos de microorganismos en los suelos contaminados de la Bahía, se realizó en el laboratorio de microbiología (LIADSA/UNEFM), por medio de métodos de aislamiento y cultivo utilizados rutinariamente en el laboratorio, una vez culminada la cuantificación e identificación, se procedió a la evaluación del potencial biodegradador de las especies encontradas, para seleccionar las especies de mayor capacidad.

Para la determinación de los hongos presentes en las muestras de suelos se procedió a extraer las especies fúngicas por medio de la técnica de flotación en aceite mineral modificada [15], las cuales fueron inoculadas en medios de cultivos de Sabouraud Agar, para su posterior crecimiento en colonias. Después de 14 días de incubación, se procedió a la revisión de hongos, bacterias y levaduras que se desarrollaron en cada una de las placas y se realizó el estudio macroscópico por observación directa. Para identificar las distintas colonias se colocó un número a cada una de ellas, por el color y textura de cada especie formada.

Luego de la caracterización macroscópica se procedió a purificar cada uno de los hongos que se desarrollaron en las placas inoculándolos en tubos de ensayos previamente dispuestos con medio de cultivo de Sabouraud Agar, se identificaron los tubos con la muestra, el número de la colonia y la fecha. Transcurridos 14 días de incubación se observaron los tubos de ensayo para un análisis macroscópico con el fin de verificar la ausencia de otra especie de hongo presente en el tubo. Cuando se obtiene la especie pura se procede a la identificación microscópica a través del método de Riddel para microcultivos, utilizando un microscopio de luz para la identificación de las especies [16].

Para evaluar los microorganismos autóctonos se aislaron los hongos de las muestras de suelo contaminado con hidrocarburos procedentes de las playas de la Bahía de Amuay. Se evaluó el efecto de la concentración de los hidrocarburos en la velocidad de crecimiento de los hongos, en un medio que contenía un 2 % m/m de HTP; ver Tabla 1.

Para obtener los cultivos puros de los hongos, se aislaron en etapa de reproducción (formación

Tabla 1: Composición del medio de cultivo Czapek Dox.

Compuesto	Composición
Nitrato de sodio	0,20 g
Bifosfato de potasio	0,10 g
Sulfato de magnesio	0,05 g
Cloruro de potasio	0,05 g
Sulfato ferroso	0,001
Agar	2,00 g
HTP	2,00 g
Agua destilada	100 mL

de conidias) muestras, con asa de aguja estéril, que fueron sembradas en medio de cultivo Czapek Dox; sin sacarosa y contaminado con los hidrocarburos extraídos de los suelos de la Bahía de Amuay, con el fin de que fueran la única fuente de carbono para observar el crecimiento. Los hongos fueron sembrados en placas de Petri por triplicado. El micelio producido por los hongos se midió directamente con una regla Vernier. Se realizó un registro de estos datos durante 10 días de incubación.

Para el biotratamiento de muestras de suelos contaminados se utilizaron tres recipientes como biorreactores aproximadamente de 40 cm de largo, 24 cm de ancho y 15 cm de profundidad, en los cuales se colocó igual cantidad de suelo contaminado con crudo (2 kg). Dos de los biorreactores fueron saturados con medio mínimo surfactante (MMS) [17], para dar inicio al biotratamiento por bioestimulación. El medio mínimo surfactante (MMS) es una solución líquida que aporta los nutrientes necesarios para un desarrollo satisfactorio de los microorganismos, con la consecuente producción del biosurfactante necesario en la degradación de hidrocarburos por parte de éstos. Para su obtención, inicialmente se prepararon cuatro soluciones acuosas (medios) A, B, C y D, tal como se indica a continuación

a) Medio A: contiene 1,5 g de KH_2PO_4 ; 1,5 g de NaH_2PO_4 ; 2,5 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0,5 g de NaCl disueltos en agua destilada hasta obtener 500 ml de solución.

b) Medio B: contiene 1 g de NH_4Cl disuelto

en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.

c) Medio C: contiene 150 mg de FeSO_4 disueltos en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.

d) Medio D: contiene 5 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$; 2,5 mg de ZnSO_4 y 2,5 mg de molibdato de sodio monohidratado $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ disueltos en agua destilada hasta obtener 125 ml de solución.

Cada una de estas soluciones se filtró por separado, utilizando papel de filtro Wathman N° 1, y luego al filtrado del medio A se añadió el filtrado del medio D, C y por último el medio B (la mezcla debe realizarse estrictamente en este orden para evitar la formación de precipitados). Esta mezcla constituye una solución 10X, y para su conservación se refrigeró en un recipiente de vidrio esterilizado. Para obtener el MMS se mezclaron 100 mL de solución 10X con 900 mL de agua destilada y 8 g de glucosa. Se esterilizó la mezcla en autoclave a 15 libras por 15 minutos. La mezcla resultante es una solución 1X y fue empleada como medio mínimo surfactante.

Los biorreactores se mantuvieron saturados y aireados durante el lapso del estudio, añadiendo porciones de MMS a medida que se observaba pérdida de humedad del suelo [18], el otro biorreactor funcionó como control para establecer comparaciones. Con el fin de monitorear y evaluar la biodegradación del contaminante presente en el suelo, se tomaron muestras de suelo los días 0, 7, 14, 21 y 30, para analizar el contenido de hidrocarburos totales (HTP) y verificar la tasa de degradación de HTP a lo largo del experimento [19].

3. Resultados y Discusión

En la Tabla 2, se muestran las características fisicoquímicas de las muestras de suelo provenientes de la Bahía de Amuay (M1 y M2) y de una muestra recogida en la playa Piedras Negras que se empleó como muestra control (MB) en los análisis realizados. Cabe señalar que estos

Tabla 2: Características fisicoquímicas de las muestras analizadas.

		Muestra de la Bahía de Amuay		Muestra control
Parámetro		M1	M2	MB
Textura, % de arena	Muy gruesa 2-1 mm	12,27	29,90	46,73
	Gruesa 1-0,5 mm	14,03	13,50	36,44
	Media 0,5-0,25 mm	34,43	30,26	1,96
	Fina 0,25-0,1 mm	33,26	20,66	2,19
	Muy fina 0,1-0,05 mm	0,99	0,34	0,04
	% total de arena	94,98	94,66	97,36
	% Limo	4,42	4,74	2,24
	% Arcilla	0,60	0,60	0,40
	Clase Textural	Arenoso	Arenoso	Arenoso
pH		7,70	7,80	7,70
C.E (mmh/cm)		3,80	3,70	0,49
HTP (% en peso)		1,61	1,57	0,48
Nitrógeno, (mg/Kg)		8,30	7,60	13,90
Fósforo, (mg/Kg)		0,00	0,00	0,00

resultados demuestran que el suelo contaminado no posee limitantes de carácter fisicoquímicos para el correcto desarrollo de microorganismos; a excepción del contenido de nitrógeno y de fosforo, que se encuentran en bajas concentraciones, lo que puede representar un problema en la biodegradación del petróleo en la muestras [5].

Las muestras de suelo analizadas poseen una textura franco arenoso con 5,18 % de partículas finas (limo y arcilla), y con 94,82 % de arena. Conformadas principalmente por arena media y fina. Esta textura permite una buena aireación del suelo, que favorece el crecimiento de los microorganismos [5, 20].

En cuanto al pH y la conductividad de las muestras de suelo analizadas, se encontró que las mismas son ligeramente alcalinas (pH 7,7-7,8), esta condición favorece el crecimiento de la mayoría de los microorganismos existentes en el suelo. En tanto que los valores de conductividad superan levemente el nivel máximo recomendado (3,6 mmh/cm) para una adecuada biodegradación del petróleo presente en el suelo.

La normativa venezolana establece que el contenido de hidrocarburos totales en los suelos debe ser menor al 1 % [21]. En este sentido, las muestras analizadas presentan valores sobre el

1,50 %, evidenciándose la contaminación de los mismos. En referencia a la baja concentración de nitrógeno y fósforo que representan un factor desfavorable para el proceso de biorremediación, diversos autores han señalado que este problema se puede solucionar empleando un adecuado sistema de bioestimulación [5, 22].

En las muestras analizadas se observó la presencia de hongos. Se tomó en consideración las colonias que presentaron texturas aterciopeladas y algodonosas propias de los hongos, ya que las colonias con textura cremosa son propias de bacterias que no fueron objeto de este trabajo. La identificación macroscópica y microscópica a través del método de Riddel para microcultivos, utilizando un microscopio de luz permitió establecer que los hongos presentes en mayor proporción fueron: *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus Níger*, y *Aspergillus Terreus* (ver Figura 1).

En la Tabla 3, se presenta el diámetro de las cepas de hongos aisladas a diferentes días de cultivos. En ella se observa que la especie de *Aspergillus Níger*, es la cepa que presenta el mayor aumento en el diámetro a lo largo del tiempo. En virtud de lo anterior, se establece que la especie de *Aspergillus Níger* degrada los hidrocarburos con mayor rapidez que las otras

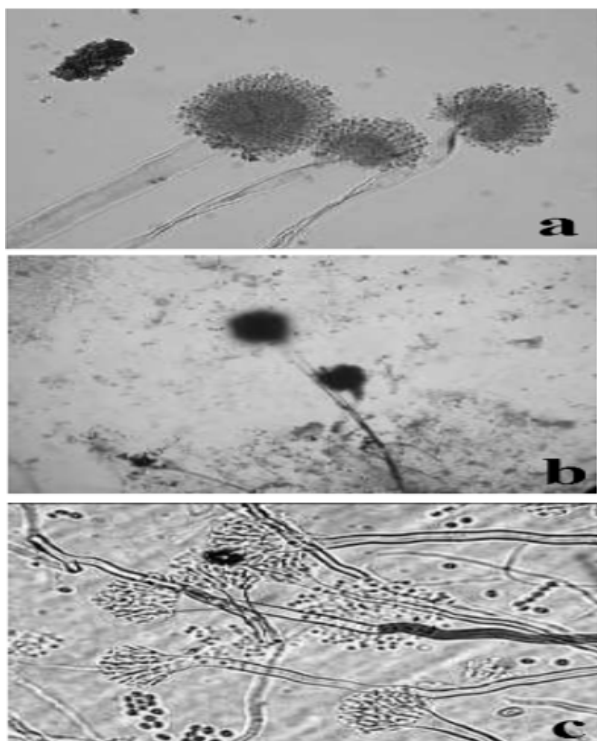


Figura 1: Apariencia microscópica de los hongos encontrados: a) *Aspergillus Flavus*, b) *Aspergillus Níger*, c) *Aspergillus Terreus*.

especies *Aspergillus*; apreciándose su efectividad para utilizar los hidrocarburos del sustrato como fuente de carbono para su desarrollo como era de esperarse, de acuerdo a los planteado por diversos autores [23, 24, 25].

Estos resultados muestran la alta capacidad que poseen estos hongos del género *Aspergillus* para ser un activo degradador del petróleo, presentes en los suelos de la Bahía de Amuay, lo cual indica que estos hongos son fuertes candidatos para ser agentes de biorremediación ambiental [7].

Los microorganismos identificados en esta investigación muestran que son capaces de biodegradar los hidrocarburos presentes en el mismo. En la Tabla 4, se presentan la variación del porcentaje de HPT durante los días que fue realizado el estudio.

Estos resultados demuestran la efectividad del biotratamiento estimulado por el MMS en los suelos contaminados de la Bahía de Amuay; donde se logró remover más del 85 % del contenido de HPT presente en las muestras. En cuanto a la muestra proveniente de la Playa Piedras Negras

Tabla 3: Diámetro de las cepas de hongos aisladas, en cm.

día	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Aspergillus Níger</i>	<i>Aspergillus terreus</i>
1	0,50	0,50	0,50
2	2,42	3,05	1,88
3	4,25	4,79	3,64
4	5,16	5,83	4,33
5	5,67	6,36	4,69
6	6,35	7,24	5,25
7	6,91	7,90	5,64
8	7,47	8,50	6,22
9	7,96	8,50	6,65
10	8,28	8,50	7,35

Tabla 4: Variación del Porcentaje de HPT en las muestras de suelo analizadas.

Día	Porcentaje de HPT, %			Remoción de HPT, %		
	M1	M2	MB	M1	M2	MB
0	1,61	1,57	0,48	0,00	0,00	0,00
7	0,56	0,54	0,38	65,22	63,06	16,67
14	0,35	0,34	0,35	78,26	79,62	18,75
21	0,27	0,26	0,33	83,23	83,44	20,83
30	0,24	0,23	0,31	85,09	85,35	22,92

también se nota una tendencia en la disminución de los HTP pero menos marcada, debido a que los microorganismos presentes en estos suelos no fueron estimulados (ver Figura 2).

Tabla 5: Conteo de microorganismos en las muestras analizadas.

Muestras Bahia de Amuay	Unidades formadoras de colonias, UFC/g suelo
M1	1.660
M2	1.662

Diversos autores [5, 23, 24, 25], han señalado que para el tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos se requiere una concentración mínima de microorganismos degradadores específicos de 103 a 104 UFC/g suelo (UFC: unidades formadoras de colonias). En tal sentido se encontró que las muestras analizadas poseen un valor de UFC que supera a los establecidos por estos autores (ver Tabla 5). En virtud, de lo cual

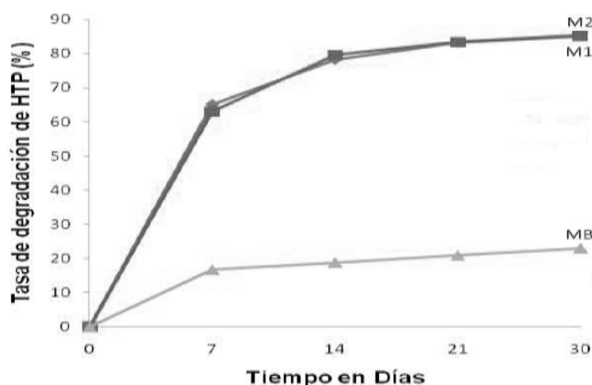


Figura 2: Porcentaje de remoción de HTP a lo largo del biotratamiento.

la degradación de HTP mediante la estimulación con MMS, trajo resultados satisfactorios ya que se logró un alto porcentaje de remoción en un tiempo óptimo [7].

4. Conclusiones

Las especies de hongos del género *Aspergillus* aisladas: *Aspergillus Níger*, *Aspergillus Flavus* y *Aspergillus Terreus*, son capaces de crecer y degradar los HTP, observándose una remoción que supera el 85,00 % de estos contaminantes. Esto corrobora la capacidad degradadora de estos microorganismos y su potencial para ser usados en procesos de remediación de suelos contaminados con petróleo.

Agradecimientos

Al personal técnico del Laboratorio de Servicios de Suelo, Agua y Planta (LSSAP), al laboratorio de Microscopia y por último al Laboratorio de Análisis Químico (LAQ) de la Universidad Nacional Experimental “Francisco de Miranda” por el apoyo brindado durante el desarrollo de esta investigación.

Referencias

[1] Marc Viñas Canals. *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiológica, química y ecotoxicológica*. Universitat de Barcelona, 2005.

[2] Colwell, Rita R and Walker, John D y Cooney, Joseph J. Ecological aspects of microbial degradation of petroleum in the marine environment. *Critical Reviews in Microbiology*, 5(4):423–445, 1977.

[3] Ronald M Atlas. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological reviews*, 45(1):180, 1981.

[4] F Mohamad, A Bakar, and M Basri. Biodegradation of hydrocarbons in soil by consortium. *International Biodeterioration and biodegradation*, pages 61–67, 2004.

[5] Adrián Acuña, Graciela Pucci, María José Morales, and Oscar Pucci. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la patagonia argentina. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 30(1):29–36, 2011.

[6] James G Speight. *The chemistry and technology of petroleum*. CRC press, 2014.

[7] F. García. Trabajo de ascenso a la categoría Asistente no publicado. Universidad Nacional Experimental Francisco de Miranda. Punto Fijo., 2011.

[8] DJ Monticello, W Ji, JD Childs, CA McDonald, SW Johnson, and CH Squires. The molecular biology of dibenzothiophene desulfurization. In *The Seven International IGT Symposium of Gas, Oil and Environmental Microbiology*, pages 1–15, 1994.

[9] Anders R Johnsen, Lukas Y Wick, and Hauke Harms. Principles of microbial pah-degradation in soil. *Environmental Pollution*, 133(1):71–84, 2005.

[10] Mphokgo P Maila and Thomas E Cloete. Bioremediation of petroleum hydrocarbons through landfarming: Are simplicity and cost-effectiveness the only advantages? *Reviews in Environmental science and bio/Technology*, 3(4):349–360, 2004.

[11] Lyle G Whyte, Luc Bourbonniere, and Charles W Greer. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic pseudomonas strains possessing both alkane (alk) and naphthalene (nah) catabolic pathways. *Applied and environmental microbiology*, 63(9):3719–3723, 1997.

[12] Helmy, J. Sing, A. Recente advances in petroleum microbiology microbiology and molecular. *Biology Reviews*, 67:503–549, 2009.

[13] Brito, G, Rojas, I y Pérez, R. Manual de métodos y procedimientos de referencia. *Análisis de suelo para diagnóstico de fertilidad, Laboratorios, Manuales. FONAIAP. Serie D*, (26):164, 1990.

[14] I Yolcubal, ML Brusseau, JF Artiola, P Wierenga, and LG Wilson. Environmental physical properties and processes. *Environmental monitoring and characterization. Elsevier (Ed.)*. USA, pages 207–39, 2004.

[15] Richard-Yegres N., Yegres F. y González R. Técnica rápida y sencilla para el aislamiento de cladosporium carrionii en muestras de vegetación xerófila. *Acta científica venezolana*, 37, 1986.

[16] G Casal. *Micología General*. Ediciones de la

Biblioteca. UCV., Caracas – Venezuela, 1994.

- [17] Ronald M Atlas. Microbial hydrocarbon degradation–bioremediation of oil spills. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 52(2):149–156, 1991.
- [18] E Ercoli, J Gálvez, M Di Paola, J Cantero, S Videla, M Medaura, and J Bauzá. Análisis y evaluación de parámetros críticos en biodegradación de hidrocarburos en suelo. *Laboratorio de Bioprocesos. Universidad Nacional de Cuyo, Argentina.[Links]*, 2000.
- [19] Tania Volke Sepúlveda, Juan Antonio Velasco Trejo, and A David. *Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación*. Instituto Nacional de Ecología, 2005.
- [20] RP Voroney. The soil habitat. *Soil microbiology, ecology, and biochemistry*, pages 25–49, 2007.
- [21] Asamblea Nacional. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. decreto 2635. Gaceta Oficial Extraordinaria n.º 5245 de la República de Venezuela. Imprenta Nacional. Caracas, Venezuela., 1998.
- [22] Jonathan D Van Hamme, Ajay Singh, and Owen P Ward. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4):503–549, 2003.
- [23] Ludmila Martínková, Bronislava Uhnáková, Miroslav Pátek, Jan Nešvera, and Vladimír Křen. Biodegradation potential of the genus *rhodococcus*. *Environment International*, 35(1):162–177, 2009.
- [24] Lara D Sette, Karen CM Simioni, Suzan P Vasconcellos, Lucia J Dussan, Eugênio VS Neto, and Valéria M Oliveira. Analysis of the composition of bacterial communities in oil reservoirs from a southern offshore brazilian basin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 91(3):253–266, 2007.
- [25] R Atlas and R Bartha. Los microorganismos en sus hábitat naturales: microbiología del aire, del agua y del suelo. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*, pages 329–380, 2002.