



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**ESTUDIO SOBRE LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE
MEGATHYRSUS MAXIMUM ((JACQ) B.K. SIMON & S.W.L.
JACOBS) Y *UROCHLOA BRIZANTHA* (HOCHST. EX A.
RICH.) EN SUELOS CONTAMINADOS CON DIFERENTES
PETRÓLEOS CRUDOS**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

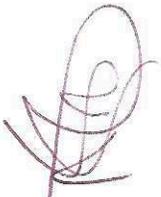
Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por el bachiller Luis Manuel Lárez Ferrer, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dr. Ismael Hernández Valencia

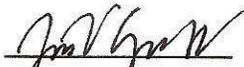
CARACAS, VENEZUELA
OCTUBRE - 2013

ACTA

Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Estudio sobre la germinación de semillas de *Megathyrsus maximum* ((jacq) b.k. simon & s.w.l. jacobs) y *Urochloa brizantha* (hochst. ex a. rich.) en suelos contaminados con diferentes petróleos crudos" presentado por el Br. Luis Manuel Lárez Ferrer, certificamos que este trabajo cumple con los requisitos exigidos por nuestra Magna Casa de Estudios para optar al título de Licenciado en Biología.



Dr. Ismael Hernández
(Tutor académico)



Dr. José García
(Jurado)



Dra. Nora Malaver
(Jurado)

Dedicado a Alexandra García...

AGRADECIMIENTOS

Gracias principalmente al profesor Ismael Hernández, excelente guía y maestro. Por siempre estar dispuesto a aclarar mis dudas, tenderme la mano y darme las herramientas necesarias para llevar a cabo este proyecto.

A los integrantes del Laboratorio de Ecología del Paisaje y Agroecología, en especial a María de los Ángeles y Rossana Mendoza, por su gran ayuda e infinita paciencia.

Infinitas gracias a mi abuela que todos los días estuvo pendiente y preocupada.

A José Vicente García por su ayuda y consejos. Aura Llanos por su ayuda en la obtención de los crudos necesarios para este proyecto. Alejandro Moreno y su aporte en la estadística. Luis Alejandro Melo, Luis Zuloaga, Guillermo, Daniel Guitian, familia, demás personas y amigos que siempre estuvieron pendientes de mis avances.

Y por supuesto a Alexandra García, no hay palabras que puedan expresar mi agradecimiento a todo el apoyo incondicional que me brindaste, gracias por ayudarme, tolerarme y comprenderme en los momentos que más lo necesité. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	5
1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Generalidades	6
1.2 Composición del petróleo	7
1.3 Efectos tóxicos del petróleo sobre las plantas	9
1.4 Ecotoxicología	13
2 ANTECEDENTES	18
3 OBJETIVO GENERAL	24
3.1 Objetivos específicos	24
4 MATERIALES Y MÉTODOS	25
4.1 Materiales	25
4.1.1 Material Biológico	25
4.1.2 Suelo	26
4.1.3 Crudos de petróleo	27
4.2 metodología	27
4.2.1 Caracterización del suelo	27
4.2.2 Efecto de la contaminación del suelo sobre la germinación	29

4.2.3	Evaluación de los efectos	31
5	RESULTADOS	34
5.1	Análisis de las propiedades físicas y químicas del suelo utilizado en los ensayos	34
5.2	Prueba de estandarización	36
5.3	Efecto de diferentes concentraciones de petróleo en el suelo sobre la germinación	37
5.3.1	Efecto Sobre la germinación.....	37
5.3.2	Efecto de diferentes concentraciones de petróleo en el suelo sobre la elongación de la radícula e hipocotilo	40
5.3.3	Efecto de diferentes concentraciones de petróleo en el suelo sobre el Índice de germinación (IG).....	44
5.3.4	Concentración efecto medio (CE ₅₀)	45
5.3.5	Relación entre la capacidad de almacenamiento de petróleo en el suelo y la germinación de semillas.....	46
6	DISCUSIÓN	48
7	CONCLUSIONES	54
8	BIBLIOGRAFÍA	56
9	ANEXOS	65
9.1	Tablas	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Disposición de semillas en la cápsula de Petri.

Figura 2. Tiempo de germinación de semillas de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* en suelo sin contaminar.

Figura 3. Porcentaje de germinación (%) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

Figura 4. Elongación de la radícula (mm) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

FIGURA 5. Elongación del hipocotilo (mm) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

FIGURA 6. Índice de germinación (IG) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

Figura 7. Relación entre la retención de 100% de crudo, 100% de mortalidad y CE₅₀ de los crudos liviano, mediano, pesado y extrapesado para *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máxima*.

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del crudo según su gravedad API.

Tabla 2. Tratamientos.

Tabla 3. Proporción de las fracciones minerales del suelo.

Tabla 4. Características físicas y químicas del suelo utilizado para los ensayos.

Tabla 5. Germinación de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máxima*.

Tabla 6. Intervalos de germinación para las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes tipos de crudos.

Tabla 7. Elongación de radícula (mm) en *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máxima*.

Tabla 8. Elongación del hipocotilo (mm) en *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máxima*.

Tabla 9. Valores CE₅₀ obtenidos para las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes tipos de crudos.

Tabla 10. Escala ascendente de toxicidad para la comparación de resultados en la evaluación de la toxicidad.

Tabla 11. Capacidad de retención del suelo (g).

Tabla 12. Resultados del porcentaje de germinación, elongación de la radícula, elongación del hipocotilo e índice de germinación.

RESUMEN

El petróleo es contaminante y sus efectos nocivos se pueden prolongar por mucho tiempo, convirtiéndose en uno de los problemas ambientales más comunes de nuestros tiempos en los países en los que se practica esta actividad. Tomando en cuenta que el petróleo es el principal producto de exportación de la República Bolivariana de Venezuela y en vista que la mayor reserva de crudo pesado y extrapesado del mundo se ubica en la Faja Petrolífera del Orinoco, tenemos una alta vulnerabilidad a la degradación ambiental debido a la actividad petrolera cuando no se utilicen las mejores prácticas para el manejo de la actividad. En el presente trabajo se realizaron bioensayos de toxicidad aguda a corto plazo con semillas de *Megathyrsus maximus* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.), dos especies de pastos africanas de gran interés comercial, muy utilizadas en las sabanas venezolanas en el pastoreo del ganado, para evaluar el efecto de su exposición a suelos contaminado con crudos de petróleo extrapesado (9,3 °API); pesado (12,1 °API); mediano (27,2 °API) y liviano (30 °API). Se obtuvo un intervalo de germinación para ambas especie en crudo extrapesado de 0 – 90 %, en crudo pesado de 0 – 63 %, en crudo mediano 0 – 12 % y en crudo liviano 0 – 9 %. No se evidenciaron diferencias significativas en la sensibilidad de las dos especies de gramíneas ante los suelos contaminados. En cuanto a la peligrosidad de los crudos, el crudo liviano resultó ser más tóxico para ambas especies según el valor del CE₅₀ y crudo extrapesado el menos tóxico. Los resultados pueden ser utilizados para la selección de gramíneas con potencial uso en procesos de fitorremediación, gestión ambiental de derrames accidentales y en procesos de recuperación y restauración de suelos de sabana impactados con estos crudos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES

La contaminación por hidrocarburos de petróleo es uno de los problemas ambientales más comunes de nuestros tiempos y puede producirse durante todos los procesos de la cadena de valor de la industria petrolera (exploración, producción, transporte, refinación y comercialización), principalmente por el uso de prácticas inadecuadas en las operaciones. La contaminación por petróleo causa daños ecológicos de gran importancia alrededor del mundo; por lo que la recuperación de suelos y aguas contaminadas se ha convertido en una materia prioritaria de investigación.

Según el informe de gestión anual de PDVSA, en el año 2012 la República Bolivariana de Venezuela produjo 3.034.000 barriles de crudo por día, siendo el cuarto país de la OPEP y el séptimo a nivel mundial con mayor producción de petróleo. El Plan Siembra Petrolera presentado por PDVSA en el año 2006, estableció las directrices de la política petrolera hasta el año 2013 y tiene entre sus objetivos la búsqueda y desarrollo de crudos livianos, medianos, el desarrollo integral de la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO) y la aceleración de la explotación de áreas tradicionales y Costa Afuera (PDVSA, 2010). Se estima que la FPO aporte 1 millón 350 mil barriles diarios de petróleo, teniendo como meta llegar a los 4 millones de barriles diarios para 2014 y 6 millones para el 2019.

Tomando en cuenta que el petróleo es el principal producto de exportación del país y en vista de que su mayor reserva de crudo pesado se ubica en la FPO, podemos concluir que el país es altamente vulnerable a la degradación ambiental por la actividad petrolera que

no se ejecute siguiendo las mejores prácticas en el manejo de la confiabilidad. Ante este escenario, se hace necesario evaluar los efectos potenciales de derrames accidentales que pudieran ocurrir en las operaciones.

Diferentes estudios han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos sobre plantas, animales y microorganismos. Dicha contaminación ocasiona un deterioro progresivo de la calidad del ambiente y genera una amenaza real a la salud pública; así como la extinción de gran cantidad de especies vegetales y animales (Benavides y col., 2006). Las industrias actualmente están obligadas a descontaminar su emplazamiento cuando cesan sus actividades, lo cual resulta en una operación laboriosa y por supuesto, costosa que incluye la recolección e interpretación de información histórica acerca de las actividades realizadas en ese lugar y de los posibles niveles de contaminantes químicos que puedan estar presentes en el sitio. En caso de encontrar contaminantes, se debe realizar un saneamiento ambiental y reforestar el área. Así que se hace necesario cada vez más, conocer y contar con especies aptas para dicha acción y los niveles de contaminantes que son capaces de tolerar.

1.2 COMPOSICIÓN DEL PETRÓLEO

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja de compuestos orgánicos que pueden contener heteroátomos tales como: azufre, oxígeno y nitrógeno y otros compuestos con metales pesados tales como: níquel, vanadio, cromo y cobre, que pueden estar libres o asociados a estructuras complejas. Todos los crudos desde livianos a pesados tienen los mismos componentes: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. Los crudos pesados tienen menor proporción p/p de resinas y asfaltenos

Los componentes del petróleo pueden tener en su estructura molecular desde uno hasta más de 1000 átomos de carbono, y se agrupan en las siguientes familias (Speight, 1999):

- a) Parafinas, hidrocarburos saturados de cadenas lineales o ramificadas.
- b) Naftenos, hidrocarburos saturados cíclicos que puede tener uno o más cadenas parafínicas laterales. Estos ciclos nafténicos pueden encontrarse en forma condensada.
- c) Aromáticos, hidrocarburos que contienen uno o más núcleos aromáticos que pueden ser simples o condensados y tener sustituyentes parafínicos o nafténicos.
- d) Compuestos azufrados: compuestos que contienen grupos funcionales de tipo mercaptano, sulfuro y tiofeno. Estos últimos, son los más abundantes entre los compuestos azufrados.
- e) Compuestos nitrogenados: pueden ser básicos o neutros. Los compuestos nitrogenados básicos pertenecen a la familia de las piridinas; mientras que los neutros, pertenecen a la familia de los pirroles.
- f) Compuestos oxigenados: contienen grupos funcionales del tipo ácido carboxílico, cetonas, furanos y fenoles.
- g) Compuestos metálicos: generalmente contienen níquel, vanadio, cromo o hierro y se encuentran acomplejados en forma de petroporfirinas.

La densidad de las mezclas, expresada como gravedad en la escala API (American Petroleum Institute), es el principal parámetro utilizado para clasificar los crudos (**Tabla 1**).

Tabla 1. Clasificación del crudo según su gravedad API

Crudos	Gravedad API (°)
Livianos	≥ 30,1
Medianos	30 a 22,1
Pesados	22 a 10,1
Extra pesados	< 10

Fuente: Speight, 2001

Se consideran con mayor potencial tóxico a los hidrocarburos monoaromáticos, tales como: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, así como también a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's). La presencia de estos compuestos es uno de los principales factores que se consideran al evaluar el riesgo a la salud humana o a impactos ambientales adversos asociados a contaminación por petróleo. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de Norteamérica (USEPA), ha clasificado un total de 16 HAP's como compuestos carcinógenos y mutagénicos (Mancera-López y col, 2008).

1.3 EFECTOS TÓXICOS DEL PETRÓLEO SOBRE LAS PLANTAS

La composición química de cada crudo y sus productos petrolíferos varía y puede tener diversos efectos sobre diferentes organismos dentro de un mismo ecosistema. Estas diferencias en los efectos tóxicos se deben a una composición cualitativa diferente en cada producto, así como a las diferencias de concentración de cada componente. (Kyung-Hwa y col, 2004).

Las plantas son esenciales en los ecosistemas porque son las responsables de transformar la energía solar en energía química, al tiempo que absorben dióxido de carbono. De esta

manera, proveen alimento y oxígeno al resto de los organismos. Además, las plantas son un componente esencial de los ecosistemas terrestres, porque proporcionan refugio y sitios de anidamiento para elementos de la fauna silvestre y participan de forma primordial en los ciclos de nutrientes y en los procesos de estabilización de los suelos (Wang y Freemark, 1995).

El petróleo produce daños en las plantas por el potencial tóxico de los hidrocarburos (Pothuluri y Cerniglia, 1994). Además, el contacto directo produce quemaduras y una reducción de la fotosíntesis por el recubrimiento de las hojas y los tallos (Freemark, 1995).

El daño a las plantas por los contaminantes puede afectar directamente a la estructura y la función de un ecosistema, al reducir la producción primaria, incrementar el lavado y erosión del suelo y degradar el hábitat de la vida silvestre. Los efectos letales de los contaminantes sobre las plantas pueden significar pérdidas ecológicas y económicas importantes; incluso los efectos subletales pueden tener un impacto significativo sobre la producción de alimentos y el desarrollo de la vegetación natural e implicaciones adversas para los organismos de niveles superiores en la cadena alimenticia (Wang y Freemark, 1995).

Al contacto con la superficie de la hoja, los hidrocarburos se mueven a través de los espacios intercelulares, penetran al interior de la planta y se distribuyen hacia la raíz. Lo mismo ocurre al contacto con la superficie de la raíz, pero en dirección contraria, hacia las hojas. El movimiento del crudo ocurre a través del sistema vascular y el parénquima. A nivel celular, por sí solo, el petróleo no puede penetrar la pared celular, ya que ésta se

encuentra saturada de agua, lo que le impide su paso. Pero debido a la fuerza de gravedad y los movimientos causados por el viento, el petróleo es empujado al interior de la célula. (Baker, 1970). Hay componentes polares altamente solubles que pasan al interior de la célula, mientras que los componentes apolares podrían quedarse retenidos de acuerdo a sus coeficientes de partición.

Los procesos fisiológicos de las plantas se ven fuertemente afectados por el paso del crudo a través de ellas. En general, las plantas muestran una disminución en la tasa de transpiración, y su recuperación depende de la cantidad y tipo de crudo. A mayor viscosidad y cantidad de crudo derramado, mayor es el tiempo de recuperación de la planta (Baker, 1970).

En el caso de la respiración, el efecto depende del tipo de crudo y el tipo de planta. Se han descrito los siguientes:

- a) Crudos diferentes. Los crudos oxidados muy tóxicos y compuestos aromáticos pueden reducir o detener la respiración y causar daños generalizados y la muerte.
- b) Diferentes plantas. El mismo hidrocarburo puede tener diferentes efectos sobre distintas plantas. Por ejemplo, la nafta de petróleo aumenta la tasa de respiración de la chirivía (*Pastinaca sativa*) y disminuye la de la mostaza (*Brassica nigra*) (Nozzolillo y Helson, 1959).

Es necesario recordar los 4 procesos involucrados en la respiración: intercambio gaseoso, glicólisis, el ciclo del ácido tricarbóxico y la fosforilación oxidativa, los cuales pueden ser afectados de manera diferente:

- a) Los hidrocarburos de petróleo pueden interferir con el intercambio gaseoso al bloquear estomas y espacios intercelulares. Aunque Brown y Reid (1951) demostraron que la difusión gaseosa puede ocurrir fácilmente a través de las películas de aceite.
- b) Si el hidrocarburo de petróleo rompe la membrana celular, las membranas mitocondriales se podrían romper lo suficiente para inhibir el ciclo de Krebs y la fosforilación oxidativa. La glicólisis podría continuar y en estas condiciones, el efecto Pasteur operaría, es decir, habría un mayor consumo de azúcares y producción de grandes cantidades de dióxido de carbono (Rasmussen, 1947), sin la absorción de oxígeno, debido a que cuando la fosforilación oxidativa no está teniendo lugar, el suministro de iones fosfato y ADP a la oxidación de fosfogliceraldehido (reacción marcapasos en la glucólisis) se incrementa (Baker, 1970).

Los hidrocarburos de petróleo pueden reducir consistentemente la tasa de fotosíntesis, la cual varía con el tipo, cantidad de crudo y especie. Su efecto principal sobre la fotosíntesis se produce en el tejido de la hoja que se caracteriza por una decoloración oscura, aunque Riehl y Wedding (1959) encontraron que las células de los tejidos decolorados no están muertas. Varios investigadores sostienen que el crudo actúa como una barrera física que interfiere con el intercambio gaseoso o incluso absorbiendo las ondas de luz necesarias para este proceso, dado que tiende a acumularse en los cloroplastos, siendo la destrucción de la clorofila uno de los síntomas más evidentes de la contaminación por petróleo (Baker, 1970).

En cuanto a la germinación, el crudo entra en la semilla y mata al embrión, o la recubre y evita el intercambio de oxígeno y agua, ambos esenciales para dicho proceso. Si la planta logra crecer, el hidrocarburo produce una disminución en su tamaño y en su producción de biomasa (Baker, 1970).

En algunos casos, después de un derrame de petróleo, un aumento en la producción de biomasa y en el crecimiento y desarrollo de algunas especies pueden ser observadas. Es probable que esto se produzca por tres razones:

i) El crudo puede matar algunos organismos presentes en el suelo, incrementando la materia orgánica disponible

ii) Algunos compuestos con capacidad reguladora del crecimiento de la planta podrían estar presente en el crudo.

iii) La fijación de nitrógeno podría aumentar con la presencia de crudo en el suelo (Bona y col, 2011).

1.4 ECOTOXICOLOGÍA

La ecotoxicología o toxicología ambiental aplica los principios de la toxicología a los sistemas naturales con el fin de evaluar el impacto potencial que suponen los vertidos de materias tóxicas. Es importante comprender no solamente los efectos directos de una sustancia química en un organismo, sino conocer la forma en que esta sustancia interviene en el medio ambiente que rodea a este organismo, como en los casos de

alteración física del hábitat tras un vertido químico, pérdidas de fuentes alimentarias o por degradación biológica o química.

Los principios de exposición, absorción, metabolismo y respuesta empleados en investigaciones con seres humanos están relacionados asimismo con la ecotoxicología. Aunque las fases concretas pueden variar considerablemente, los principios farmacocinéticos fundamentales son los mismos. Los conceptos de afinidad estructural y actividad química son también de gran importancia para la ecotoxicología. No obstante, la aplicación de tales principios y normas a las distintas poblaciones de especies silvestres que se interrelacionan en las comunidades del sistema natural, ofrece grandes desafíos para los científicos e ingenieros involucrados en la toma de decisiones relacionadas con la gestión ambiental.

La toxicidad, es la capacidad que tiene una sustancia de causar efectos nocivos sobre los organismos vivos, con especial interés en poblaciones y comunidades de ecosistemas definidos. El grado de peligrosidad dependerá tanto de las propiedades químicas del compuesto, como de su concentración, según sea la duración y frecuencia de la exposición al agente tóxico, su relación con el ciclo de vida del organismo y su interacción propia con la matriz ambiental (Zamora y García, 2011).

Con el propósito de calcular los riesgos asociados a las exposiciones sufridas por los seres vivos frente a sustancias químicas, los ecotoxicólogos han empleado una combinación de pruebas biológicas agudas o letales, a corto, mediano y largo plazo. Una prueba biológica (bioensayo) es una técnica consistente en el empleo de organismos, sistemas y procesos

biológicos para efectuar mediciones cuantitativas de las consecuencias potenciales de una exposición a sustancias químicas (LaGrega y col, 2003).

Los resultados de las pruebas de toxicidad a corto y largo plazo se utilizan habitualmente para establecer criterios de calidad de aguas, para calcular la potencialidad mortal o destructiva de los pesticidas, para regular los límites permitidos de vertidos y para estimar los efectos potenciales de los vertidos catastróficos o de los accidentes químicos, así como los efectos, reales o potenciales de la eliminación y limpieza de residuos tóxicos. Puede definirse una prueba biológica como la exposición en laboratorio de los organismos a muestras de campo, para de este modo, identificar los efectos reales y potenciales sobre las especies involucradas. La simulación de exposiciones e interpretación de los efectos sobre las comunidades o los ecosistemas resultan de mayor dificultad que la medición de la exposición y de los efectos de poblaciones de individuos en un sistema experimental de laboratorio (LaGrega y col, 2003).

Las pruebas de toxicidad a largo plazo, se conocen como **pruebas crónicas a largo plazo**, las cuales sirven para determinar en qué medida puede afectar negativamente a un individuo, una exposición prolongada frente a una determinada sustancia, valiéndose para ello del estudio en laboratorio de organismos en sus distintas fases vitales. En estas pruebas es posible efectuar mediciones potenciales de desarrollo, homeostáticas o de crecimiento, para de este modo establecer unos niveles de concentración fijos que condicionarían la aparición de consecuencias a largo plazo. La duración de estas pruebas puede ser de semanas, meses, años, siendo dicho período, una porción importante del ciclo de vida del organismo. Normalmente, el tiempo de exposición en estos bioensayos

debe ser mayor o igual al 10 % del tiempo de vida del organismo, y en éstos, se miden parámetros de desarrollo, fecundidad y fertilidad (Zamora y García, 2011).

En las pruebas crónicas de toxicidad se puede determinar la **Concentración Efecto Media (CE₅₀)** es la concentración de la muestra original a la cual se observa, en promedio, un efecto en el 50% de la población experimental, al cabo de un tiempo determinado. En estas pruebas no ocurre la muerte del individuo, sino una alteración del parámetro estudiado respecto al grupo control. Entre los parámetros analizados se incluyen fisiológicos, bioquímicos, reproductivos y de comportamiento (Tarache, 2011).

Las pruebas de toxicidad a corto plazo, se conocen como **pruebas agudas de toxicidad**, se utilizan para realizar cálculos de los efectos letales resultantes de exposiciones que abarcan períodos relativamente cortos de tiempo. En este caso como la respuesta que se mide es la mortalidad de los individuos bajo prueba y se determina la **Concentración Letal Media (CL₅₀)**. Cualquier respuesta obtenida a partir de métodos simuladores refleja un punto clave de medición, pero las pruebas agudas de toxicidad se emplean más frecuentemente para calcular el porcentaje de seres afectados por un compuesto o una alteración química. En el grado de respuesta toxica influyen varios factores, siendo la dosis, el factor determinante de la gravedad de la respuesta toxica, ya que existe una relación entre su cantidad y una consecuencia más aguda (LaGrega y col, 2003).

La población expuesta no sufrirá por lo general bajas debido a la acción de pequeñas dosis, pero se irán produciendo a medida que aumenta la dosis, hasta la desaparición de la población total. A menos que la sustancia sea más tóxica, en este caso una dosis

pequeña puede producir una mayor cantidad de bajas. Los efectos adversos no dependen solamente de la concentración o dosis del tóxico, sino también del grado de peligrosidad, del tiempo de exposición y del medio circundante, ya que el tóxico puede variar en diferentes tipos de suelos y aguas.

Las pruebas agudas de toxicidad se destinan frecuentemente a la obtención de respuestas cuánticas, es decir, el efecto extremo, tal como la conservación o pérdida de la vida. La relación entre la concentración de la sustancia tóxica y el porcentaje de organismos expuestos afectados puede reflejarse en la curva de dosis-respuesta denominada curva de dosis-mortalidad (LaGrega y col, 2003).

En los bioensayos de toxicidad con semillas se evalúan los efectos adversos de los contaminantes en el proceso de germinación y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento. Como respuesta se determina la inhibición en la germinación y de la elongación de la radícula y del hipocotílo. Es importante destacar que durante la germinación y los primeros días de desarrollo ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de un compuesto tóxico puede interferir y alterar la supervivencia y el desarrollo normal de las plántulas. La división celular de los ápices radiculares puede afectarse, retardando el proceso de mitosis o alterando el proceso de alargamiento radicular, por lo que la fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la medición de dichas respuestas (Uribe, 2008).

Algunas plantas son más sensibles que otras a los efectos de los contaminantes. Sin embargo, se sabe que generalmente las comunidades vegetales son afectadas por los

suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Estos compuestos afectan en particular a las raíces y los brotes de plantas jóvenes (Adam y Duncan, 2002).

Para el desarrollo de estas pruebas se han empleado diversas especies, tanto de importancia económica (ornamental o de cultivo), como ecológicas (nativas). Los ensayos de fitotoxicidad han incrementado en los últimos años debido al surgimiento de la fitorremediación como tecnología alternativa, implementada en suelos contaminados mediante el uso de plantas para degradar, retener o estabilizar los contaminantes (Hubálek y col, 2007). La implementación de esta técnica requiere el uso de plantas con capacidad de tolerar niveles relativamente altos de contaminantes, sin presentar efectos tóxicos (OEHHA, 2009), lo que ha obligado el uso de bioensayos de fitotoxicidad que permitan predecir las especies más convenientes en términos de tolerancia para la ejecución de esta tecnología (Guitian, 2011).

2 ANTECEDENTES

Los ensayos de fitotoxicidad no se limitan a pruebas con hidrocarburos. Se han utilizado en pruebas para evaluar la toxicidad de metales pesados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, compost, entre otros, pero independientemente, el protocolo a seguir es el mismo. Ejemplo de ello son los trabajos de:

Tiquia (1996, basada en trabajos de Zucconi, F.M, 1981) quién trabajó usando la fitotoxicidad como criterio para evaluar la calidad del compost que sería utilizado en la agricultura, para disminuir su posible impacto ambiental antes de ser devuelto a la tierra agrícola. Además utilizó el Índice de Germinación (IG) (Tiquia, 2000), que toma en cuenta

el porcentaje de germinación de la semilla y el crecimiento de la radícula para evaluar la toxicidad de la siguiente manera:

$$\%Germinación = \left(\frac{\# \text{ de semillas germinada en el tratamiento}}{\# \text{ de semillas germinadas en el control}} \right) \times 100 \quad (I)$$

$$\% \text{ Elongacion de la radicula} = \left(\frac{\text{promedio elongación en tratamiento}}{\text{promedio elongacion control}} \right) \times 100 \quad (II)$$

$$IG = \frac{(\%Germinación) \times (\% \text{ elongacion de la radicula})}{100} \quad (III)$$

A nivel nacional e internacional, se han desarrollado diversas experiencias en cuanto a toxicidad se refiere. A nivel nacional podemos destacar las siguientes:

Hernández-Valencia y Mager (2003), trabajaron con las gramíneas *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar un suelo contaminado levemente (3%) con un hidrocarburo de petróleo liviano en ensayos de invernadero. En la prueba de fitotoxicidad encontraron que no hubo diferencias significativas entre la cantidad de semillas que germinaron y el tiempo promedio de emergencia de las plántulas en los suelos con adición de hidrocarburos de petróleo respecto al control y sugirieron que la contaminación con hidrocarburos de petróleo a una concentración del 3 % no afectó la capacidad germinativa de las semillas. Sin embargo, una vez germinada, la sobrevivencia de las plántulas es afectada y la producción de biomasa total, aérea y radical disminuye.

Méndez-Natera y col. (2006), tuvieron como objetivo evaluar el efecto de un derrame simulado de petrolero y la aplicación de un remediador sobre la germinación de las semillas y desarrollo de las plántulas de dos cepas de maíz (*Zea mays L.*): grano blanco y grano amarillo, con una concentración de 20 % de petróleo y 5 tratamientos: 1) control: sin petróleo y sin remediador, sólo siembra; 2) aplicación del producto inmediatamente después del petróleo y siembra el mismo día; 3) aplicación del producto inmediatamente después del petróleo, siembra después de 15 días; 4) después de 15 días de haber aplicado petróleo, aplicación del remediador y siembra inmediatamente y 5) después de 15 días de haber aplicado petróleo, aplicación del remediador y siembra después de 15 días. Encontraron que los mayores porcentajes de germinación para ambos tipos de maíces se lograron con la siembra de las semillas 30 días después de la aplicación del petróleo y 15 días después de la aplicación del remediador.

Zamora y García (2011) evaluaron la sensibilidad y potencialidad de las pruebas de fitotoxicidad para determinar la toxicidad de rípios impregnados con fluidos de base aceite mineral sobre los procesos de germinación de semillas y el desarrollo de plántulas, considerando que estas pruebas permiten no solo estimar la tolerancia de las especies evaluadas, sino además establecer en poco tiempo el grado de contaminación de suelos impactados. Los bioensayos se realizaron utilizando semillas comerciales de *Cucumis sativus*, *Lactuca sativa*, y *Medicago sativa*, siguiendo el protocolo recomendado por la Organización para la Cooperación Económica y Desarrollo de la Unión Europea (OECD 2003), para evaluar compuestos químicos. Se establecieron dosis de 0, 12,5; 25; 50; 75 y 100 % de rípio y se evaluó la tasa de germinación, tasa de mortalidad, longitud del

hipocótilo y de la radícula, determinando el índice de germinación y las concentraciones de efecto medias obteniendo que el ripio de perforación impregnado con fluido base aceite, resulto altamente tóxico para los 3 bioindicadores: en dosis de ripio ≥ 25 % (*L. sativa*), ≥ 50 % (*C. sativus*), y ≥ 100 % (*M. sativa*). Mientras las EC_{50} de *L. sativa* y *C. sativus* fueron 17,68 % y 49,79 %, respectivamente, lo que corresponde con altos niveles de toxicidad, en contraste con *M. sativa* que obtuvo una EC_{50} de 89,39 % evidenciando bajos niveles de toxicidad.

En cuanto a las experiencias a nivel internacional, podemos destacar las siguientes:

Henner y col. (2000), estudiaron el efecto de hidrocarburos aromáticos policíclicos, sobre la germinación y crecimiento de varias gramíneas que poblaban una zona de extracción de gas, concluyendo que la germinación y el crecimiento se inhibió por la presencia de sustancias volátiles solubles en agua, hidrocarburos de bajo peso molecular (<3 anillos) tales como: benceno, tolueno, xileno, estireno, naftaleno y otras sustancias. Por otra parte, los hidrocarburos de alto peso molecular (3 ± 5 anillos) no mostraron ninguna fitotoxicidad en las condiciones estudiadas. Estos hallazgos sugieren que una vez que los hidrocarburos aromáticos de bajo peso molecular se eliminan por procesos de volatilización, fotodegradación, biodegradación, erosión, labranza y fertilización, las plantas deben ser capaces de crecer.

Rivera y Trujillo (2004) estudiaron el efecto del petróleo en el suelo sobre la diversidad, cobertura y productividad en una pradera en el sureste de México, evaluando diferentes concentraciones de petróleo nuevo y meteorizado en la germinación, crecimiento,

biomasa aérea, radical y total y número de nódulos con las especies: *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica*, *Cyperus articulatus*, *Cyperus sp.* y *Mimosa pigra*. El ensayo se hizo “*in situ*”, concluyendo que la germinación se asocia positivamente con las mayores concentraciones de petróleo meteorizado, pero se reducen las variables: crecimiento, longitud de la raíz, biomasa y número de nódulos en plántulas. Las especies más sensibles y mejores indicadoras fueron: *E. polystachya* y *B. mutica* en plántulas, y *M. pigra* respectivamente.

Larenas-Parada y De Viana (2005) evaluaron la germinación y la supervivencia de las plántulas de semillas del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (*Asteraceae*) expuestas a hidrocarburos, en pruebas de toxicidad usando concentraciones de aceite usado de automóviles en dosis de 0, 2,75 % y 5,5 % y gasoil 0, 1,96 % y 3,93 %. Determinaron que el gasoil en ambas concentraciones produjo inhibición en todas las variables consideradas. La mayor concentración empleada (3,93%) inhibió completamente la germinación. En cambio, el aceite usado en ambas concentraciones no se diferenció del control y permitió la germinación y supervivencia de las plántulas.

Korade y Fulekar (2009), evaluaron el efecto del antraceno y el pesticida organofosforado Clorpirifos sobre la germinación de las semillas de *Lolium multiflorum* (ryegrass). La germinación de semillas se evaluó en suelos contaminados a concentraciones de 10, 25, 50, 75 y 100 mg/kg, y un control. No encontraron efectos inhibitorios de antraceno en la germinación, en comparación con el control, pero si una reducción significativa y retraso en la germinación de las semillas a mayores concentraciones de chlorpyrifos 75 y 100 mg/kg. Demostraron que la germinación de las semillas disminuye con concentraciones

crecientes de chlorpyrifos en el suelo. Esta especie es capaz de sobrevivir y tolerar estos contaminantes para futuros estudios de fitorremediación.

Ghanem y col. (2010) evaluaron la capacidad para germinar y crecer de semillas de “alfalfa”, “colza” y “ballico perenne” en un suelo seco contaminado con pireno, un hidrocarburo aromático policíclico (PAH) a dos concentraciones: 50 mg/kg y 100 mg/kg. El pireno no inhibió la germinación de las tres especies, incluso a la concentración más alta (100 mg/kg), con porcentajes de germinación de 95, 90 y 86 %, para la alfalfa, colza y ballico respectivamente. Las longitudes de las raíces de las tres plantas fueron afectadas por la presencia de pireno en ambas concentraciones. Basándose en sus resultados, las consideran aptas para ensayos de fitorremediación.

Con base en lo antes expuesto, el presente trabajo, es una contribución para establecer el efecto de la contaminación por petróleo sobre la germinación sobre dos pastos tropicales. Para ello se realizarán pruebas crónicas de toxicidad a corto plazo utilizando la especie *Megathyrsus maximum* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.), dos especies de pastos africanos muy utilizadas en las sabanas venezolanas en el pastoreo del ganado, por lo que son de gran interés comercial.

La actividad pecuaria se encuentra muy extendida en la FPO, lo que hace a los pastizales nativos e introducidos susceptibles a contaminación por hidrocarburos. Adicionalmente, ambas especies tienen potencial para ser utilizadas en procesos de fitorremediación de suelos impactados con hidrocarburos (Hernández-Valencia y Mager 2003) y pueden ser utilizadas para recuperar suelos degradados.

Estas especies serán sometidas a cuatro crudos de diferente gravedad API y a diferentes concentraciones, utilizando semillas comerciales certificadas en condiciones controladas de laboratorio.

3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos tóxicos potenciales de crudos de diferente gravedad API sobre la germinación de las semillas de *Megathyrsus maximum* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.).

3.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Evaluar los efectos tóxicos de crudos de diferente gravedad API, sobre la germinación de semillas, elongación de la radícula y el hipocotílo de los pastos *Megathyrsus maximum* y *Urochloa brizantha*.
- Determinar para cada tipo de crudo, el intervalo de concentraciones en las cuales ocurre germinación.
- Determinar la CE₅₀ para cada tipo de pasto y crudo con la finalidad de establecer relaciones entre los diferentes crudos y el grado de toxicidad en las dos especies.
- Determinar cuál de las 2 especies de pasto es más tolerante a la contaminación con los crudos en evaluación.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 MATERIALES

4.1.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Se utilizarán semillas de dos especies de pastos tropicales de amplio uso en las sabanas venezolanas para pastoreo de bovino, como lo son *Megathyrsus maximum* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.). Las semillas provinieron de la casa comercial Semillas Magna, certificadas con más de 90 % de germinación.

4.1.1.1 Característica de los pastos utilizados

4.1.1.1.1 *Megathyrsus maximum* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs)

4.1.1.1.1.1 Taxonomía

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Panicoideae

Tribu: Paniceae

Género: *Megathyrsus*

Especie: *M. maximum* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs)

4.1.1.1.1.2 Descripción

Gramínea perenne, rizomatoza que crece de manera natural en los pastizales abiertos, generalmente debajo o cerca de los árboles y arbustos, a lo largo de riberas de los ríos.

Puede soportar incendios y sequía. La especie tiene una amplia variabilidad morfológica y agronómica, que varía en alturas desde 0,5 a 3,5 m.

4.1.1.1.2 *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.)

4.1.1.1.2.1 Taxonomía

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Subclase: Commelinidae

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Urochloa* P. Beauv.

Especie: *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R. Webster

4.1.1.1.2.2 Descripción

Gramínea perenne con rizomas cortos y erectos, tallos de 60-150 cm de alto (en ocasiones a 200 cm). Hojas verde plana, brillantes, hasta 20 mm de ancho y largo de hasta 100 cm.

4.1.2 SUELO

Se utilizó un suelo proveniente de la población de El Sombrero, estado Guárico, específicamente el horizonte A de un Typic haplustox.

4.1.3 CRUDOS DE PETRÓLEO

Se utilizaron 4 tipos de crudos, estos fueron:

- Crudo Extrapesado (9,3 ° API)
- Crudo Pesado (12,1 ° API)
- Crudo Mediano (27,2 ° API)
- Crudo Liviano (30 ° API)

4.2 METODOLOGÍA

4.2.1 CARACTERIZACIÓN DEL SUELO

Las muestras de suelo se analizaron por triplicado para obtener información acerca de sus características físicas y químicas utilizando la metodología descrita por Anderson e Ingram (1992). Los análisis que se realizarán fueron los siguientes:

4.2.1.1 Análisis físico de las muestras de suelo

4.2.1.1.1 Textura:

Para estimar el contenido de arenas, limos y arcillas se realizó un análisis mecánico de Bouyoucos a las muestras de suelo.

4.2.1.1.2 Capacidad de campo:

Se determinó a través de la diferencia de peso entre una muestra de suelo seca y una saturada con agua.

4.2.1.2 *Análisis químico de las muestras de suelo*

4.2.1.2.1 Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (%S.B) y bases intercambiables

Se utilizó el método de extracción con acetato 1M a pH 7,0. El contenido de aluminio intercambiable se determinó por titulación con una solución de hidróxido de sodio 0,1 M, previa lixiviación del aluminio de la muestra con cloruro de potasio 1 M. La determinación de bases intercambiables se realizó mediante espectrofotometría de absorción atómica.

4.2.1.2.2 Fósforo disponible

Se mantuvo en agitación durante 16 horas 3 g del suelo con una solución extractora de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0,5 M a pH 8,5. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas y filtradas para tomar una alícuota de la solución extractora y determinar el P disponible a través del método de vanadato-molibdato.

4.2.1.2.3 Nitrógeno total

Las muestras de suelo fueron digeridas en una mezcla de ácido sulfúrico-peróxido de hidrógeno. Seguidamente se destiló y tituló con HCL 0,01 N, según la técnica de oxidación de Kjeldahl.

4.2.1.2.4 pH

En una suspensión de 1:5 suelo: agua y utilizando un electrodo de vidrio se determinó el pH de las muestras de suelo.

4.2.1.2.5 Contenido de materia orgánica

Se realizó a través de una digestión húmeda con dicromato de potasio. La absorbancia del extracto obtenido se midió a una longitud de onda de 650 nm, mientras que la curva patrón se realizó con patrones con concentraciones de carbono conocidas, a partir de una solución de sacarosa.

4.2.2 EFECTO DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO SOBRE LA GERMINACIÓN:

Para cada especie, se evaluó el efecto que tiene sobre su germinación su exposición a suelos contaminados con los diferentes tipos de crudos mediante bioensayos de toxicidad aguda crónica.

La mezcla suelo-crudo se realizó de manera homogénea para cada concentración. Cada especie fue expuesta a 6 concentraciones diferentes de crudo liviano, mediano, pesado y extrapesado para un total de 24 tratamientos. Estas concentraciones se establecieron mediante pruebas preliminares en las cuales se sometió a las especies a concentraciones desde 1% hasta alcanzar la concentración en la que no se registró de ninguna de las semillas, y a partir de esta se definieron las demás concentraciones de acuerdo a una escala de decrementos logarítmicos.

Dichos tratamientos se evaluaron por quintuplicado y se utilizaron 30 semillas en cada una de las réplicas.

Los tratamientos evaluados se resumen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Tratamientos

		HIDROCARBURO								
CONCENTRACIÓN	ESPECIES	EXTRAPESADO	PESADO		MEDIANO		LIVIANO			
Control	<i>Sp. 1</i>	0%	5 replicas							
	<i>Sp. 2</i>		5 Replicas							
C1	<i>Sp. 1</i>	0,9%	5 replicas	0,63%	5 replicas	0,12%	5 replicas	0,09%	5 replicas	
	<i>Sp. 2</i>		5 replicas		5 replicas		5 replicas		5 replicas	
C2	<i>Sp. 1</i>	2,7%	5 replicas	1,89%	5 replicas	0,36%	5 replicas	0,27%	5 replicas	
	<i>Sp. 2</i>		5 replicas		5 replicas		5 replicas		5 replicas	
C3	<i>Sp. 1</i>	9%	5 replicas	6,3%	5 replicas	1,2%	5 replicas	0,9%	5 replicas	
	<i>Sp. 2</i>		5 replicas		5 replicas		5 replicas		5 replicas	
C4	<i>Sp. 1</i>	27%	5 replicas	18,9%	5 replicas	3,6%	5 replicas	2,7%	5 replicas	
	<i>Sp. 2</i>		5 replicas		5 replicas		5 replicas		5 replicas	
C5	<i>Sp. 1</i>	90%	5 replicas	63%	5 replicas	12%	5 replicas	9%	5 replicas	
	<i>Sp. 2</i>		5 replicas		5 replicas		5 replicas		5 replicas	
	<i>Sub-total</i>		50 ensayos		50 ensayos		50 ensayos		50 ensayos	
	<i>TOTAL</i>		210 ensayos							

C: concentración

T: tratamiento

Cada ensayo se llevó a cabo en una cápsula de Petri, con dimensiones de 90 mm de diámetro y 15 mm de alto. En cada cápsula se agregó la mezcla hidrocarburo-suelo (30g) y 7 ml de agua destilada. Cuidadosamente con el uso de pinzas se colocaron las 30 semillas directamente sobre los suelos contaminados dejando espacio suficiente entre ellas para no obstruir la elongación de las raíces (**Figura 1**). El tiempo de incubación se determinó previamente mediante pruebas de estandarización, en condiciones normales, a una temperatura de 25 °C (298 K) y en oscuridad. Esta prueba consistió en sembrar 30 semillas de cada especie en suelo no contaminado por quintuplicado, y día a día, contar el número de semillas germinadas, hasta que dicho numero fuera constante, lo que indicaba que sería el tiempo necesario para llevar a cabo el experimento (**Figura 2**).



Figura 1. Disposición de semillas en la cápsula de Petri

Dichas pruebas, indicaron que el tiempo ideal para llevar a cabo las pruebas es de 8 días o 192 horas para las dos especies seleccionadas.

4.2.3 EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS

Luego de terminado el período de exposición a los suelos contaminados se procedió a cuantificar el efecto en la germinación y en la elongación de la radícula y el hipocotilo.

4.2.3.1 Efecto de la germinación

Se registró el número de semillas que germinaron normalmente, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula. (≥ 1 mm)

El porcentaje de germinación se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% G = \left(\frac{PG}{PT} \right) \times 100 \quad (IV)$$

Donde % G es el porcentaje de germinación, PG es el número de plantas germinadas y PT es el número total de plantas evaluadas (Zamora y García, 2011).

4.2.3.2 Efecto sobre la elongación de la radícula e hipocotílo

Usando un papel milimetrado, se midió longitud de la radícula y del hipocotílo de cada una de las plántulas correspondientes a cada concentración de crudo y a los controles.

4.2.3.3 Índice de germinación (IG)

Se utilizó el índice de germinación propuesto por Tiquia y col. (2000), ya que permite evaluar de manera integral la toxicidad que afecta el crecimiento de la raíz y la toxicidad que afecta la germinación de la semilla, mediante la siguiente ecuación:

$$IG = \left(\frac{GXL}{Gc \times Lc} \right) \times 100 \text{ (v)}$$

IG= Índice de germinación (%)

G= Promedio de semillas germinadas en la muestra.

Gc= Promedio de semillas germinadas en el control (suelo limpio sin petróleo).

L= Promedio de longitud de la radícula en la muestra (mm)

Lc= Promedio de longitud de la radícula en el control (mm)

Dicho índice varía desde 0% y puede superar el 100%.

Los resultados obtenidos fueron comparados con los criterios de interpretación de los IG propuestos por Zamora y García (2011):

- **IG ≥ 80%** indicaría ausencia de las sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración
- **IG > 50% Y <80%** indicaría presencia moderada de dichas sustancias

- **IG ≤ 50%** indicaría una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas.

4.2.3.4 DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RETENCIÓN DE PETRÓLEO EN EL SUELO

Determinamos la capacidad de retención de petróleo en el suelo, según la capacidad de detención de agua, para ello utilizamos como referencia la densidad del petróleo. De la siguiente manera:

1. Se determinó la capacidad de retención de agua en el suelo,
2. Una vez obtenida la capacidad de campo del suelo, se determinó la cantidad de crudo que se debía agregar al suelo para obtener la máxima retención de este en el suelo, utilizando la densidad. Por ejemplo:

Para un crudo liviano:

Capacidad de campo (agua) = 11,19 ml Densidad del crudo liviano (30 ° API) = 0,87 g/ml

$$\rho = \frac{m}{v} \text{ (VI)}$$

$$m = \rho \times v \text{ (VII)}$$

$$m = 0,87 \frac{g}{ml} \times 11,19 \text{ ml} \quad m = 9,73 \text{ g}$$

Siendo **9,73 g** de crudo liviano, necesarios para lograr la máxima capacidad de retención.

3- Se comparó la máxima retención de cada tipo de petróleo en el suelo con los CE₅₀ obtenidos anteriormente y la concentración en la que ocurre en ausencia de germinación de las semillas.

4.2.3.5 Expresión de resultados

Se elaboró una gráfica concentración-germinación (dosis-respuesta) colocando en la ordenada el porcentaje de germinación y en la abscisa la concentración.

4.2.3.6 Análisis estadístico

Se calcularon los porcentajes de germinación, longitud de las radículas e hipocotílos de las plántulas y los índices de germinación (IG) expresados en promedios y desviaciones estándar. Las concentraciones efecto medias (CE_{50}) se calcularon con ayuda del programa Trimmed Spearman-Kärber (TSK), versión 1.5 de uso frecuente por la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos de Norteamérica (USEPA).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISIS DE LAS PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS DEL SUELO UTILIZADO EN LOS ENSAYOS

La capacidad del suelo de adsorber y almacenar los compuestos presentes está directamente asociada a la textura del suelo (Cunningham y Ow, 1996; Deuel y Holiday, 1997). La proporción de las diferentes fracciones minerales del suelo (arena, limo y arcilla) puede influir sobre la permanencia y forma de acumulación y establecimiento del crudo en la mezcla suelo-hidrocarburo. Los sustratos arenosos permiten una mayor penetración del hidrocarburo en un menor tiempo (Deuel y Holliday, 1997; Pezeshki y col. 2000), pero aún cuando aumentan rápidamente el radio de contaminación, también incrementan la disponibilidad del contaminante para los microorganismos degradadores (Cauwenberghe y Roote, 1998; Frick y col. 1999).

Al ser un suelo franco arenoso, este tipo de suelo es apto para una gran variedad de cultivos. Los suelos franco-arenosos, que no solamente contienen altos porcentajes de arena sino también de limo, ayudan a limitar la propagación del compuesto contaminante (Deuel y Holliday, 1997). Por otra parte, la capacidad de retención de agua o capacidad de campo fue 37,3 %, considerada como moderada a alta, permitiendo una disponibilidad de agua y oxígeno suficiente para el establecimiento de plantas y la supervivencia de microorganismos.

Tabla 3. Proporción de las fracciones minerales del suelo

Fracciones	%
Arena	74
Arcilla	5,2
Limo	20,8

El análisis químico del suelo, los cuales evidencian la poca fertilidad del suelo, debido a la baja concentración de N, P, materia orgánica, bases cambiabiles y capacidad de intercambio catiónico. Además, el pH obtenido (4,9) muestra la condición ácida característica de los suelos de sabana con bajo contenido de nutrientes, lo que afecta el crecimiento de las plantas y la actividad biológica (Cauwenberghe y Roote, 1998).

Tabla 4. Características físicas y químicas del suelo utilizado para los ensayos

Parámetro	Valor
Capacidad de campo (%)	37,3
C.I.C.E (cmoles/kg)	1,53
Porcentaje de Saturación de Bases	29,4
Σ Bases intercambiables (cmoles/kg)	0,45
Acidez intercambiable (cmoles/kg)	0,59
Ca intercambiable (cmoles/kg)	0,19
Mg intercambiable (cmoles/kg)	0,16
K intercambiable (cmoles/kg)	0,1
P disponible (mg/kg)	15
N total (mg/kg)	590
% M.O	1,65
pH	4,9

5.2 PRUEBA DE ESTANDARIZACIÓN

Las pruebas de estandarización se hicieron con el fin establecer el tiempo mínimo requerido para la germinación de las semillas viables. La **Figura 2** muestra el número de semillas que germinaron (acumulativo) durante los 15 días de ensayos, y se puede observar que a partir de los 7 - 8 días las curvas para ambas especies se estabilizan. Por esta razón se tomaron 8 días como período para las evaluaciones toxicológicas.

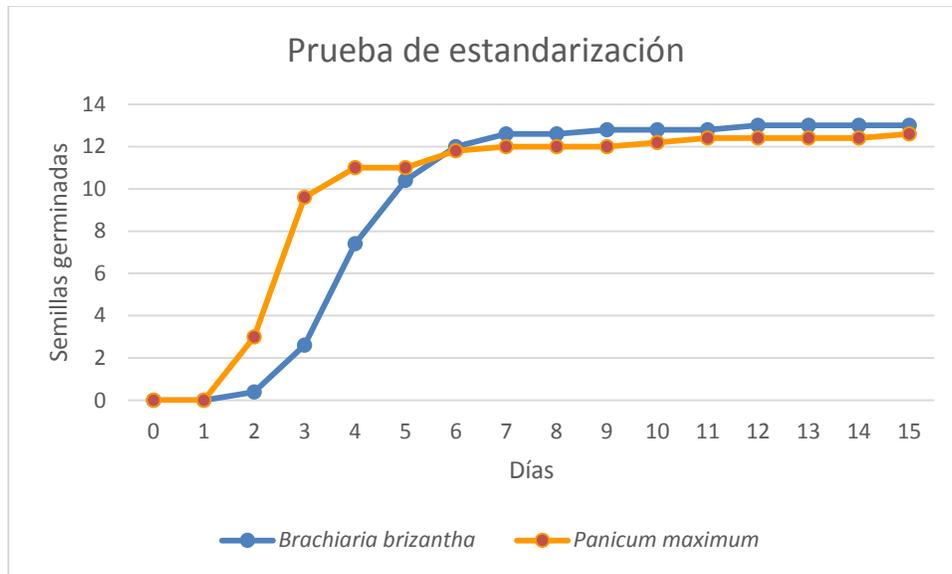


Figura 2. Tiempo de germinación de semillas de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* en suelo sin contaminar

5.3 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PETROLEO EN EL SUELO SOBRE LA GERMINACIÓN:

5.3.1 EFECTO SOBRE LA GERMINACIÓN

El análisis de varianza evidencia un efecto significativo de los hidrocarburos sobre la germinación de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* (**Tabla 5**), cuyos efectos podemos apreciar en la **Figura 3** donde a medida que se aumenta la concentración de los crudos contaminantes afecta el porcentaje en la germinación de ambas especies de forma negativa.

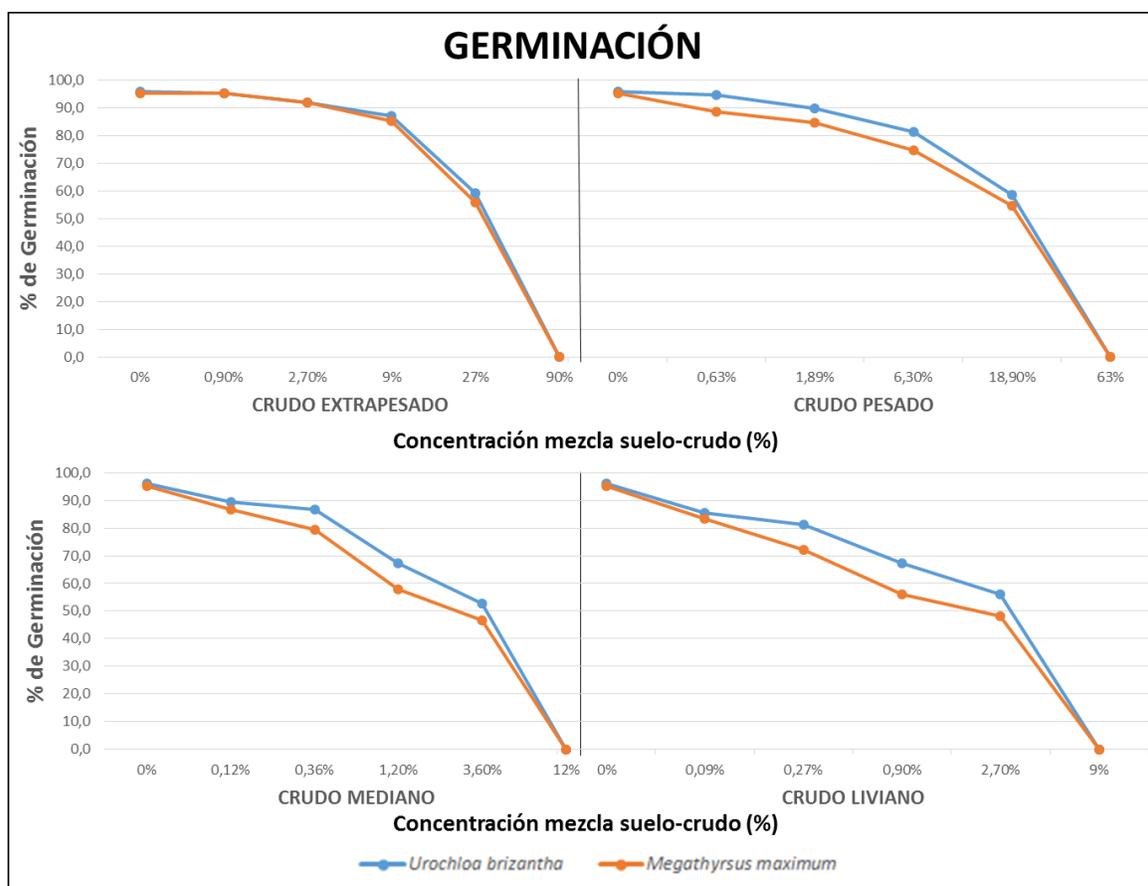


Figura 3. Porcentaje de germinación (%) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas

En cuanto a la sensibilidad de las especies, la prueba de comparación de medias (**Tabla 5**) indica que para una misma concentración no existen diferencias significativas en la germinación de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* para cada tipo de hidrocarburo, lo que indicaría que ambas especies presentan una sensibilidad similar ante los crudos evaluados. Un detalle importante a destacar es que bajo la condición control (0%), la germinación de las semillas fue mayor a 90%, lo que es un indicativo de la buena calidad del material utilizado.

Tabla 5. Germinación de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum*

	CONCENTRACIÓN MEZCLA CRUDO-SUELO					
Crudo extrapesado	0%	0,90%	2,70%	9%	27%	90%
<i>Urochloa brizantha</i>	29 a A	29 a A	28 a b A	26 b A	18 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	29 a A	29 a A	28 a b A	26 b A	17 c A	0 d A
Crudo pesado	0%	0,63%	1,89%	6,30%	18,90%	63%
<i>Urochloa brizantha</i>	29 a A	28 a A	27 a b A	24 b A	18 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	29 a A	27 a A	25 b A	22 b A	16 c A	0 d A
Crudo mediano	0%	0,12%	0,36%	1,20%	3,60%	12%
<i>Urochloa brizantha</i>	29 a A	27 a A	26 b A	20 c A	16 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	29 a A	26 a A	24 b A	17 b A	14 b A	0 c A
Crudo liviano	0%	0,09%	0,27%	0,90%	2,70%	9%
<i>Urochloa brizantha</i>	29 a A	26 a A	24 a b A	20 c A	17 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	29 a A	25 a A	22 b A	17 b c A	14 c A	0 d A

Letras minúsculas similares indican que no hay diferencias significativas para diferentes concentraciones de petróleo dentro de una misma especie

Letras mayúsculas similares indican que no hay diferencias entre ambas especies para una misma concentración

ANOVA de dos vías ($p \leq 0,05$)

Los intervalos de germinación para cada crudo se muestran en **Tabla 5**. Se observa claramente que con la disminución de la densidad API, es más amplio el intervalo de germinación de las especies estudiadas, y consecuentemente también es mayor la tolerancia concentraciones más elevadas de petróleo en el suelo.

Tabla 6. Intervalos de germinación para las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximum* expuestas a diferentes tipos de crudos

	Crudo Liviano	Crudo Mediano	Crudo Pesado	Crudo Extrapesado
Intervalo de concentración donde ocurre la germinación	0% - 9%	0% - 12%	0% - 63%	0% - 90%

5.3.2 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PETRÓLEO EN EL SUELO SOBRE LA ELONGACIÓN DE LA RADÍCULA E HIPOCOTÍLO

Es importante evaluar diferentes parámetros de los efectos fitotóxico sobre el desarrollo de una planta, como el crecimiento de la radícula e hipocotílo. Para valorar y determinar los factores de riesgo asociados a su exposición, así como el grado de tolerancia o sensibilidad de la planta examinada. Considerar únicamente la mortalidad como criterio del efecto, brinda una información parcial de las consecuencias del contaminante sobre la planta evaluada.

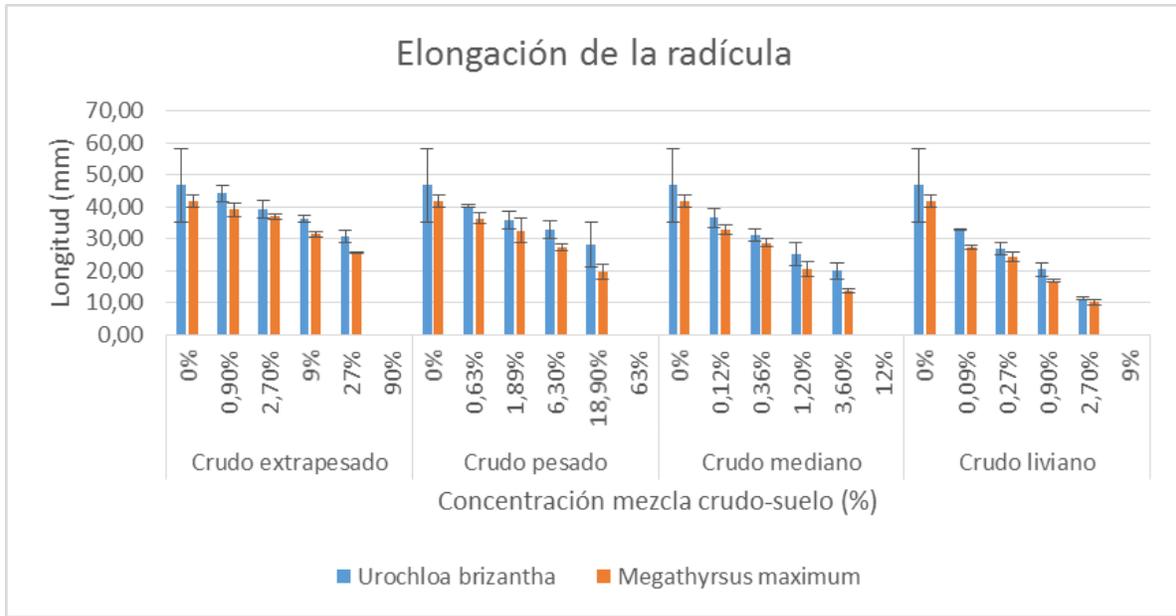


Figura 4. Elongación de la radícula (mm) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas

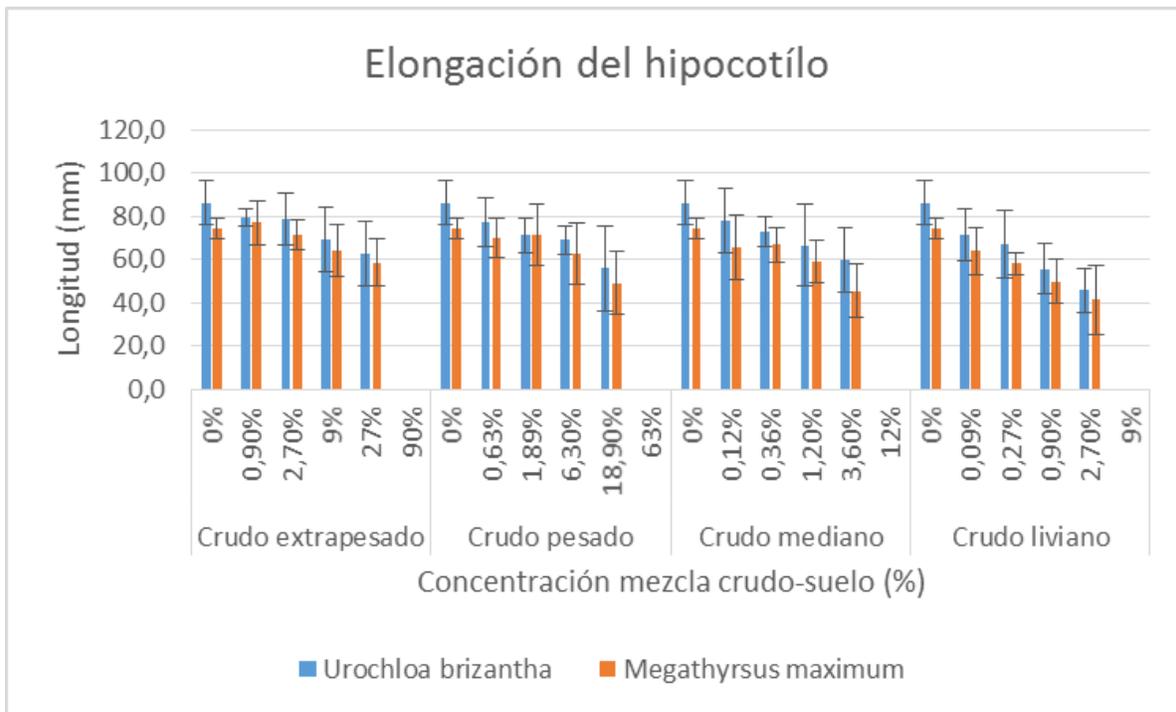


FIGURA 5. Elongación del hipocotilo (mm) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

La elongación de la radícula y el hipocotilo de ambas especies se ven claramente afectadas por el incremento en la concentración de los crudos (**figuras 4 y 5**). Los análisis de varianza corroboran estos resultados (**tablas 7 y 8**). En cuanto a la elongación de la radícula (**Figura 4**) el crudo liviano generó los efectos más adversos, teniendo como consecuencia una disminución de más de un 50 % para una concentración de 0,9 % de mezcla suelo-crudo, el mismo crudo generó el mayor efecto negativo en la elongación del hipocotilo (**Figura 5**) a una concentración de 2,7 % donde se observa una disminución de casi el 50 % en ambas especies.

Tabla 7. Elongación de radícula (mm) en *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum*

	CONCENTRACIÓN MEZCLA CRUDO-SUELO					
Crudo extrapesado	0%	0,90%	2,70%	9%	27%	90%
<i>Urochloa brizantha</i>	46,8 a A	44,2 a A	39,3 b A	36,3 b A	30,7 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	41,6 a A	39,1 a A	36,9 b A	31,5 b A	25,5 c A	0 d A
Crudo pesado	0%	0,63%	1,89%	6,30%	18,90%	63%
<i>Urochloa brizantha</i>	46,8 a A	40,3 a b A	35,9 b A	32,8 b c A	28,1 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	41,6 a A	36,5 a b A	32,5 b A	27,3 b A	19,6 c A	0 d A
Crudo mediano	0%	0,12%	0,36%	1,20%	3,60%	12%
<i>Urochloa brizantha</i>	46,8 a A	36,5 b A	31,3 b A	25,2 c A	20 d A	0 e A
<i>Megathyrsus maximum</i>	41,6 a A	32,8 b A	28,8 b A	20,4 c A	13,7 d A	0 e A
Crudo liviano	0%	0,09%	0,27%	0,90%	2,70%	9%
<i>Urochloa brizantha</i>	46,8 a A	33 b A	26,9 c A	20,4 c A	11,4 d A	0 e A
<i>Megathyrsus maximum</i>	41,6 a A	27,3 b A	24,3 b A	16,8 c A	10,1 d A	0 e A

Letras minúsculas similares indican que no hay diferencias significativas para diferentes concentraciones de petróleo dentro de una misma especie

Letras mayúsculas similares indican que no hay diferencias entre ambas especies para una misma concentración

ANOVA de dos vías ($p \leq 0,05$)

El crudo extrapesado generó el menor efecto nocivo sobre *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* en donde la máxima reducción obtenida para la elongación de la radícula e hipocotilo fue de alrededor de un 30 - 40%. Para una misma concentración no hubo diferencia significativa en la manera en que los crudos afectaron a ambas especies según la prueba de comparación de medias, por lo tanto, al igual que la germinación, ambas especies resultaron igual de sensibles ante la contaminación por crudos.

Tabla 8. Elongación del hipocotilo (mm) en *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum*

	CONCENTRACIÓN MEZCLA CRUDO-SUELO					
Crudo extrapesado	0%	0,90%	2,70%	9%	27%	90%
<i>Urochloa brizantha</i>	86,4 a A	79,4 a A	79 a A	69,4 b A	62,7 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	74,5 a A	77,1 a A	71,4 a A	64,3 b A	58,6 c A	0 d A
Crudo pesado	0%	0,63%	1,89%	6,30%	18,90%	63%
<i>Urochloa brizantha</i>	86,4 a A	77,2 b A	71,5 c A	69 c A	56 d A	0 e A
<i>Megathyrsus maximum</i>	74,5 a A	69,9 a A	71,4 a A	62,7 b A	49,2 c A	0 d A
Crudo mediano	0%	0,12%	0,36%	1,20%	3,60%	12%
<i>Urochloa brizantha</i>	86,4 a A	78,3 a A	73 b A	66,5 c A	60 c A	0 d A
<i>Megathyrsus maximum</i>	74,5 a A	65,8 b A	66,8 b A	59,2 c A	42,6 d A	0 e A
Crudo liviano	0%	0,09%	0,27%	0,90%	2,70%	9%
<i>Urochloa brizantha</i>	86,4 a A	71,5 b A	67 b A	55,5 c A	45,7 d A	0 e A
<i>Megathyrsus maximum</i>	74,5 a A	64,1 b A	58,1 b A	49,9 c A	41,4 d A	0 e A

Letras minúsculas similares indican que no hay diferencias significativas para diferentes concentraciones de petróleo dentro de una misma especie

Letras mayúsculas similares indican que no hay diferencias entre ambas especies para una misma concentración

ANOVA de dos vías ($p \leq 0,05$)

5.3.3 EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PETRÓLEO EN EL SUELO SOBRE EL ÍNDICE DE GERMINACIÓN (IG)

El índice de germinación, es una manera eficiente de integrar diferentes parámetros como el número de semillas germinadas y la elongación de la radícula e hipocotilo, que nos permite predecir la capacidad germinativa y posibilidad de establecimiento de las futuras plantas.

Para el mismo crudo y concentración el índice de germinación fue similar para ambas especies en todos los tratamientos evaluados (**Figura 6**). Para el crudo extrapesado, observamos que a concentraciones de 0,9 % y 2,7 % existe ausencia o muy baja concentración de sustancias fitotóxicas, a 9 % su presencia es moderada, a concentraciones mayores como 27 % hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas, siendo 90 % la concentración de mayor presencia de estas sustancias, arrojando un IG de 0 %.

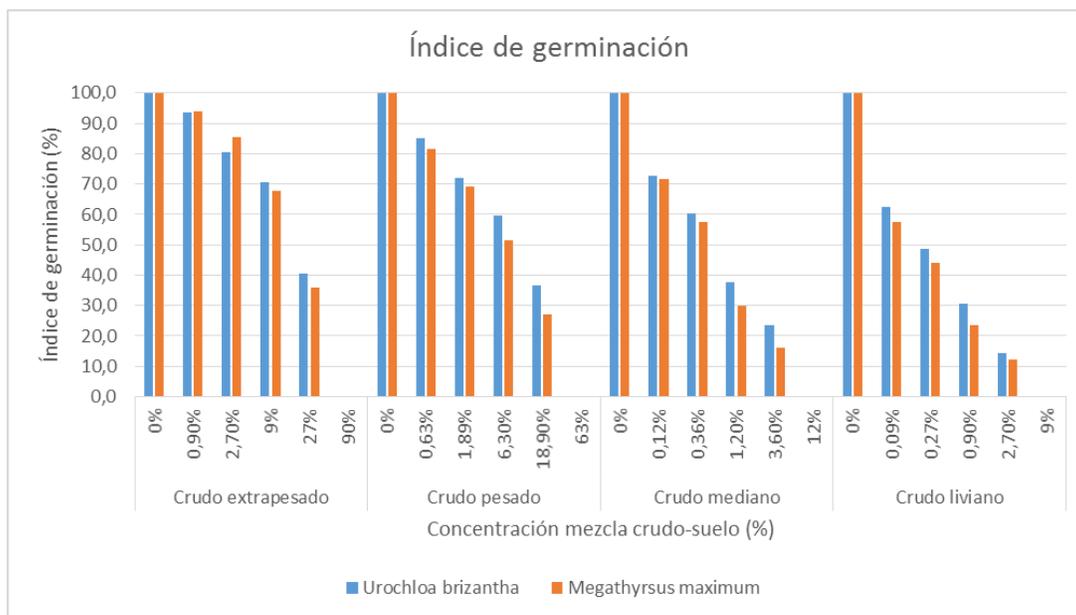


FIGURA 6. Índice de germinación (IG) de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* expuestas a diferentes dosis de crudos durante 192 horas.

En el crudo pesado, observamos que a una concentración de 0,63 % la presencia de sustancias fitotóxicas es baja, a partir de 1,89 % este crudo su presencia es moderada siendo 63 % la concentración en la que existe una gran presencia de estas sustancias, según su IG.

Los resultados de IG para los crudos medianos y livianos, nos indica que concentraciones muy bajas la presencia de sustancias fitotóxicas es moderada o alta para las especies estudiadas. Las concentraciones con mayor presencia de fitotóxicos para dichos crudos fueron de 12 % y 9 % respectivamente, lo que demuestra la alta peligrosidad de ambos cuando se compara con el crudo extrapesado y pesado. Siendo el crudo liviano el más peligroso de los crudos utilizados.

5.3.4 CONCENTRACIÓN EFECTO MEDIO (CE₅₀)

La concentración efecto medio (CE₅₀) estima la concentración del contaminante que produce la respuesta esperada sobre el 50 % de los organismos expuestos, estimada a través del programa Trimmed Spearman-Kärber (TSK).

La **Tabla 10**, propone una escala de toxicidad ascendente en relación al CE₅₀, y en base a los resultados obtenidos (**Tabla 9**), tenemos que todos los crudos utilizados son extremadamente tóxicos, a excepción del crudo extrapesado que resultó ser el crudo menos tóxico, pero que de igual manera presenta una alta toxicidad.

Tabla 9. Valores CE₅₀ obtenidos para las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximum* expuestas a diferentes tipos de crudos

Crudo	Bioindicador	EC ₅₀	IC 95%	Condición (tabla 7)
Crudo	<i>Urochloa brizantha</i>	27,18	21,11-34,99	(D)
Extrapesado	<i>Megathyrus maximum</i>	26,12	20,23-33,71	(D)
Crudo	<i>Urochloa brizantha</i>	17,82	13,17-24,12	(E)
Pesado	<i>Megathyrus maximum</i>	14,44	10,03-20,8	(E)
Crudo	<i>Urochloa brizantha</i>	2,63	1,82-3,79	(E)
Mediano	<i>Megathyrus maximum</i>	1,95	1,28-2,99	(E)
Crudo	<i>Urochloa brizantha</i>	1,97	1,3-2,99	(E)
Liviano	<i>Megathyrus maximum</i>	1,36	0,84-2,20	(E)

Tabla 10. Escala ascendente de toxicidad para la comparación de resultados en la evaluación de la toxicidad

Valor de CE ₅₀	CONDICIÓN	
< 25	Extremadamente toxico	(E)
25-50	Altamente tóxico	(D)
50-75	Moderadamente tóxico	(C)
75-100	Ligeramente tóxico	(B)
>100	No tóxico	(A)

Fuente: Zamora y García, 2011

5.3.5 RELACIÓN ENTRE LA CAPACIDAD DE ALMACENAMIENTO DE PETRÓLEO EN EL SUELO Y LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

La **Tabla 11** muestra la cantidad máxima de los diferentes tipos de crudo que el suelo es capaz de retener. La **Figura 7** nos muestra el CE₅₀, el máximo de retención de crudo en el suelo y la concentración a la cual el 100% de las semillas no germinan. Todos los CE₅₀ obtenidos son menores a la capacidad de retención de crudo en el suelo. Para el caso del

crudo liviano y mediano la ausencia de germinación es menor a la capacidad de retención. En el caso del crudo pesado y extrapesado la cantidad de crudo necesaria para obtener ausencia de germinación es mucho mayor a la capacidad de retención del suelo, lo que indica que en la práctica, cuando los suelos están saturados con estos tipos de petróleo, hay una fracción de semillas de los pastos evaluados que germinarán.

Tabla 11. Capacidad de retención petróleo denle el suelo (g)

Crudo	Capacidad de retención (g)
Extrapesado	11,19
Pesado	10,96
Mediano	9,8
Liviano	9,73

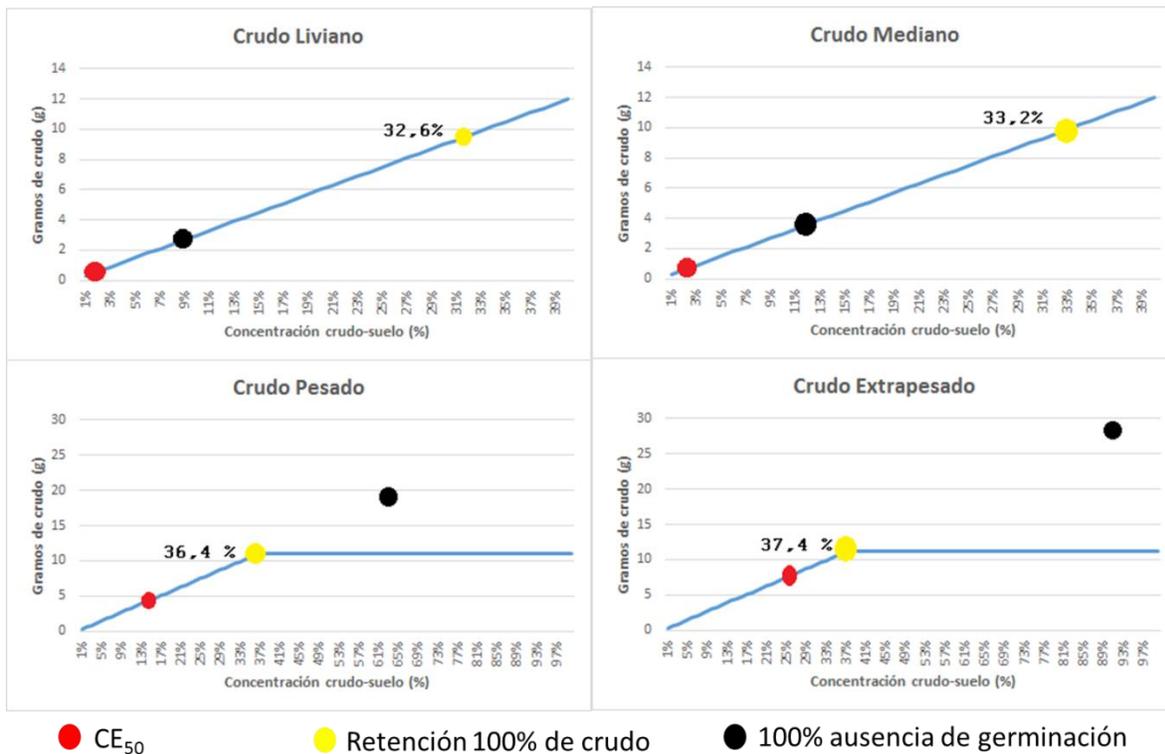


Figura 7. Relación entre la retención de 100 % de crudo, 100 % ausencia de germinación y CE₅₀ de los crudos liviano, mediano, pesado y extrapesado para *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximum*

6 DISCUSIÓN

La contaminación por hidrocarburos del petróleo puede afectar a las plantas al retardar la germinación de semillas y la reducción de la longitud de la planta, densidad de tallos, tasa fotosintética y la biomasa, o puede resultar en la mortalidad total. La intensidad de los daños depende de un número de factores bióticos y abióticos, incluyendo el tipo y la cantidad de crudo, la especie y el alcance de la cobertura, las condiciones climáticas imperantes y la composición del suelo (Lin y col, 2002).

Los resultados muestran claramente que la contaminación por crudos afecta la germinación y específicamente el desarrollo de la radícula y el hipocotilo de las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum*. El efecto observado de toxicidad en suelos contaminados con crudos podría no ser sólo debido a la concentración de contaminantes, sino también debido al tipo de suelo y las propiedades, tipo de hidrocarburo, composición de la comunidad microbiana y las especies de plantas (Salanitro, 1997).

Los resultados arrojaron que a medida que la gravedad del crudo aumenta, y se aumentan los niveles de contaminación, se ve afectada la germinación y el crecimiento de la radícula e hipocotilo, es decir, que el crudo puede afectar la fisiología y bioquímica de la germinación de la semilla. Los crudos reducen la actividad de las enzimas que degradan el almidón: amilasa y fosforilasa. Dichas enzimas son necesarias para la degradación de los polisacáridos de las semillas, lo que además afecta la división celular. Por lo tanto, la inhibición de la fosforilasa podría perturbar las actividades respiratorias en la germinación de las semillas (Achuba, 2006). La germinación de la semilla puede ser inhibida ante la

presencia de sustancias tóxicas, específicamente se puede afectar la división celular, ya sea por retardo en el desarrollo de mitosis o alteración del proceso de alargamiento de las estructuras germinativas (Adam y Duncan, 2002). Si el crudo logra penetrar el tejido de las plantas, puede dañar la membrana de las células causando pérdida del contenido celular, bloqueo de los espacios intercelulares y reducción del transporte de metabolitos, así como de las tasas de respiración y fotosíntesis (Pezeshki y col., 2000).

Físicamente el petróleo puede adherirse a la superficie de raíces y semillas, reduce la capacidad para absorber agua y oxígeno (Mathew y col. 2006). El efecto también puede ocurrir como resultado de la formación de compuestos polares disueltos en agua que podrían penetrar en la cubierta de la semilla, ejerciendo la narcosis polar (Wang y col., 2001; Adam y Duncan, 2002). La reducción en la longitud de la radícula fue una respuesta de las especies a la exposición a sustancias químicas. La inhibición de crecimiento de la planta puede ser causada por compuestos tóxicos de hidrocarburos de petróleo (Bossert y Bartha, 1985) , tales como pequeñas moléculas como compuestos aromáticos, que pueden entrar y pasar las membranas celulares que conducen a una integridad de la membrana reducida o a la muerte de la célula (Baker, 1970; Reis, 1996) Esta disminución es probablemente el resultado de la reducción en la absorción de nutrientes y agua, lo que afecta el desarrollo del sistema debido a que la absorción de tales es esencial para el crecimiento de la planta (Adenipekun y col., 2009).

La fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la evaluación de la germinación de semillas (Adam y Duncan, 2002). Estas pruebas han sido diseñadas por organismos de protección ambiental tales como OECD (1984) y USEPA (1989), los cuales

consideran como criterio diagnóstico la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas. Su uso ha resultado pertinente para determinar el efecto y la tolerancia de un contaminante particular sobre una especie de interés (Guitian, 2011).

Según su CE_{50} , el crudo más tóxico fue el liviano. Los crudos livianos contienen componentes volátiles capaces de entrar fácilmente a través de las paredes celulares de las plantas. Estas pequeñas moléculas de hidrocarburos que penetran en las plantas pueden ser fitotóxicas, explicando el retraso y la disminución de la germinación de la semilla (Adam y Duncan, 2002). Los hidrocarburos están formados por una numerosa mezcla de compuestos los cuales difieren en solubilidad, resultando importante considerar el acuerdo general que existe en la literatura acerca de la mayor toxicidad que poseen los productos refinados de los hidrocarburos sobre los crudos (Anderson y col., 1974). Según Figueruelo y Marino (2001), los hidrocarburos aromáticos, concretamente el benceno y tolueno, son los más tóxicos después los cicloalcanos y olefinas, siendo los alcanos los de menor toxicidad y dentro de estos, los de menor tamaño molecular los más tóxicos (Montes, 2008).

La toxicidad de los hidrocarburos procede de su incorporación (disolución) a la parte lipídica de las membranas celulares, afectando el mecanismo de intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de la célula. En condiciones extremas puede disolver y producir lisis de la membrana celular (Figueruelo y Marino 2001).

El efecto tóxico de los hidrocarburos, se encuentra en función a su densidad ($^{\circ}$ API), presencia de algunos compuestos aromáticos cíclicos enlazados con las cadenas

hidrocarbonadas, como también de productos adicionales agregados o formados en el proceso de refinación que conducirá a su toxicidad (Montes, 2008). Los hidrocarburos de petróleo con baja gravedad API contienen, en mayor proporción, compuestos de alto peso molecular como las resinas y asfaltenos que resultan menos tóxicos.

La legislación venezolana establece en el Decreto 2.635 (República de Venezuela 1998): a) Para que en un suelo contaminado se pueda aplicar el biotratamiento, el contenido de hidrocarburos biodegradables (saturados y aromáticos) no debe exceder el 10 % (Artículo 53) y b) la meta de limpieza de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en el suelo se alcanzará cuando el contenido de aceites y grasas sea menor al 1 % (Artículo 50).

Los resultados de CE_{50} obtenidos y el intervalo de contaminación permitido por la legislación venezolana, indican que *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* pueden ser seleccionadas como especies con potencial uso en procesos de fitorremediación. Especialmente en crudos pesados y extrapesados cuyos CE_{50} son mayores al 10 % de contaminación. El problema con estos crudos cuya gravedad API es baja, es que contienen en mayor proporción compuestos polares (resinas y asfaltenos) en comparación con los aromáticos de menor peso molecular y menor resistencia a la biodegradación (McMillen y col, 2004; Infante y col., 2010). Los saturados y aromáticos son considerados como las fracciones más lábiles del crudo y por lo tanto más biodegradables (Atlas y Bartha, 1998; Simonich y Hites, 1994). Adicionalmente, los compuestos de bajo peso molecular tienen un efecto tóxico importante sobre las plantas y microorganismos, que aunado a la resistencia de los compuestos con alto peso molecular, influyen en la capacidad fitorremediadora de la planta, atenuando su efecto (Baker, 1970).

Algunos trabajos previos, han comprobado el potencial fitoremediador de estas especies, tal es el caso de Hernandez y Mager (2003), que evaluó la capacidad de *Urochloa brizantha* y *Megathyrus Maximum* para descontaminar suelos contaminados con crudo mediano al 3 % de concentración. Entre sus resultados encontró, que a pesar de existir una fuerte reducción en la producción de biomasa, éstas fueron capaces de reducir el contenido de grasas y aceites en suelo contaminados en 240 días de prueba.

Navas (2012) evaluó la capacidad de *Megathyrus maximum* para remediar suelos contaminados con crudos extrapesados a un 5% de concentración. Según sus resultados, luego de 120 días de estudio, la planta logró una disminución de los compuestos aromáticos y saturados presentes en el crudo. En el caso de las resinas y los asfaltenos logró una leve disminución los cuales son compuestos difíciles de degradar.

Merkl y col. (2005) encontraron que luego de 180 días en un suelo contaminado con petróleo pesado al 5 %, las fracciones de saturados y aromáticos disminuyeron tanto en los suelos plantados con *Urochloa brizantha* y *Cyperus aggregatus*, como en sus controles, alcanzando un 15 % de disminución de aromáticos con *U. brizantha* respecto al suelo sin vegetación. Por su parte, ni las plantas por ellos estudiadas, ni sus respectivos controles mostraron degradación de resinas y asfaltenos.

Cuando analizamos la capacidad de retención de crudo en el suelo, se obtiene que el suelo seleccionado tiene mayor capacidad de retención de crudos extrapesados y pesados, que medianos y livianos. Para el crudo liviano y mediano, la CE₅₀ y el punto de 100 % de ausencia de germinación se ubican por debajo de la capacidad de retención del

suelo, además, la densidad de ambos crudos les permite penetrar fácilmente el suelo. Ello indica que en la práctica, cuando ocurren derrames o disposiciones inadecuadas de estos crudos y se alcanza la saturación del suelo, se logra una inhibición total de la germinación de las especies bajo estudio. En el caso del crudo pesado y extrapesado, la CE_{50} se ubica igualmente por debajo de la capacidad de retención del suelo, pero el punto de 100 % de ausencia de germinación está por encima de la capacidad de saturación. Ello indica que en la práctica, cuando ocurren derrames o disposiciones inadecuadas de estos crudos y se alcanza la saturación del suelo, se logra una inhibición parcial de la germinación de las especies bajo estudio. Sin embargo, los crudos pesados y extrapesados son muy densos y no percolan fácilmente a través del suelo como lo harían los crudos de menor densidad. Por lo tanto, en el caso de un derrame se forma inicialmente una capa superficial de crudo con una concentración que pudiera ser hasta del 100% y que inhibiría la germinación de las semillas.

Además de lo discutido, los resultados obtenidos tienen otras aplicaciones importantes. Por una parte permite determinar para diferentes tipos de crudo cual será el impacto sobre la germinación de las semillas de una determinada intensidad de contaminación, establecida esta última como concentración. Por otra parte permite establecer para cada tipo de crudo, cual es la concentración objetivo a lograr a través del saneamiento, para lograr un porcentaje satisfactorio de germinación de las especies evaluadas. Este último es un criterio adicional, ya que legalmente el Decreto 2635 establece que 1 % de aceites y grasas es el límite satisfactorio de limpieza, pero como se ha demostrado en este estudio que los CE_{50} obtenidos son superiores al límite establecido por la legislación venezolana.

De manera que el uso de estas especies en concentraciones por debajo del CE₅₀ pudiera ser una fase final del tratamiento de suelos contaminados con crudos, que permite además la recuperación vegetal del área, y en consecuencia mejorar el valor escénico de las áreas afectadas. Ello requiere más estudios a diferentes escalas espaciales y temporales para generar un paquete tecnológico eficiente con el uso de estas especies de pastos.

7 CONCLUSIONES

- 1- Las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximum* resultan igual de tolerantes ante la presencia de suelos contaminados con la misma concentración de petróleo.
- 2- El crudo menos tóxico para las especies evaluadas fue el crudo extrapesado (9,3 ° API) cuya concentración que generó la inhibición media de la germinación (CE₅₀) fue 27,12 % para *Urochloa brizantha* y 26,16 % para *Megathyrsus maximum* y el más tóxico fue el crudo liviano (30 ° API) cuya concentración que generó la inhibición media de la germinación (CE₅₀) fue 1,97 % para *Urochloa brizantha* y 1,36 % para *Megathyrsus maximum*.
- 3- A medida que disminuye la gravedad API se amplían los intervalos de germinación para ambas *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máxima*. Con crudo extrapesado es de 0 % - 90 %, con crudo pesado de 0 % - 63 %, con crudo mediano 0 % - 12 % y con crudo liviano 0 % - 9 %.

- 4- Los IG obtenidos indican que los crudos evaluados resultaron ser altamente tóxicos para *Megathyrus maximum* y *Urochloa brizantha* a concentraciones mayores de 27,0%, 18,9%, 1,2% y 0,3% para los crudos extrapesados, pesados, medianos y livianos respectivamente.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Achuba, F.I. 2008. The Effect of Sublethal Concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*) seedlings. *Environmentalist*. **26**: 17–20.
- Adam G., Duncan H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* **120**: 363-370.
- Adenipekun, C., Oyetunji, O., Kassim, L. 2008. Effect of spent engine oil on the growth parameters and chlorophyll content of *Corchorus olitorius* Linn. *Environmentalist*. **28**: 446-450.
- Al-Hawas, G., Shukry, W., Azzoz, M., Al-Moaik, R. 2012. The effect of sublethal concentrations of crude oil on the metabolism of Jojoba (*Simmondsia chinensis*) seedlings. *Int. Res. J. Plant. Sci.* **3(4)**: 54-62.
- Al-Mutairi, N., Bufarsan, A., Al-Rukaibi, F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* **74**: 142–148.
- Amakiri, J., Onofeghara, F. 1984. Effects of crude oil pollution on the germination of *Zea mays* and *Capsicum frutescens*. *Environ. Pollut.* **35**: 159-167.
- Anderson, J.M., Ingram, J.S.I. 1992. Tropical Soil Biology and Fertility, a Handbook of Methods. 2da Edición. CAB International.
- Atlas, R. M. and Bartha, R.: 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications, Benjamin Cummings Publ. Co., San Francisco, USA, pp. 393–399.
- Baker, J. 1970. The effects of oils on plants. *Environ. Pollut.* **1**: 27–44.

- Benavides, J., Quintero, G., Guevara, A., Jaimes, D., Gutiérrez, S., Miranda, J. 2006. Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA* **4(5)**: 1-116.
- Bona, C., Mendonça, I., Oliveira, G, Souza, L. 2011. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings. *Braz Arch Biol Techn.* **54 (6)**: 1379-1387.
- Bossert I, Bartha R. 1985. Plant growth in soils with a history of oily sludge disposal. *Soil Sci.* **140**: 75-77.
- Brown, S. Reid, B. 1951. Report on Experiments to Test the Diffusion of Oxygen through a Surface Layer of Oil. Texas A. and M. Res. Found., Project 9.
- Castillo, G. 2004. Ensayos toxicológicos y evaluación de calidad de aguas. Estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones. IMTA. Ciudad de México, México.
- Cauwenberghe, L., Roote, D. S. 1998. In situ Bioremediation. Technology Overview Report. TO-98-01.
- Celis, J., Sandoval, M., Zaga, E., Briones, M. 2006. Efecto de la adición de biosólidos urbanos y de salmonicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca Sativa*) en un suelo patagónico. R.C. *Suelo Nutr. Veg.* **6**: (13-25)
- Cunningham, S., Anderson, T., Schwa, A., HsuM H. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Agron.* **56**: 55-114.
- Cunningham, S.D. y Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* **110(3)**: 715-719.

- Di Salvatore, M., Carafa, A., Carratù, G. 2008. Assessment of heavy metals phytotoxicity using seed germination and root elongation tests: A comparison of two growth substrates. *Chemosphere*. **73**: 1461–1464.
- Deuel, L. Jr., Holliday, G.H. 1997. Soil Remediation for the Petroleum Extraction Industry. 2da edición. Penn Well. USA.
- Figueruelo, J., Marino, M. 2001. Química Física del Medio Ambiente. Editorial Reverté. México.
- Frick, C.M., Farrel, R.E., Germida, J.J. 1999. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance Canada. Calgary, Canadá.
- Guitian, D. 2011. Efectos de la contaminación por petróleo pesado en el suelo sobre la germinación de semillas y sobrevivencia de plántulas en *Mauritia flexuosa*. L.f. Tesis de licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Ghanem, A., D’Orazio, V., Senesi, N. 2010. Phytotoxicity assay of selected plants to Pyrene contaminated soil. 19th World Congress of Soil Science, Soil Solutions for a Changing World 1 – 6 August 2010, Brisbane, Australia.
- Henner, P., Schiavona, M., Druelleb, V., Lichtfousea, E. 1999 Phytotoxicity of ancient gaswork soils. Effect of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on plant germination. *Org. Geochem.* **30 (8)**: 963–969.
- Hernández-Valencia, I. y D. Mager. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro* **15 (3)**: 149-155.

- Hubálek, T., Vosáhlová, S., Mateju, V., Kováková, N., Novotný, C. 2007. Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during biorremediation: A case study. *Environ. Contam. Toxicol.* **52**: 1-7.
- Infante, C., Morales, F., Ehrmann, E. U., Hernández-Valencia, I., Leon, N. 2010. Hydrocarbons bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. *Bioremed. Phytother.* **2010**: 429-451.
- Kirk, J., Klironomos, J., Lee, H., Trevors, J. 2010. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremed.* **6**: 57-63
- Korade, D., Fulekar, M. 2009. Effect of organic contaminants on seed germination of *Lolium multiflorum* in soil. *Iss. Biom. M.* **1**: 28-34.
- Kyung-Hwa, B., Hee-Sik, K., Hee-Mock, O., Byung-Dae, Y., Jaisoo K., In-Sook, L. 2004. Effects of Crude Oil, Oil Components, and Bioremediation on Plant Growth. *J. Environ. Sci. Heal. A.* **39**: 2465-2472.
- LaGrega, M., Buckingham, P., Evans, J. 2003. Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos. Editorial McGraw Hill. Primera edición en español. México.
- Larenas, G., De Viana, M. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral.* **15**: 177-181.
- Lin, Q., Mendelssonhn, I., Suidan, M., Lee, K., Venosa, A. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Mar. pollut. bull.* **44**: 897–902.

- Luhach, J., Chaudhry, S. 2012. Effect of diesel fuel contamination on seed germination and growth of four agricultural crops. *Universal. J. Environ. Res. Technol.* **2**: 311-317.
- Mancera-López, M., Esparza, F., Chávez, B., Rodríguez, R., Saucedo, G., Barrera, J. 2008. Bioremediation on fan aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* **61**: 151-160.
- Mathew, M., Yang, X., Baxter, M., Senior, E. 2006. Bioremediation of 6% (w/w) diesel contaminated mainland soil in Singapore: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Eng. Life. Sci.* **6 (1)**: 63-67.
- McMillen, S., Smart, R., Bernier, R. 2004. Seventh SPE International Conference on Health, Safety, and Environment in Oil and Gas Exploration and Production. Alberta, Canada.
- Mendez-Natera, J., Salazar, R., Velásquez, A. 2006. Efecto del derrame de petróleo simulado y la aplicación de un remediador sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas en dos tipos de maíz (*Zea mays L*). Departamento de Agronomía, Escuela de Ingeniería Agronómica, Núcleo de Monagas, Universidad de Oriente, Maturín, estado Monagas, Venezuela.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics- The effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremed. J.* **8(3-4)**: 177-184.
- Molina-Barahona, L., Vega-Lugo, L., Guerrero, M., Ramírez, S. Romero, I., Vega-Jarquín, C., Albores, A. 2005. Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environ. Toxic.* **20(1)**: 100-190.

- Montes, R. 2008. Efecto ecotoxicológico del petróleo crudo sobre el primer estadio de *Emerita analoga stimpson*, 1857 (decápoda: anomura). *Biologist*. **6 (2)**: 101-111.
- Navas, G. 2012 Evaluación de la capacidad fitorremediadora de *Panicum maximum* en un suelo de sabana contaminado con un hidrocarburo de petróleo extrapesado. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Nozzolillo, C., Helson, V. 1959. Effects of petroleum oils on the oxygen uptake in respiration of parsnif and mustard. *Plant. Physiol.* **34 (2)**
- OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2003. Guideline for Testing Chemicals 208. (2003 final draft). Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test.
- Ogbo, E. 2005. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants - *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Afr. J. Biotechnol.* **8**: 250-253.
- OPEP. 2010. Anual Report.
- PDVSA. Informe de gestion anual 2012.
- Pezeshki, S., Hester, M., Lin, Q., Nyman, J. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *environ pollut.* **108**: 129-139.
- Pothuluri, J., Cerniglia, C. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: Chaudhry, G.R. (Ed.), *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*, 92-124.
- Rasmussen, L. 1947. 'The physiological action of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on dandelion, *Taraxacum officinale*. *Plant Physiol.* **22**: 377-92.

- Reis, J. C. 1996. Environmental control in petroleum engineering. Gulf Publ.: Houston, TX.
- República de Venezuela. 1995. Normas sobre Evaluación Ambiental de Actividades Susceptibles de Degradar el Ambiente. Decreto 1.257. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No. 35.946 del 25-4-1996.
- República de Venezuela. 1998. Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de los Desechos Peligrosos. Decreto No. 2.635. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No.5.245 Extraordinario del 3-8-1998.
- República Bolivariana de Venezuela. 2001. Ley sobre Sustancias, Materiales y Desechos Peligrosos. Gaceta Oficial de la República Bolivariana de Venezuela No. 5.554 Extraordinario del 13-11-2001.
- Riehl, L. Wedding, R. 1959. Relation of oil type, deposit, and soaking to effects of oil sprays on photosynthesis in citrus leaves. *J. Econ. Entomol.* **52**: 88-94.
- Rivera, M., Trujillo, N. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* **29**: 369-376.
- Salanitro, J., Dorn, D., Huesemann, M., Moore, K., Rhodes, I., Vipond, T., Western, M., Wisniewski, H. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* **31 (6)**: 1769–1776.
- Speight, J. 1999. The chemistry and technology of petroleum. Marcel Dekker, INC. Tercera edición. Estados Unidos.

- Speight, J. G. 2001. Handbook of petroleum analysis. John Wiley & Sons INC, Publication.
- Tang, J., Wang, M., Wang, F., Sun, Q., Zhou, Q., 2010. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *J. Environ. Sci.* **23**: 845–851.
- Tarache, A. 2011. Estudio De La Evolución De Toxicidad De Suelos Petrolizados Durante Un Proceso De Biorremediación. Tesis de maestría. Universidad Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Tiquia, S. y col. 1996. Effects of phytotoxicity of spent pig-manure sawdust litter. *Environ. Pollut.* **93**: 249-256.
- Tiquia, S. y col. 1997. Effects of turning frequency on cosposting of spent pig-manure sawdust litter. *Bioresource. Technol.* **62**: 37-42.
- Tiquia, S, y col (2000) Evaluating phytotoxicity of pig manure from pig on litter system. Proceedings of the International Composting Symposium, P.R. Warman & B.R. Taylor, Ed., CBA Press Inc., Truro, N.S. 625-647.
- Uribe, R. 2008. Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en semillas de cebolla *Allium cepa* y soya *Glycine max*. Pags: 285-289. En: Ramírez-Romero, P., Mendoza-Cantú, A. (compiladoras). Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México. Instituto Nacional de Ecología, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México.
- USEPA (Environmental Protection Agency). 1980. EPA 9045C. Test Methods For Evaluating Solid and Hazardous Waste.

- USEPA (Environmental Protection Agency). 1994. EPA Method 3540 B. Test Methods For Evaluating Solid and Hazardous Waste. Soxhlet Extraction.
- USEPA (Environmental Protection Agency). 1996. Ecological effects Test Guidelines. OPPTS 850. 42000. Seed Germination / Root elongation Toxicity Test. USEPA 712-C-96-154.
- Varnero, M., Rojas, C., Orellana, R. Índices de fitotoxicidad en residuos orgánicos durante el compostaje. *R. C. Suelo Nutr. Veg.* **7**: 28-37.
- Wang, W., Freemark, K. 1995. Use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* **30**: 289-301.
- Xu, J. G., Johnson, R.L. 1995. Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil-contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant Soil.* **173**: 3-1.
- Zamora E., García, J. 2011. Fitotoxicidad Aguda De Ripios Impregnados Con Fluidos Base Aceite Mineral En Condiciones De Laboratorio. *Vis. Tecnol.* Pp: 29-36.
- Zucconi, F.M., Forte, M., Monaco, A., De Bertoldi, M., 1981. Biological evaluation of compost maturity. *BioCycle.* **22**: 27-29.

9 ANEXO

9.1 TABLAS

Tabla 12. Resultados de % de germinación, Elongación de radícula, elongación del hipocotílo e Índice de germinación

crudo	Sp.	Muestra	% germinación	E. Radícula (mm.)	E. Hipocotílo (mm.)	Índice de Germinación (IG)
Extrapesado	<i>Urochloa brizantha</i>	0%	96,0	46,8	86,4	100
		0,90%	95,3	44,2	79,4	93,8
		2,70%	92,0	39,3	79,0	80,5
		9%	87,3	36,3	69,4	70,6
		27%	59,3	30,7	62,7	40,5
		90%	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Megathysus maximum</i>	0%	95,3	41,6	74,5	100
		0,90%	95,3	39,1	77,1	93,8
		2,70%	92,0	36,9	71,4	85,6
		9%	85,3	31,5	64,3	67,8
		27%	56,0	25,5	58,6	36,0
		90%	0,0	0,0	0,0	0,0
Pesado	<i>Urochloa brizantha</i>	0%	96,0	46,8	86,4	100
		0,63%	94,7	40,3	77,2	85,0
		1,89%	90,0	35,9	71,5	72,0
		6,30%	81,3	32,8	69,0	59,5
		18,90%	58,7	28,1	56,0	36,8
		63%	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Megathysus maximum</i>	0%	95,3	41,6	74,5	100
		0,63%	88,7	36,5	69,9	81,4
		1,89%	84,7	32,5	71,4	69,3
		6,30%	74,7	27,3	62,7	51,4
		18,90%	54,7	19,6	49,2	27,0
		63%	0,0	0,0	0,0	0,0
Mediano	<i>Urochloa brizantha</i>	0%	96,0	46,8	86,4	100
		0,12%	89,3	36,5	78,3	72,7
		0,36%	86,7	31,3	73,0	60,4
		1,20%	67,3	25,2	66,5	37,7
		3,60%	52,7	20,0	60,0	23,4
		12%	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Megathysus maximum</i>	0%	95,3	41,6	74,5	100
		0,12%	86,7	32,8	65,8	71,7
		0,36%	79,3	28,8	66,8	57,5
		1,20%	58,0	20,4	59,2	29,8
		3,60%	46,7	13,7	45,6	16,1
		12%	0,0	0,0	0,0	0,0
Liviano	<i>Urochloa brizantha</i>	0%	96,0	46,8	86,4	100
		0,09%	85,3	33,0	71,5	62,6
		0,27%	81,3	26,9	67,0	48,7
		0,90%	67,3	20,4	55,5	30,6
		2,70%	56,0	11,4	45,7	14,2
		9%	0,0	0,0	0,0	0,0
	<i>Megathysus maximum</i>	0%	95,3	41,6	74,5	100
		0,09%	83,3	27,3	64,1	57,3
		0,27%	72,0	24,3	58,1	44,2
		0,90%	56,0	16,8	49,9	23,7
		2,70%	48,0	10,1	41,4	12,3
		9%	0,0	0,0	0,0	0,0