

IMPACTO DE ACTIVIDADES ANTRÓPICAS SOBRE PARÁMETROS MICROBIOLÓGICOS Y BIOQUÍMICOS DEL SUELO: TRES CASOS DE ESTUDIO

Ismael Hernández Valencia

Centro de Ecología Aplicada, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Facultad de
Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.

*ismael.hernandez@ciens.ucv.ve

RESUMEN

Se presentan tres casos para Venezuela donde es evaluado el impacto de diferentes actividades antrópicas sobre parámetros bioquímicos y microbiológicos del suelo; ellos son: a) la fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo, en donde se determinó el contenido de aceites y grasas, el carbono de la biomasa microbiana y la actividad de la enzima deshidrogenasa, b) la fertilización de un suelo con abonos orgánicos, en donde se determinó el C, N y P de la biomasa microbiana y las actividades de las enzimas fosfatasa ácida y ureasa, y c) la rehabilitación de la vegetación en una mina de bauxita, en donde se determinó la respiración basal, las actividades de las enzimas deshidrogenasa, ureasa y fosfatasa ácida, y los contenidos de C, N y P de la biomasa microbiana. La mayoría de los indicadores seleccionados registraron cambios bajo las diferentes actividades antrópicas, lo que sugiere su idoneidad para evaluar el impacto sobre la actividad microbiana y bioquímica del suelo, principalmente aquellas ligadas al ciclaje de C, N y P. Sin embargo, los resultados deben ser interpretados cuidadosamente, ya que las mediciones suelen hacerse bajo un conjunto de condiciones de laboratorio estándares, que no reflejan necesariamente las condiciones naturales. Adicionalmente, la interpretación no debe basarse en un sólo indicador, sino en un conjunto de ellos, que además de los parámetros bioquímicos y microbiológicos, incluya parámetros físicos y químicos.

Palabras clave: biomasa microbiana, actividad enzimática, fitorremediación, abonos orgánicos, rehabilitación forestal.

Impact of human activities on microbiological and biochemical soil parameters: three case studies

Abstract

Three cases are presented where the impact of human activities on soil microbiological and biochemical parameters in Venezuela were assessed: a) the phytoremediation of soil contaminated with crude oil, where oil and grease content, microbial biomass carbon, and dehydrogenase activity were determined, b) fertilization of a savanna soil with organic fertilizers, where C, N and P of microbial biomass and phosphatase and urease activities were determined, and c) rehabilitation of the vegetation in a bauxite open mine

pit, where basal soil respiration, urease, acid phosphatase, and dehydrogenase activities, as well as C, N, and P of the microbial biomass were determined. Most of the selected indicators showed changes under different anthropogenic activities and treatments, suggesting their suitability to assess human impact on soil microbial and biochemical activity, mainly those linked to cycling of C, N and P. Results, however, should be interpreted carefully, since measurements are usually done under a set of standard laboratory conditions, which do not necessarily reflect natural conditions. In addition, the interpretation must not be based on a single indicator, but a set of them, which, in addition to biochemical and microbiological parameters should also include physical and chemical parameters.

Keywords: Microbial biomass, enzymatic activity, phytoremediation, organic amendments, forest rehabilitation.

INTRODUCCIÓN

A los suelos se le adjudican importantes funciones ecológicas, como son: a) la producción de biomasa que es fuente de fibras, alimentos y energía, b) reactor que filtra, regula y transforma la materia para proteger de la contaminación al ambiente, y c) hábitat de plantas, animales y microorganismos (Briones, 2014), entre otras. Desde el punto de vista socioeconómico, los suelos constituyen un recurso fundamental, ya que la potencialidad agrícola de un país y su seguridad alimentaria dependen de la extensión, características productivas y el manejo que se les proporciona.

La calidad del suelo ha sido uno de los tópicos de mayor interés en las ciencias del suelo, especialmente en lo que se refiere a su definición, y a la búsqueda de formas confiables para evaluar esta calidad. La definición de “calidad del suelo” ha sido difícil de establecer, ya que en ella el término debe hacer referencia a un conjunto de atributos y funciones asignados de acuerdo a un juicio de valor, que permita evaluar la capacidad que tiene el suelo para producir lo que se espera de él, o bien valorar la sustentabilidad de las prácticas de manejo del mismo (Patzel *y col.*, 2000, Bünemann *y col.*, 2018). Una de las definiciones más aceptadas es la de Doran y Parkin (1994), quienes la definen como “la capacidad que tiene el suelo para sostener la productividad biológica y mantener la calidad ambiental, de tal forma que se promueva la salud vegetal, animal y humana; todo ello dentro de los límites que impone el ecosistema y el tipo de manejo que recibe”.

Una gran variedad de procesos y propiedades físicas, químicas y biológicas están envueltos en el funcionamiento del suelo, y debido a la imposibilidad de considerar todos los parámetros, es necesario hacer una

selección de aquellos más idóneos de acuerdo a la función del suelo que se quiere estudiar. Muchos de los parámetros químicos y algunos físicos son pruebas de rutina en la mayoría de los laboratorios comerciales y centros de investigación, mientras que los de tipo biológico tienen una disponibilidad más restringida y su interpretación no es sencilla.

Las evaluaciones biológicas incluyen la estimación de la abundancia o biomasa de organismos específicos o grupos funcionales, así como el contenido de compuestos orgánicos o la actividad de enzimas que son esenciales en la descomposición de la materia orgánica y el ciclaje de elementos, procesos fundamentales en la producción de cultivos y descontaminación de suelos (Parisi *y col.*, 2005). El reto actual se presenta en la búsqueda de indicadores apropiados para valorar la calidad del suelo para otras funciones diferentes a la producción de alimentos, e incorporar los parámetros de tipo biológico, por su ventaja para servir como señales tempranas de los cambios que sufren los suelos por la intervención antrópica (Astier-Calderon *y col.*, 2002).

En las últimas décadas, los indicadores bioquímicos y microbiológicos han sido utilizados para establecer el impacto de prácticas agrícolas (Acosta-Martínez *y col.*, 2007), las prácticas de aforestación (Caravaca *y col.*, 2002), la recuperación de áreas afectadas por la minería (Izquierdo *y col.*, 2005) y la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos (Margesin *y col.*, 2000), entre otros. Sin embargo, es necesario seguir profundizando sobre su uso, especialmente en cuanto a su capacidad para describir e integrar procesos de los ecosistemas y del suelo, su aplicación en diversas condiciones de campo, su sensibilidad a las variaciones de manejo y de clima, su consistencia en la dirección del cambio y su accesibilidad a diferentes usuarios (Doran y Parkin, 1994; Bending *y col.*, 2004).

A continuación se presentan un conjunto de investigaciones que se han llevado a cabo sobre el impacto de diferentes tipos de intervención antrópica sobre indicadores microbiológicos y bioquímicos de calidad del suelo. Los casos estudiados son: (a) la fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo crudo, (b) la fertilización de un suelo de sabana con abonos orgánicos y (c) la rehabilitación de la vegetación en una mina de bauxita a cielo abierto. En estos casos, los parámetros seleccionados fueron la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa, relacionadas con la oxidación de compuestos carbonados por los microorganismos; la actividad de la enzima ureasa, relacionada con el ciclaje de N en el suelo; la actividad de la enzima fosfatasa ácida, relacionada con la mineralización del fósforo orgánico; y el contenido de C,

N y P de la biomasa microbiana, relacionados con la inmovilización de estos nutrientes por los microorganismos y con su disponibilidad a corto plazo. Posteriormente, con base en los resultados obtenidos se pudo identificar cuáles mostraron cambios, de manera que pudieran ser considerados en el futuro para estudios similares.

DISCUSIÓN

Caso 1: Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo.

Entre las técnicas de rehabilitación de suelos contaminados con petróleo, la fitorremediación ha despertado interés por ser un procedimiento pasivo, útil para remediar simultáneamente varios contaminantes, más económico respecto a las tecnologías basadas en procesos físicos y químicos y además procura un paisaje más agradable (Trapp y Karlson, 2000). Los pastos representan un material vegetal con prioridad de estudio para la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo y sus derivados, ya que muestran una rápida germinación y altas tasas de crecimiento. Adicionalmente, la rizósfera podría jugar un papel importante, ya que las raíces y sus microorganismos y enzimas asociados tienen capacidad para absorber, transformar, degradar o estabilizar los contaminantes del suelo (Cunningham *y col.*, 1996).

El impacto de los derrames de petróleo en el suelo, así como la contribución de las plantas en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo, pueden ser evaluados a través de indicadores de la actividad microbiológica y bioquímica del suelo, como la actividad de la enzima deshidrogenasa y el contenido de C microbiano, ya que ambos están relacionados con: (a) la oxidación de compuestos carbonados bajo condiciones aeróbicas y (b) el uso y acumulación del carbono por parte de los microorganismos, respectivamente (Stępniewska y Wolińska, 2005, Timmerman *y col.*, 2003). Con base a lo expuesto, en este caso se evaluaron los cambios producidos en la actividad microbiana, durante la fitorremediación con *Urochloa brizantha* y *Panicum máximum* de un suelo contaminado con un crudo liviano.

Se realizó un ensayo en condiciones de umbráculo (condiciones promedio: 23,2 °C de temperatura, 450 μEs^{-1} de radiación y 85% de HR) con los pastos *Panicum maximum* Jacq. Var. Tanzania y *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster, con el fin de establecer su capacidad para reducir la concentración de aceites y grasas en un suelo contaminado con petróleo crudo, así como los cambios en el tiempo en la actividad de la enzima deshidrogenasa y el contenido de C microbiano. El

suelo usado fue el horizonte A de un Typic Haplustox, franco arenoso, pH fuertemente ácido, mientras que el crudo utilizado provino del campo Budare del estado Guárico y presentaba una gravedad de 27,2 ° API.

El ensayo se realizó en envases de poliestireno de 44 cm de largo, 32 cm de ancho y 28 cm de alto. Tres réplicas fueron establecidas para cada pasto y en ellas se agregaron 20 kg de suelo contaminado con el crudo al 3% (p/p) y luego se sembraron 26 semillas de los pastos (Semillas Magna, con 95% de germinación certificada). Para mejorar el desarrollo de las plantas, se adicionó cal para obtener un pH adecuado del suelo de 6,5 unidades (1:2,5-agua). Además se fertilizó con 0,23 g.kg⁻¹ suelo de fosfato diamónico y 2,4 g.kg⁻¹ suelo de urea, fraccionada en porciones equivalentes a los 0, 15, 30 y 45 días. La dosis de fertilización fue determinada con base a la relación C:N:P de 100:2:0,2, recomendado por Hutchinson *y col.*, (2001). El contenido de humedad se mantuvo al 60% de la capacidad de campo a través de riegos cada 3 días. Con el transcurrir del ensayo, la competencia entre plantas y la eliminación manual permitió el establecimiento de dos plantas por envase. Como control, se establecieron 3 envases sin plantas, pero con la misma concentración de crudo, dosis de fertilización, cal y contenido de agua del tratamiento con plantas. Muestras duplicadas de suelos superficiales (0-15 cm) fueron tomadas al azar en cada envase a los 0, 30, 60, 120 y 240 días de iniciado el ensayo y luego refrigeradas (4°C) hasta realizar los análisis de laboratorio. El contenido de aceites y grasas se determinó de acuerdo al método gravimétrico EPA 3540, con el uso de diclorometano como extractante (Deuel y Holliday, 1997). El C microbiano se determinó por el método de Vance *y col.* (1987), mientras que la actividad de la enzima deshidrogenasa se determinó de acuerdo al método de Casida *y col.*, (1964). Mayores detalles sobre el establecimiento del ensayo se presentan en Mager y Hernández Valencia (2013).

Los resultados mostraron una rápida disminución durante los primeros 30 días en el contenido de aceites y grasas y posteriormente la tasa de pérdida se redujo progresivamente con el tiempo (Figura 1A). Al término, la descontaminación de suelos fue mayor en presencia de los pastos, con una disminución estadísticamente significativa en el contenido de aceites y grasas de 63% en *P. maximum*, 55% en *U. brizantha*, y 40% en el control. El C microbiano mostró la misma tendencia para todos los tratamientos, con un incremento hasta los 60 días de iniciado el ensayo y luego una disminución hasta los 240 días cuando finaliza el mismo (Figura 1B); sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre tratamientos. En el caso de la enzima deshidrogenasa, el máximo valor se observó a los 30 días para los tratamientos con pastos y a los 60 días para el tratamiento sin pastos (Figura 1C). Sólo para los días 120 y 240

se encontraron diferencias estadísticas significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos, siendo más alta la actividad para *U. brizantha* respecto el control y *P. máximum*, mientras que estos dos últimos tratamientos no mostraron diferencias estadísticas entre sí.

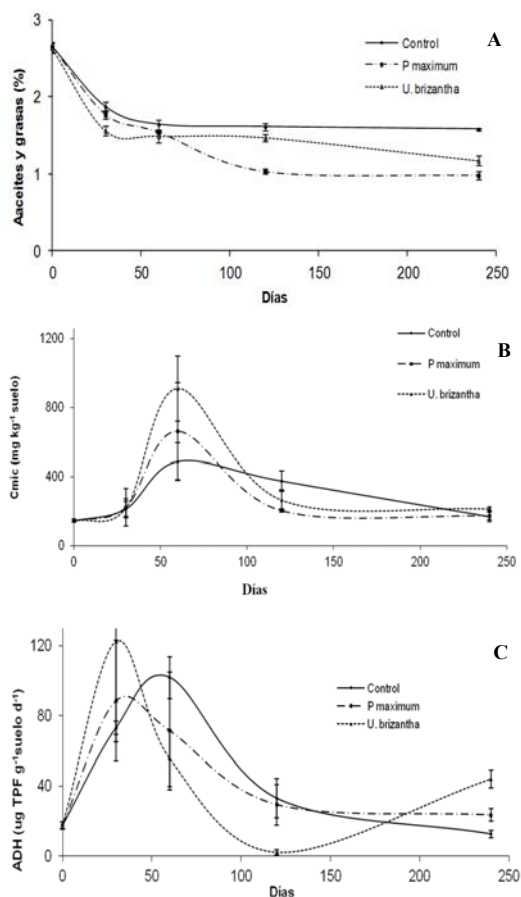


Figura 1. (A) Contenido de aceites y grasas, (B) C microbiano (Cmic) y (C) actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH) en suelo contaminado con y sin gramíneas. Las líneas verticales corresponden al error estándar.

Para todos los tratamientos, la rápida disminución inicial en el contenido de aceites y grasas estuvo relacionada con la degradación mediada por microorganismos de los compuestos más lábiles, así como la volatilización de compuestos del crudo de bajo peso molecular. En estadios más avanzados, la reducción en la tasa de degradación del crudo está vinculada a la persistencia

de compuestos de más lenta degradación por sus características químicas o baja biodisponibilidad (McMillen, 1995; Madsen, 1997). En el caso de los tratamientos con gramíneas, las raíces pueden estimular la actividad microbiana y la degradación del crudo, ya que este es utilizado como una fuente de carbono y energía. Sin embargo, no se encontraron mayores valores en el C microbiano y en la actividad de la enzima deshidrogenasa con la presencia de los pastos para los diferentes tiempos evaluados respecto al tratamiento sin pastos. Ello se justifica en parte por la alta variabilidad que mostraron ambos parámetros, especialmente en los primeros 60 días del ensayo, cuando el desarrollo de la rizósfera es pobre.

El tipo, cantidad de crudo y los manejos agronómicos (fertilización, riego y encalado) favorecieron la actividad microbiana, ya que se observó un incremento en el contenido de C microbiano y en la actividad de la enzima deshidrogenasa para todos los tratamientos al inicio del ensayo (Figura 1B y 1C). La cinética del C microbiano y la actividad de la enzima deshidrogenasa mostraron una tendencia muy similar con un pico entre los 30-60 días del ensayo, que se asocia con un aumento de la actividad microbiana por el aprovechamiento de sustratos carbonados biodisponibles, posteriormente decae la actividad microbiana en la medida que estos disminuyen y aumentan la proporción de compuestos más recalcitrantes (Alexander, 1999).

Los resultados permiten concluir que pese a la mayor biorremediación en los suelos con pastos, los parámetros seleccionados no indican una mayor actividad bioquímica y microbiológica que pueda asociarse a este hallazgo. Sin embargo, se observó un incremento en la actividad bioquímica y microbiana cuando se agrega hidrocarburos, fertilizantes, se encala el suelo y se desarrolla la rizósfera, lo que es una demostración del cambio producido por la contaminación y posterior biotratamiento.

Caso 2: Fertilización orgánica en suelos arenosos de sabanas. Las sabanas en las adyacencias de Puerto Ayacucho, estado Amazonas, poseen suelos arenosos con muy bajos contenidos de C, N y P; en consecuencia, el uso intensivo para la agricultura está supeditado a la utilización de grandes dosis de fertilizantes, particularmente de N y P. Para incrementar la productividad, algunos agricultores han implementado sistemas de producción donde se emplean abonos orgánicos para mejorar de la fertilidad. Estos sistemas alternativos a la agricultura convencional que utiliza fertilización inorgánica, se generan debido a la inexistencia de fuentes naturales de fertilizantes cercanas, lo costoso del fertilizante inorgánico y al subsidio al alimento de animales (gallinaza) que durante años mantuvo el estado venezolano (López-Hernández *y col.*, 2006).

Para el estudio se seleccionaron tres sistemas de producción con fertilización orgánica: (a) estiércol de ganado (Majada), (b) gallinaza y (c) compost, en contraste con un sistema de producción con fertilización inorgánica (Tabla 1).

Tabla 1. Descripción de los sistemas de producción estudiados.

Sistema Producción	Tiempo aplicación fertilizante	Tipo fertilizante	Forma de Incorporación	Cultivos introducidos
Estiércol bovino (majada)	> 1 año	Excretas de bovinos	Por un periodo de 6 meses se deposita una capa de material orgánico y el inicio de la época de lluvia indica la etapa de cultivo.	Al inicio cultivos anuales como <i>Citrullus vulgaris</i> (patilla), <i>Zea mays</i> (maíz), <i>Cucurbita maxima</i> (auyama) y posteriormente <i>Manihot esculenta</i> (yuca dulce).
Gallinaza	20 a 30 años	Excrementos de pollo mezclados con cal y residuos vegetales	Se hace la remoción del estrato vegetal, canalizando zanjas en hileras donde se siembra y entre las hileras se distribuye el abono (<2t/ha) periódicamente.	<i>Mangifera indica</i> (mango), <i>Persea americana</i> (aguacate), <i>Annona muricata</i> (guanabana), <i>Musa</i> sp. (plátano). También siembran cultivos de secano, como <i>Vigna unguiculata</i> (frijol), <i>Zea mays</i> (maíz).
Compost	20 a 30 años	Excrementos de cerdo mezclados con residuos vegetales formando un compost.	Se realiza la excavación de un hueco, donde se coloca el compost (<2 t/ha) y luego la planta. Se realiza incorporaciones periódicas en la base de la planta y con un constante riego en sequía.	Se mantiene un sistema agroforestal con plantas de <i>Musa</i> sp. (plátano), <i>Mangifera indica</i> (mango), <i>Citrus</i> sp. (cítricos).
Sistema Agrícola Inorgánico	2 años	Incorporación de 1000 kg/ha de roca fosfórica pulverizada y 300 kg/ha de fertilizante NPK (12-24-12) dos años antes del muestreo.	Con el pase de la rastra de un tractor se incorporó la capa vegetal, por voleo se agregó la roca fosfórica pulverizada y el fertilizante NPK y por último se mezcló con la rastra. Entrada la época de lluvia se sembró el pasto.	Pasto <i>Brachiaria dictioneura</i> en asociación con dos leguminosas, <i>Centrocema macrocarpum</i> y <i>Stylosanthes capitatis</i> .

En cada sistema de producción y su control (sabana sin tratamiento) se tomaron nueve muestras simples de suelo al azar entre 0 - 10 cm de profundidad y a partir de ellas se prepararon tres muestras compuestas a partir de tres muestras simples también tomadas al azar. Las muestras fueron pasadas por un tamiz de 2 mm de apertura y refrigeradas (4°C) hasta realizar las determinaciones del N (Sparling y West, 1988), C (Vance *y col.*, 1987) y P (Hedley *y col.*, 1982) de la biomasa microbiana, y las actividades de las enzimas fosfatasa ácida (Tabatabai y Bremner, 1969) y ureasa (Tabatabai y Bremner, 1972). La selección de estos indicadores se debió al papel que tienen los microorganismos y las enzimas seleccionadas en el ciclaje y disponibilidad de C, N y P, que son esenciales para el crecimiento de las plantas. Información más detallada sobre el estudio lo presentan López Hernández *y col.*, (2006).

Los resultados mostraron que la adición de abonos orgánicos produjo un incremento estadísticamente significativo en el contenido de C microbiano con relación al tratamiento control (Tabla 2). Los cambios significativos en las variables evaluadas fueron bajo la incorporación de gallinaza, seguido del sistema con estiércol de bovinos y del sistema bajo compost. Los valores más bajos se encontraron en el sistema con fertilización inorgánica y estuvo asociado a los menores aportes de materia orgánica, uso de labranza, menor humedad del suelo y valores de pH más ácidos, parámetros que tienen influencia directa con la actividad de las comunidades microbianas.

Tabla 2. Biomosas microbianas y actividades enzimáticas en suelos sometidos a fertilización (orgánica e inorgánica).

Sistema de Producción	Estiércol bovino		Gallinaza		Compost		Fertilización inorgánica		
	C	T	C	T	C	T	C	T	
C microbiano (µg/g)	98 a	122 a	54 a	153 b	54 a	106 b	50 a	74 a	
N microbiano (µg/g)	7,5 a	58,6 b	11,9 a	19 a	11,9 a	22,1 a	31,1 a	20,0 a	
P microbiano (µg/g)	Pi	0,2 a	-5,3 b	0,2 a	-1,1 b	0,2 a	-2,0 b	0,5 a	-0,1 b
	Po	0,8 a	67 b	3,0 a	75 b	12 a	1,6 b	3,7 a	2,2 a
Actividad fosfatásica ácida (µg/g)	10,4 a	37 b	10,7 a	27,9 b	10,7 a	46,6 b	3,2 a	9,9 b	
Actividad ureásica (µg/g)	39,0 a	69,7 b	9,0 a	4,02 a	9,0 a	12,1 a	31,8 a	46,2 a	

Valores seguidos de letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas entre el tratamiento y el control (T de Student P<0,05). C: Control. T: Tratamiento.

La actividad ureásica y el N microbiano registraron los valores más altos en el sistema con estiércol de bovinos, donde la deposición de orina animal incrementa de forma sustancial los valores de la actividad enzimática. El sistema bajo fertilización inorgánica no presentó cambios sustanciales en el N microbiano respecto al control. Por su parte, la actividad fosfatásica fue también mayor en los sistemas de producción orgánicos; sin embargo, llamó la atención que pese a los altos niveles de P disponible reportados por López *y col.*, (2007) en ninguno de los sistemas orgánicos mostraron una fuerte inhibición de la actividad fosfatásica, hecho reportado en la literatura para cultivos en donde se han utilizado abonos verdes (Piotrowska-Dlugosz y Wilczewski, 2014). Los valores de P microbiano medidos como P_i fueron negativos para todos los sistemas orgánicos, al igual que el sistema tratado con agricultura convencional (Tabla 2), siendo este resultado bastante común en la literatura para el caso de los suelos tropicales con altas capacidades de adsorción de P (Potter *y col.*, 1991). Por el contrario, cuando se midió el P_o microbiano (Cuadro 2) los valores fueron estadísticamente significativos y mayores en el caso del tratamiento con gallinaza y estiércol de bovino, sin cambios sustanciales bajo fertilización inorgánica y menores bajo el tratamiento con compost, cuando se comparan con los controles.

En síntesis, la adición de enmiendas orgánicas, tuvo un efecto notable en la actividad microbiana y bioquímica de los suelos respecto al sistema bajo fertilización inorgánica. Ello sugiere una mejora en la fertilidad biológica, en virtud del rol fundamental que juegan los microorganismos y las enzimas del suelo como catalizadores de la fertilidad química. No se realizaron comparaciones entre los diferentes sistemas de producción, en donde las posibles diferencias entre ellas pueden estar relacionadas con la composición del abono, cantidad utilizada y tiempo de aplicación.

Caso 3: Rehabilitación de la vegetación en una mina de bauxita. La extracción de bauxita a cielo abierto en Los Pijiguaos, estado Bolívar, ha generado una fuerte degradación del paisaje dominado por bosques húmedos que se desarrollan sobre suelos muy pobres, y que es mitigado con un programa de rehabilitación que a la fecha alcanza más de 300 ha recuperadas. Este programa contempla la extracción y preservación de la capa orgánica del suelo (suelo superficial en los primeros 50 cm) antes de la extracción de la bauxita, su almacenamiento temporal y la posterior reincorporación y adecuación química y física, previo al establecimiento de la cobertura vegetal. En las áreas con rehabilitación más avanzada (14 años), se han encontrado especies propias del bosque maduro (Alessi, 2003). En el caso de los suelos no se han realizado estudios sobre los cambios en sus características, los cuales pudieran ser útiles para

conocer su comportamiento y el efecto de las prácticas de rehabilitación utilizadas. Con base en lo antes expuesto, en el presente caso se estudiaron los cambios de algunos indicadores microbiológicos y bioquímicos en áreas afectadas por la explotación y con diferentes tiempos de rehabilitación, con el fin de establecer la evolución e idoneidad de estos indicadores en el seguimiento de la recuperación de estas áreas.

En el yacimiento se identificaron cuatro sectores: (a) Área donde se inició la rehabilitación con la incorporación de la capa orgánica de suelo, la cual tenía 6 meses de almacenamiento previo y sin siembra de especies vegetales y/o acondicionamiento del suelo (R0), (b) Área con 1,5 años de rehabilitación (R1,5), (c) Área con 14 años de rehabilitación (R14) y (d) Bosque nativo (BN).

En las áreas donde se inició la rehabilitación (R0, R1,5 y R14), la preparación del terreno consistió en su conformación para lograr una topografía plana a ligeramente inclinada (no mayor del 15 % de pendiente), su escarificación hasta 100 cm de profundidad y posterior incorporación de la capa orgánica de suelo hasta lograr un grosor entre 30 a 40 cm. Para R1,5 y R14, la adecuación química y revegetación inicial del suelo consistió en la aplicación de 200 a 300 kg ha⁻¹ de NPK (12-24-12) y semillas de pastos introducidos, mientras que para la siembra de árboles se procedió al trasplante de juveniles provenientes de áreas vecinas intervenidas con 50 g del fertilizante por planta (Lisena, 2004). Para la fecha de la toma de muestra, la vegetación R1,5 correspondió a un arbustal con altura inferior de 100 cm compuesto por dicotiledóneas herbáceas, gramíneas y juveniles de árboles y arbustos propios de la zona de estudio. La vegetación de R14 era un bosque bajo (dosel <10 m) de cobertura media, mientras que el bosque nativo es de altura media (dosel < 17 m) y de cobertura densa.

En cada sector se estableció una parcela de una ha (100 x 100 m) y en ellas se tomaron 25 muestras de suelo al azar hasta una profundidad de 10 cm y a partir de ellas se prepararon 5 muestras compuestas provenientes de 5 muestras de suelo. Las muestras fueron tamizadas a través de un tamiz de 2 mm y refrigeradas a 4 °C hasta realizar los análisis microbiológicos y bioquímicos, los cuales fueron: la respiración basal (Alef y Nannipieri, 1995) y la actividad de la enzima deshidrogenasa (Casida *y col.*, 1964), la actividad de la enzima ureasa (Nannipieri *y col.*, 1980), la actividad de la enzima fosfatasa ácida (Tabatabai y Bremner, 1969) con las modificaciones indicadas por Saá *y col.* (1993), el contenido de C microbiano (Vance *y col.*, 1987), N microbiano (Sparling y West, 1988) y P microbiano (Hedley *y col.*, 1982). Información más detallada sobre el estudio se encuentra en Hernández Valencia *y col.* (2011).

Los resultados mostraron que la respiración basal, presentó un incremento progresivo con el tiempo de rehabilitación (Figura 2A), en tanto que el bosque nativo alcanzó el valor más alto, encontrándose diferencias significativas entre todas las condiciones evaluadas. El C y N de la biomasa microbiana (Figuras 2B y 2C) también mostraron una tendencia similar. De hecho, se consiguieron relaciones positivas entre la respiración basal y el C de la biomasa microbiana ($r=0,90$, $p<0,05$) y N microbiano ($r=0,92$, $p<0,05$), así como entre el contenido de C orgánico y la respiración basal ($r=0,88$, $p<0,05$) y del C orgánico con la biomasa de C microbiano ($r=0,82$, $p<0,05$) y de N de la biomasa microbiana ($r=0,92$, $p<0,05$).

Estos resultados apoyan la tesis que el incremento en el contenido de materia orgánica en el suelo y el desarrollo de la rizósfera durante la rehabilitación de las áreas degradadas, favorece su actividad metabólica. Sin embargo, para el contenido de P microbiano este patrón no fue tan evidente, ya que si bien el P de la biomasa microbiana fue más alto en BN, las áreas sujetas a rehabilitación (R0, R1,5 y R14) no mostraron diferencias estadísticas significativas entre ellas (Figura 2D). Por su parte, el cociente metabólico (qCO_2), que es la razón entre la respiración basal y la biomasa del C microbiano, fue superior en R0, seguido de R1,5, mientras que en R14 y BN no mostraron diferencias significativas entre sí y presentaron los valores más bajos (Figura 2E). En cuanto a las enzimas evaluadas, para los tres tipos se encontró que R0 presentó la más baja actividad. En el caso de la actividad de la deshidrogenasa el incremento fue progresivo en el sentido $R0 < R1,5 < R14 < BN$ (Figura 2F), que fue la misma tendencia observada para la respiración basal y el C y N de la biomasa microbiana. En el caso de la actividad ureásica y fosfatásica (Figura 2G y 2H, el patrón fue ligeramente similar, excepto que R1,5 y R14 no mostraron diferencias significativas entre sí.

De los resultados se deriva que pese a la reincorporación de la capa orgánica, la actividad biológica del suelo es afectada por la remoción de la cobertura vegetal y el almacenamiento de la capa orgánica. Esto se verifica cuando se observa que tanto la biomasa microbiana como la respiración basal y la actividad de las enzimas evaluadas, presentaron valores más bajos en R0, donde recién se había colocado la capa orgánica de suelo. Ésto pudiera ser producto de los bajos aportes de materia orgánica, bajo contenido de oxígeno en los depósitos más profundos, eventual presencia de compuestos tóxicos y reducido ciclaje y disponibilidad de nutrimentos en las pilas de capa orgánica almacenada.

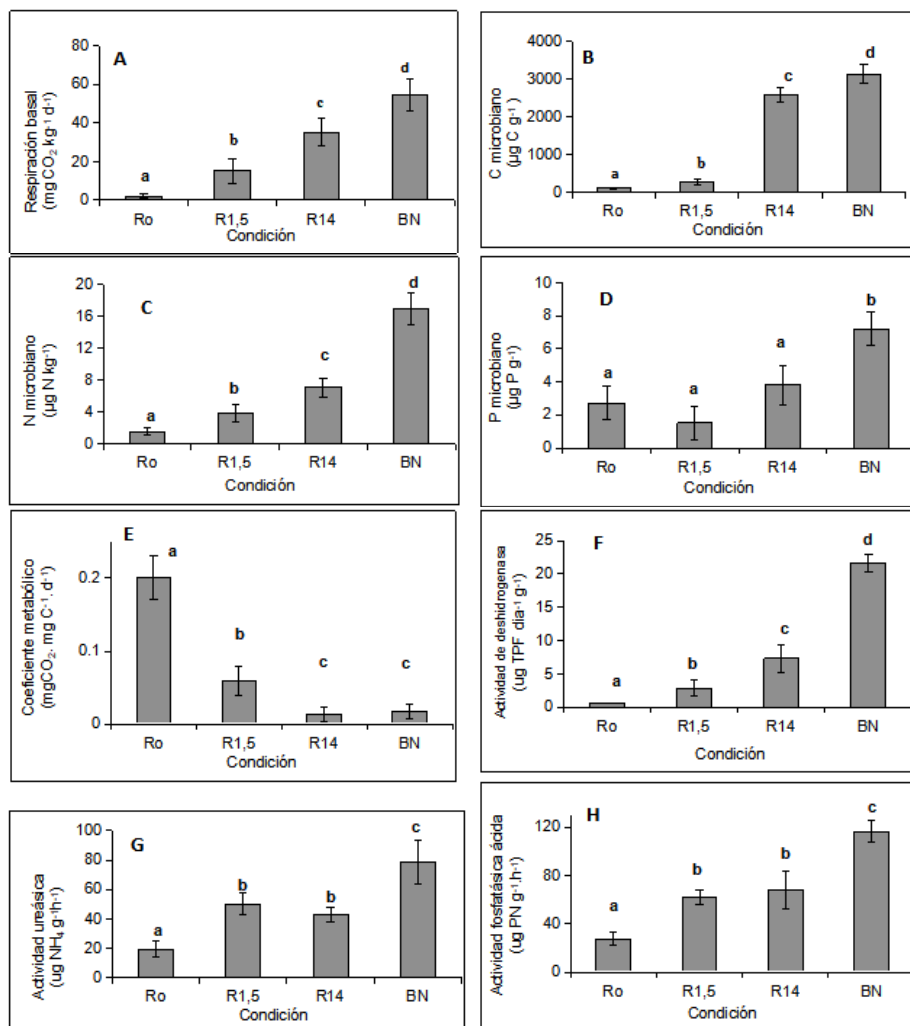


Figura 2. Parámetros microbiológicos y bioquímicos en el suelo de áreas rehabilitadas y el bosque nativo en Los Pijiguaos, Edo. Bolívar: (A) Respiración basal, (B) C microbiano, (C) N microbiano, (D) P microbiano, (E) coeficiente metabólico, (F) actividad de deshidrogenasa, (G) actividad ureásica y (H) actividad fosfatásica ácida. Letras minúsculas distintas similares indican medias distintas entre tratamientos (DMS p<0,05). Las líneas verticales indican el error estándar.

Con la fertilización y el establecimiento de la cobertura vegetal, aumentó la actividad bioquímica y microbiológica del suelo, tal como se encontró para la respiración basal, las actividades enzimáticas y la biomasa de C y N microbiano de R1,5 y R14 respecto a R0. Esto se asocia

principalmente al incremento en el contenido de materia orgánica en el suelo y también a la presencia de una rizósfera que favorece el desarrollo de la microbiota. Por otra parte, con el desarrollo de la cobertura vegetal y el incremento de la actividad microbiológica, aumentan los requerimientos de nutrimentos, los cuales deben ser suplidos a través de la mineralización de la materia orgánica, que es mediada por las enzimas del suelo. En el caso del coeficiente metabólico, los valores más altos se observaron en los estadios más tempranos de rehabilitación, e indica que con el progreso de la sucesión hay acumulación de biomasa microbiana con menores costos de mantenimiento. Esta dinámica también podría explicarse por una mejora progresiva de las condiciones ambientales para el desarrollo de los microorganismos del suelo (p.e. contenido de carbono en el suelo), que reduce sus requerimientos energéticos para sobrevivencia y desarrollo (Insam y Haselwandter, 1989).

Uno de los valores prácticos del uso de estos indicadores es el análisis de su evolución durante la rehabilitación, lo cual permitiría establecer la cercanía y el tiempo requerido para alcanzar la condición deseada, o bien para evaluar el desempeño de varias prácticas de recuperación. En el primer caso y para este estudio, si se toma como meta alcanzar las características microbiológicas y bioquímicas de los suelos del bosque nativo (BN), se puede observar que a excepción del cociente metabólico, los restantes indicadores en las áreas rehabilitadas aún no se equiparan a esta referencia y se vincula al relativo corto tiempo de desarrollo de las labores de rehabilitación con relación al tiempo requerido para restituir las características originales del ecosistema intervenido.

En bosques secundarios húmedos tropicales, alcanzar una riqueza florística similar al bosque primario, puede llevar pocas décadas después del abandono; sin embargo, una composición florística similar es un proceso más largo. Esta aseveración se apoya en estudios de metanálisis sobre registros palinológicos que indican tiempos de recuperación con una mediana de 210 años y un promedio de 503 años (Cole *y col.*, 2014) y de estudios de cronosecuencias, donde se ha encontrado que luego de 80-100 años de sucesión, la composición florística de los bosques secundarios aún dista de parecerse al bosque maduro (Denslow y Guzmán, 2000) y puede variar considerablemente dependiendo del tipo de disturbio y su frecuencia de aparición (Guariguata y Ostertag, 2001, Cole *y col.*, 2014). Para Los Pijiguaos, las áreas con recuperación más avanzada apenas tenían 14 años para el momento del muestreo y las evaluaciones realizadas indican que la composición florística aún difieren considerablemente del bosque nativo pese a la siembra de especies autóctonas (Alessi, 2003), lo cual pudiera estar ligado a los factores antes mencionados.

De los resultados se puede establecer que los indicadores seleccionados fueron sensibles para detectar el impacto de la minería sobre la calidad del suelo, hecho que se evidencia en las claras diferencias significativas en los parámetros evaluados entre BN y R0. En cuanto a aquellos más idóneos para registrar los cambios en el tiempo, la mayoría mostró una tendencia consistente con el tiempo de rehabilitación. Siendo los más sensibles la respiración basal, el C y N de la biomasa microbiana y la actividad de la enzima deshidrogenasa, donde todas las condiciones evaluadas fueron diferentes entre sí.

CONSIDERACIONES FINALES

La mayoría de los indicadores mostraron cambios bajo las diferentes actividades antrópicas evaluadas. Esto sugiere que aquellos que mostraron dichos cambios, pueden ser idóneos para evaluar el impacto de estas actividades antrópicas, principalmente las ligadas al ciclaje de C, N y P. Solamente el C de la biomasa microbiana se estudió en los tres casos, lo que refleja que no existe un conjunto de indicadores comunes y que su selección depende de los objetivos del estudio, específicamente de la función del suelo que se quiere estudiar. Evidentemente, entre los parámetros bioquímicos y microbianos, el C de la biomasa microbiana es un indicador idóneo de la actividad de los microorganismos del suelo y que está relacionado con en el ciclaje de C, como en los casos que se consideraron en este trabajo: (a) la degradación de hidrocarburos (caso 1), (b) la mineralización de carbono por adición de abonos orgánicos (caso 2) y (c) los aportes de materia orgánica por la vegetación al suelo durante su rehabilitación (caso 3).

En estos estudios se evidencia cómo los objetivos de la investigación, y en consecuencia la función del suelo en la cual se quieren detectar los cambios influyen en la selección de los indicadores. En el caso 1 sobre fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, siendo el petróleo un compuesto carbonado, la selección de indicadores estaba dirigida a aquellos parámetros microbiológicos y bioquímicos que pudieran establecer la importancia de la actividad microbiana y bioquímica del suelo en la oxidación de compuestos carbonados bajo condiciones aeróbicas y el uso y acumulación del carbono por parte de los microorganismos. Por ello se tomó en consideración la estimación de la actividad de la enzima deshidrogenasa y el C de la biomasa microbiana. En los casos 2 y 3 los objetivos y funciones del suelo que se evaluaron fueron diferentes y más amplios y estaban relacionados con el ciclaje de nutrientes esenciales como C, N y P, y por ello más y diferentes indicadores fueron incorporados como la actividad de las enzimas ureasa y fosfatasa y el N y P de la biomasa microbiana.

En todos los casos presentados, los aportes de carbono y otros nutrientes, así como el desarrollo de la rizósfera, son factores que pudieran justificar los resultados, ya que los mismos estimulan la actividad microbiana y bioquímica de los suelos. En el caso de la fitorremediación de suelos contaminado con petróleo, si bien no se encontraron diferencias entre los tipos de pastos, aunque estos mostraron diferentes capacidades para descontaminar el suelo, se observó un incremento en la actividad bioquímica y microbiana cuando se agrega hidrocarburos, fertilizantes, se encala el suelo y se desarrolla la rizósfera, lo que es una demostración del cambio.

La respuesta observada en los indicadores microbiológicos y bioquímicos estudiados confirma la necesidad que estos sean incorporados en los estudios en donde se investiga el impacto de las actividades antrópicas sobre la calidad del suelo y que no se restrinjan a las tradicionales evaluaciones de indicadores físicos y químicos (Bünemann *y col.* 2018). Por otra parte, los resultados deben ser interpretados cuidadosamente, ya que las mediciones suelen hacerse bajo un conjunto de condiciones de laboratorio estándares, que no reflejan necesariamente las condiciones naturales. Adicionalmente, la interpretación de los datos para establecer lo que es una buena o mala calidad del suelo, no depende de la evaluación de un solo indicador, sino de un conjunto de ellos, que además de los parámetros bioquímicos y microbiológicos, incluya parámetros físicos, químicos (Doran y Parkin, 1994, Astier-Calderon *y col.* 2002, Bünemann *y col.* 2018).

LITERATURA CITADA

- Acosta-Martínez, V., L. Cruz, D. Sotomayor-Ramírez y L. Pérez-Alegria. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Appl. Soil Ecol.* 35: 35–45.
- Alef, K. y P. Nannipieri. 1995. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Londres, Academic Press, 221pp.
- Alessi, F. 2003. Estado actual del proceso de rehabilitación de la vegetación en una mina de bauxita, Los Pijiguaos, Edo. Bolívar. Trabajo Especial de Grado. Caracas. Escuela de Biología. UCV, 72 pp.
- Alexander, M. 1999. *Biodegradation and bioremediation*. 2da Edic. Academic Press Inc. San Diego. USA. 453 pp.
- Astier-Caldrón, M., M. Maas-Moreno y J. Etchevers-Barra. 2002. Derivación de indicadores de calidad del suelo en el contexto de la agricultura sostenible. *Agrociencia* 36: 605-620.
- Bending G.D., M.K. Turner, F. Rayns, M.C. Marx y M. Wood. 2004. Microbial and biochemical soil quality indicators and their potential for differentiating areas under contrasting agricultural management regimes. *Soil Biol. Biochem.* 36: 1785–1792.
- Briones, M.J. 2014. Soil fauna and soil function. *Front. Environ. Sci.* doi: 10

- 3389/fenvs.2014.0007.
- Bünemann, E.K., G. Bongiorno, Z. Baic., R.B. Creamer, G. De Deyn, R. de Goede, L. Fleskens, V. Geissen, T.W. Kuyper, P. Mäder, M. Pulleman, W. Suckel, J.W. van Groenigen y L. Brussaard. 2018. Soil quality: A critical review: *Soil Biol. Biochem.* 120:105-125.
- Casida, L.E., Jr., D.A. Klein y T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98: 371-376.
- Caravaca, F., J.M. Barea, D. Figueroa y A. Roldán. 2002. Assessing the effectiveness of mycorrhizal inoculation and soil compost addition for enhancing restoration with *Olea europaea* subsp. *sylvestris* through changes in soil biological and physical parameters. *Appl. Soil Ecol.* 20: 107-118.
- Cole, L.E.S., S.A. Bhagwat y K.J. Willis. 2014. Recovery and resilience of tropical forests after disturbance. *Nat. Commun.* 5:3906 doi: 10.1038/ncomms4906.
- Cunningham, S.D., T.A. Anderson, A.P. Schwab y F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- Denslow, J.S. y S. Guzmán. 2000. Variation in stand structure, light, and seedling abundance across a tropical moist forest chronosequence. *Panama. J. Veg. Sci.* 11: 201-212.
- Deuel, L. Jr. y G.H. Holliday. 1997 *Soil remediation for the petroleum extraction industry*. Penn Well. Tulsa, USA, 242pp.
- Doran, J. W. y T. B. Parkin. 1994. Defining and assessing soil quality. In: defining and assessing soil quality for sustainable environment. (J. W. Doran, D. C. Coleman, D. F. Bezdicek y B. A. Stewart, Eds.) SSSA. Madison Wisconsin, USA, pp. 3-21.
- Guariguata, M. y R. Ostertag. 2001. Neotropical secondary forest succession: changes in structural and functional characteristics. *For. Ecol. Manage.* 148: 185-206.
- Hedley, M.J., J.W.B Stewart y S. Chahuan. 1982. Changes in inorganic and organic soil phosphorus fractions induced by cultivation practices and by laboratory incubations. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46: 970-976.
- Hernández-Valencia, I., M. Pérez y M. Lisena. 2011. Calidad del suelo en áreas rehabilitadas de una mina de bauxita. En: *Desarrollo de estrategias para la recuperación de ecosistemas tropicales degradados*. (F. Herrera, F. e I. Herrera, Eds.). IVIC. Caracas. pp. 165-175.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A.P. Schwab. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
- Insam, H y K. Haselwandter. 1989. Metabolic quotient of the soil microflora in relation to plant succession. *Oecologia* 79: 174-178.
- Izquierdo, I., F. Caravaca, M.M. Alguacil, G. Hernández y A. Roldán. 2005. Use of microbiological indicators for evaluating success in soil restoration after revegetation of a mining area under subtropical conditions. *Appl. Soil Ecol.* 30:3-10.
- Lisena, M. 2004 *Compatibilidad entre las técnicas de aprovechamiento minero y el entorno ambiental en CVG Bauxilum-Los Pijiguaos*. Los Pijiguaos, Venezuela. CVG. Puerto Ordaz. 134 pp.
- López, A.Y., I. Hernández-Valencia y D. López-Hernández. 2007. Fractionation of soil phosphorus in organic amended farms in sandy ultisols of Venezuelan Amazonian. *Biol. Fert. Soils.* 43: 771-777.
- López-Hernández, D., A. López, I. Hernández-Valencia, A. Ojeda, A. y C. Hernández. 2006. Cambios en los elementos biógenos (C, N y P) y sus formas activas (microbianas y enzimáticas) en sistemas de producción orgánicos ubicados en el Amazonas venezolano. *Agrobiológica* 3: 29-35.

- Madsen, E.L. 1997. Methods for determining biodegradability. En: *Manual of Environmental Microbiology*. (J. Hurst, Ed.). American Society for Microbiology. Washington D.C. pp. 709-720.
- Mager, D. y I. Hernández-Valencia. 2013. Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 30: 52-71.
- Margesin, R., A. Zimmerbauer y F. Schinner. 2000. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel oil contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127-3133.
- McMillen, S., A.G. Requejo, G.N. Young, P.S. Davis, P.D. Cook, J.M. Kerr y N.R. Gray. 1995. Bioremediation potential of crude oil spilled on soil. En: *Microbial processes for bioremediation*. (R.E. Hinchee, R.N. Miller y P.C. Johnson, Eds.). Batelle Press. Columbus, Ohio. pp. 91-100.
- Nannipieri, P., S. Ceccanti, S. Cervelli y E. Matarese. 1980. Extraction of phosphatase, urease, proteases, organic carbon and nitrogen from soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 44: 1011-1016.
- Parisi, V., C. Menta, C. Gardi, C. Jacomini, y E. Mozzanica. 2005. Microarthropod communities as a tool to assess soil quality and biodiversity: a new approach in Italy. *Agric. Ecosyst. Environ.* 105: 323-333.
- Patzel, N., H. Sticher y D. L. Karlen. 2000. Soil fertility phenomenon and concept. *J. Plant Nut. Soil Sci.* 163: 129-142.
- Piotrowska-Dlugosz, A. y E. Wilczewski. 2014. Soil phosphatase activity and phosphorus content as influenced by catch crops cultivated as green manure. *Pol. J. Environ. Stud.* 23: 157-165.
- Potter, R.L., C.F. Jordan, R.M. Guedes, J.G. Batmanian y G. Han. 1991. Assessment of phosphorus fractionation for soils: problems for further investigations. *Agric. Ecosyst. Environ* 34: 159-164.
- Saá, A., C. Trasar-Cepeda, F. Gil-Sotres y T. Carballas. 1993. Changes in soil phosphorus and phosphatase activity immediately forest fires. *Soil Biol. Biochem.* 22:511-515.
- Sparling, G.P. y A.W. West. 1988. Modifications to the fumigation –extraction technique to permit simultaneous extraction and estimation of soil microbial C and N. *Commun. Soil Sci Plant Anal.* 19: 327-344.
- Stępniewska Z. y A. Wolińska. 2005. Soil dehydrogenase activity in the presence of chromium (III) and (VI). *Int. Agrophys.* 19: 79-83.
- Tabatabai, M.A. y J.M. Bremner. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biol Biochem.* 1: 301-307.
- Tabatabai, M.A. y J.M. Bremner. 1972. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol Biochem.* 4:479-487.
- Timmerman, M.D., L.G. Fuller y D.L. Burton. 2003. The effects of a crude oil spill on microbiological indices of soil biological quality. *Can. J. Soil Sci.* 83: 173-181.
- Trapp, S. y U. Karlson. 2000. Aspects of phytoremediation of organic pollutants. *J. Soils Sediments*. <http://dx.doi.org/10.1065/jss2001.04.007>.
- Vance, E.D., P. C. Brookes y D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol Biochem.* 19: 703-707.