

USO DE HUMUS DE LOMBRIZ PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS MEZCLADOS CON RIPIOS DE PERFORACIÓN IMPREGNADOS CON CRUDO PESADO

José Martínez-Borges¹, Pedro Colombo², Ismael Hernández-Valencia^{1*}

¹Centro de Ecología Aplicada. Instituto de Zoología y Ecología Tropical. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela. ²PDVSA-INTEVEP. Sector Santa Rosa. El Tambor. Los Teques, Venezuela.
*ismael.hernandez@ciens.ucv.ve

RESUMEN

Se estudió la biorremediación de un suelo contaminado con ripsos de perforación base aceite e impregnados con crudo pesado, en donde se utilizó humus de lombriz en diferentes dosis (8, 12 y 16% p/p) como acondicionador orgánico. Los indicadores evaluados fueron los cambios en el contenido de aceites y grasas, la respiración basal, la actividad de la enzima deshidrogenasa y el potencial tóxico del material biotratado a través de un ensayo de fitotoxicidad con semillas de *Lactuca sativa*. Los resultados mostraron que luego de 120 días, la adición de humus de lombriz no produjo una disminución significativa en el contenido de aceites y grasas con respecto al tratamiento control (sin humus de lombriz). La respiración basal del suelo fue más alta al inicio en todos los tratamientos con humus de lombriz o fertilizantes, pero sin diferencias entre estos tratamientos; mientras que la actividad de la enzima deshidrogenasa aumentó significativamente a los 60 días de iniciado el estudio, en los tratamientos con 8%, 12% y 16% de humus de lombriz. Por su parte, la germinación de *Lactuca sativa* incrementó a los 120 días para todos los tratamientos, y siempre fue mayor en el tratamiento control respecto a los tratamientos con humus de lombriz. Los resultados permiten concluir que el humus de lombriz no produjo un aumento de la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con ripsos de perforación impregnados con crudos pesados.

Palabras clave: desechos de perforación, biorrecuperación, actividad microbiológica, toxicidad.

The use of vermicompost to bioremediate soils mixed with drill cuttings impregnated with heavy crude oil

Abstract

We evaluated the bioremediation of soil contaminated with oil-based drill cuttings impregnated with heavy oil using vermicompost in different doses (8, 12, and 16 % w / w) as an organic conditioner. Through a phytotoxicity test using *Lactuca sativa* seeds, changes in oil and grease content, basal soil respiration, dehydrogenase activity, and the toxic potential of the soils bioremediated were studied. After 120 days, the addition of vermicompost did not produce a significant decrease in the content of oils and grease with respect to the control treatment (without vermicompost). The basal soil respiration was higher at the beginning in all treatments with vermicompost and fertilizers, but without differences between them. The dehydrogenase enzyme activity increased significantly at 60 days in treatments with 8%, 12%, and 16% of vermicompost. *Lactuca sativa* germination increased at 120 days for all treatments and always was higher for control treatment than those with vermicompost. These results suggest that vermicomposting does not increase the degradation of hydrocarbons in soil contaminated drill cuttings impregnated with heavy oil.

Keywords: drilling cuttings, biorecuperation, microbial activity, toxicity.

Recibido: noviembre 2013

Aceptado: febrero 2015

Compilación del Centro de Ecología Aplicada del Instituto de Zoología y Ecología Tropical, UCV

INTRODUCCIÓN

Venezuela es uno de los principales países productores de petróleo, y en consecuencia genera grandes cantidades de ripios, que son rocas trituradas e impregnadas con fluidos acuosos o aceitosos que se producen durante la perforación de los pozos petroleros. Los ripios impregnados con aceite mineral y petróleo constituyen un pasivo ambiental, y por esta razón se hace necesario el desarrollo de tecnologías que permitan el tratamiento y disposición segura de estos desechos. Entre las tecnologías para el manejo de los ripios de perforación se encuentra el biotratamiento ó biorremediación, que consiste en la aplicación de procesos biológicos para transformar y reducir el potencial tóxico de compuestos que pueden impactar el ambiente (Gianfreda y Rao, 2004). Durante el proceso de biorremediación de compuestos orgánicos, los microorganismos usan dichos compuestos como fuente de carbono y energía, para producir biomasa celular, dióxido de carbono, agua y otros derivados (Brook *y col.*, 2001). La biorremediación de compuestos orgánicos en el suelo, como los hidrocarburos del petróleo, ocurre naturalmente y es realizado por los microorganismos autóctonos. Sin embargo, este proceso puede acelerarse si se adecúan las condiciones del suelo, tales como, la disponibilidad de oxígeno, el contenido de nutrimentos, la humedad, la temperatura, el pH y la accesibilidad del hidrocarburo al ataque microbiano, factores todos que afectan la capacidad metabólica de los microorganismos para realizar de manera eficiente la degradación del hidrocarburo (Brook *y col.*, 2001, Strauble *y col.*, 2003).

Existen varias técnicas de biorremediación, pero la bioestimulación es la técnica más usada. En la bioestimulación se fomenta la actividad de los microorganismos autóctonos a través del uso de fertilizantes, acondicionadores orgánicos (p.e. residuos vegetales, compost, etc), riego, encalado, labranza y otros manejos (Liebeg y Cutright, 1999; Mathew *y col.*, 2006). Las experiencias nacionales e internacionales, señalan que la bioestimulación es el método más eficiente en la disminución de las fracciones biodegradables de crudos (saturados y aromáticos) u otros desechos de la industria petrolera en el suelo (Infante, 2001).

En el presente trabajo se evaluó el uso del humus de lombriz como acondicionador orgánico en la biorremediación de suelos contaminados con ripios de perforación base aceite mineral, e impregnados con crudo pesado. La selección del humus de lombriz se debió a su alto contenido de materia orgánica que puede mejorar las características físicas y químicas de los suelos contaminados, y en consecuencia promover la actividad microbiana y la degradación de los hidrocarburos (Hervas *y col.*, 1989; Álvarez-Bernal *y col.*, 2006; Ferreras *y col.*, 2006).

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio. El suelo para el desarrollo de este estudio provino del horizonte A de un Typic Paleustults, franco arenoso, fuertemente ácido y pobre en nutrientes (Tabla 1) de la localidad de Santa Bárbara, Estado Monagas, mientras que el ripio de perforación utilizado fue uno base aceite mineral densificado con barita, proveniente del pozo Amarilis 2, Formación Carapita (Maturín, Edo. Monagas), obtenido a una profundidad de 15.090 pies. Este ripio se impregnó con crudo pesado Mery de 13,3° API a un contenido de aceites y grasas de 14 %. Luego, dicho ripio fue diluido con el suelo antes mencionado hasta obtener un contenido de aceites y grasas de 6%, de los cuales 28% corresponden a saturados, 26% a aromáticos, 42% a resinas y 4% a asfaltenos. Como acondicionador orgánico para el proceso de biorremediación se empleó humus de lombriz (HL) producido por la Cooperativa Jericó, San Antonio de los Altos, Estado Miranda, y cuyas características químicas se presentan en la Tabla 2.

Tabla 1. Características físicas y químicas del suelo de Santa Bárbara (Edo. Monagas).

Arena (%)	Limo (%)	Arcilla (%)	Textura	Materia orgánica (%)	N total (%)	P disponible (ppm)
89	6	5	Franco arenoso	0,9	0,04	4

Tabla 2. Contenido (%) de materia orgánica y nutrimentos en el humus de lombriz.

Materia orgánica	Nitrógeno total	Fósforo disponible	Potasio intercambiable	Calcio intercambiable	Magnesio intercambiable
44,36	2,30	2,72	0,81	2,33	0,69

Tratamientos. Los tratamientos considerados fueron:

T₁: Un tratamiento control para evaluar la atenuación natural, constituido por el suelo contaminado, sin ningún tipo de fertilización ni acondicionamiento con HL.

T₂: Un tratamiento para evaluar la biorremediación con fertilización inorgánica, sin acondicionamiento con HL. El tratamiento estuvo constituido por el suelo contaminado y fertilización con N, P y K, en una dosis de 0,60g de N:P:K (15:15:15) y 2,41 g de urea por cada 1,5 kg de suelo contaminado. La cantidad de N y P agregada a este tratamiento corresponde a las relaciones C:N = 60 y C:P = 783, muy similar a las utilizadas en ensayos de biorremediación de suelos venezolanos contaminados con crudos (Infante *y col.*, 2010).

T₃, T₄ y T₅: Tres tratamientos para evaluar la biorremediación en el suelo contaminado con HL (m/m) al 8% (T₃), 12% (T₄) o 16% (T₅) y la misma dosis de fertilización inorgánica adicionada en T₂.

T₆, T₇ y T₈: Tres controles abióticos constituidos por el suelo contaminado y HL al 8% (T₆), 12% (T₇) o 16% (T₈), fertilización inorgánica y esterilizados en autoclave (1h y 1,5 atm) a los 0, 30, 60 y 90 días, para reducir la actividad microbiana.

Los ensayos fueron realizados en condiciones de umbráculo, con temperaturas entre 22 y 26 °C. Cada tratamiento se desarrolló por triplicado y las mezclas obtenidas fueron dispuestas en bandejas que contenían 1,5 kg de las mismas. Los tratamientos se mantuvieron al 60% de la capacidad de campo del suelo y fueron aireados con un rastrillo tres veces por semana. A los 0, 30, 60 y 120 días de iniciado el ensayo, se tomaron muestras de cada tratamiento para determinar el contenido de aceites y grasas, la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa. Las muestras de suelos obtenidas fueron refrigeradas hasta realizar los análisis de laboratorio.

Los cambios en el contenido de hidrocarburos se determinaron a través de los cambios en la concentración de aceites y grasas según el método gravimétrico de la EPA 3540, utilizando como extractante diclorometano (Deuel y Holliday, 1997). Para ello se empleó un sistema de extracción soxhlet en donde se recuperó la mezcla diclorometano-aceites y grasas. Posteriormente el extractante fue evaporado de la mezcla en un rotaevaporador y la fracción de aceites y grasas fue colectada en un balón de destilación, en donde fue cuantificado por diferencia de peso.

Como indicadores de la actividad microbiana se evaluaron la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa (AED). Para la respiración basal se empleó el método de la trampa de NaOH 0,2 N (Alef y Nannipieri, 1998). El CO₂ producido por el suelo durante este tiempo y absorbido por el álcali, se calculó a través de la titulación con HCl 0,2N en presencia de fenoltaleína como indicador, previa precipitación del exceso de carbonatos con BaCl₂ (0,5N). La actividad de la enzima deshidrogenasa (AED) se determinó según el método de Casida *y col.* (1964). Este método se basa en la determinación colorimétrica del Trifenilformazan (TPF) que se produce después de incubar la muestra fresca de suelo (1- 1,2 g) con una solución acuosa de cloruro de tetrazolio (TTC) a 37 °C durante 24 horas.

Para la evaluación de los cambios en la toxicidad del suelo contaminado, se realizó un ensayo de fitotoxicidad con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) modificado del protocolo de USEPA (1996). Como sustrato de germinación se utilizaron 50 g de los suelos provenientes de los diferentes tratamientos y sus respectivas réplicas, tanto al inicio como al final del ensayo (120 días). Las muestras fueron puestas en cápsulas de Petri de 90 mm de diámetro y en cada una de ellas se colocaron directamente 10 semillas de lechuga certificadas (*Lactuca sativa* variedad Parris Island Cos), con un 90% de germinación

y humedecidas con 5 mL de agua destilada. Como control de la germinación se utilizó el mismo tipo de suelo, sin ninguna adición de ripio contaminado, fertilización o humus de lombriz. Las muestras fueron incubadas en la oscuridad a 22 °C durante 5 días (120 horas). Luego se contaron las semillas germinadas, considerando como criterio de germinación la aparición de la radícula. Adicionalmente, se midió la longitud de la radícula para cada una de las de las plántulas de lechuga. Con esta información se estimó el índice de germinación (IG), según la ecuación propuesta por Hamdi *y col.* (2007):

$$IG = \frac{G_t \times Lr_t}{G_c \times Lr_c}$$

En donde:

IG = Índice de germinación

G_t = Número de semillas germinadas en el tratamiento

Lr_t = Longitud promedio de la radícula en el tratamiento

G_c = Número de semillas germinadas en el control de germinación (suelo limpio)

Lr_c = Longitud promedio de la radícula en el control

Análisis estadístico. Para determinar diferencias significativas entre los tratamientos durante el tiempo de estudio se realizaron análisis de varianza de una vía y prueba a posteriori LSD, con un nivel de significancia de 0,05. Adicionalmente, se realizó un análisis de correlación entre la actividad de la enzima deshidrogenasa y la respiración basal, con un nivel de significancia de 0,05. Para estos análisis se empleó el paquete estadístico STATISTICA 5.0 (Statsoft, 1995).

RESULTADOS

Contenido de aceites y grasas. A los 30 días hubo una disminución significativa entre el 13 y 22% en el remanente de aceites y grasas en los tratamientos de atenuación natural (T_1) y con adición de humus de lombriz (T_3 , T_4 y T_5), mientras que a los 60 días ocurre una disminución del 8% con el ensayo fertilizado con N:P:K y sin adición del humus (T_2) (Tabla 3). Posteriormente, el remanente de aceites y grasas solo disminuyó en los suelos con HL al 8 y 12% sin esterilizar (T_4 y T_5) y permaneció sin mostrar variaciones significativas en el resto de los tratamientos. Los controles abióticos T_6 y T_7 no mostraron variaciones en los 120 días de estudio respecto al contenido inicial, excepto en T_8 que fue del 9% aproximadamente. Al final del ensayo, el tratamiento de atenuación natural (T_1) reflejó un porcentaje de pérdida de aceites y grasas del 20% aproximadamente, sin mostrar diferencias con los tratamientos con humus de lombriz y sin esterilizar (T_3 , T_4 y T_5). Estos resultados indican que la

aplicación del humus de lombriz no procuró una mejora en la degradación del hidrocarburo.

Tabla 3. Remanente de aceites y grasas (%) a los 0, 30, 60 y 120 días de ensayo.

Tratamiento	Contenido remanente de aceites y grasas (%)			
	0 día	30 días	60 días	120 días
T ₁	100 ^{a,A} (0)	84, 68 ^{b,A} (4,88)	82,96 ^{b,A} (0,32)	79,49 ^{b,AB} (5,61)
T ₂	100 ^{a,A} (0)	92, 71 ^{ab,B} (3,27)	92,14 ^{b,BD} (3,53)	86,42 ^{b,AE} (3,97)
T ₃	100 ^{a,A} (0)	77,60 ^{b,AC} (1,85)	80,86 ^{b,A} (2,16)	76,09 ^{b,B} (1,55)
T ₄	100 ^{a,A} (0)	82,69 ^{b,AC} (1,65)	87,23 ^{b,AB} (4,11)	79,41 ^{c,AB} (3,77)
T ₅	100 ^{a,A} (0)	84,10 ^{b,AC} (5,17)	88,59 ^{b,AB} (5,68)	78,06 ^{c,B} (4,52)
T ₆	100 ^{a,A} (0)	100,37 ^{a,CE} (2,70)	103,22 ^{a,C} (2,43)	95,90 ^{a,CD} (2,19)
T ₇	100 ^{a,A} (0)	107,85 ^{b,D} (6,60)	96,90 ^{a,CDE} (6,71)	100,29 ^{a,C} (12,94)
T ₈	100 ^{a,A} (0)	95,25 ^{ab,BE} (8,30)	91,18 ^{b,E} (4,13)	91,42 ^{b,DE} (7,83)

Los % aceites y grasas son el promedio de tres réplicas por tratamiento (n=3).

Valores entre paréntesis representan la desviación estándar.

Letras minúsculas iguales indican diferencias no significativas en el tiempo para un mismo tratamiento (filas).

Letras mayúsculas iguales indican diferencias no significativas entre tratamientos para un mismo tiempo (columnas).

El tratamiento en donde se aplicó fertilización inorgánica y sin HL (T₂) tampoco mostró diferencias significativas en el porcentaje de degradación de aceites y grasas a los 120 días, con respecto al tratamiento de atenuación natural (T₁), pero la disminución en el contenido de aceites y grasas fue significativamente menor en T₂ respecto a los tratamientos T₃ y T₅ donde se aplicó el humus de lombriz. Los controles abióticos (T₆, T₇ y T₈) presentaron valores inferiores al 10% de disminución del contenido de aceites y grasas.

Respiración basal. Al inicio, la respiración basal en los tratamientos fertilizados (T₂ al T₈) fue significativamente mayor que en el tratamiento de atenuación natural (T₁), aunque en este caso una mayor actividad microbiana no se tradujo en una mayor disminución en el contenido de aceites y grasas (Figura 1), ya que el tratamiento T₁ mostró una tasa de respiración menor, pero tasas de pérdida de aceites y grasas similares a los tratamientos fertilizados y sin esterilización (T₂ al T₅). Adicionalmente, se observó en los tratamientos fertilizados (T₂ al T₈) una disminución progresiva en la respiración basal entre el inicio y término del ensayo. En los ensayos bajo esterilización (T₆ al T₈), se encontró que la respiración basal en algunos casos fue similar a los tratamientos de atenuación natural (T₁) y fertilización sin esterilización (T₂ al T₅). Ello indica que este procedimiento no fue lo suficientemente efectivo para inhibir la actividad microbiana, hecho bastante factible, ya que las bandejas, una vez esterilizadas, se mantuvieron en condiciones de umbráculo no estériles, y entre cada evento de esterilización, los microorganismos pudieron colonizar la mezcla de suelos-ripios. Adicionalmente, pese a que la esterilización en autoclave es una de las técnicas más utilizadas para evaluar la importancia de los microorganismos en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, se ha encontrado que no es tan efectiva para eliminar toda la microbiota del suelo (Wang *y col.*, 2011).

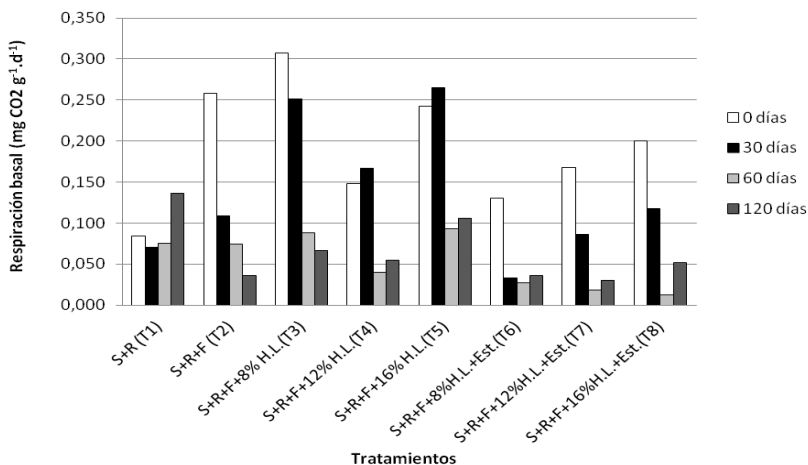


Figura 1. Respiración basal a los 0, 30, 60 y 120 días de estudio. Las barras representan el promedio ($n=3$) y la desviación estándar de cada tratamiento durante el ensayo. S: suelo, R: Ripio, F: Fertilizante, HL: Humus de lombriz, Est: Esterilización.

Actividad de la enzima deshidrogenasa. Los valores más bajos de AED se encontraron en los suelos esterilizados (T_6 , T_7 y T_8), lo que debía esperarse, ya que la deshidrogenasa es una enzima intracelular asociada a la actividad microbiológica (Figura 2). Por el contrario, los valores más altos se registraron en los tratamientos en donde se adicionó humus de lombriz y sin esterilizar (T_3 , T_4 y T_5), siendo en T_5 en donde se registró la mayor actividad entre los 30 y 60 días de iniciado el experimento. Exceptuando el tratamiento de atenuación natural (T_1), el comportamiento general observado es un incremento progresivo de la AED hasta alcanzar un máximo entre los 30-60 días y luego disminuyó a los 120 días. Esta dinámica es muy similar a la observada para la respiración basal; de hecho, se encontró una correlación significativa entre estas dos variables ($r=0,317304$, $p<0,0007$).

Ensayo de fitotoxicidad. Se observó un aumento en el IG para todos los tratamientos a los 120 días respecto al inicio del ensayo (Figura 3). Ello prueba que hay una disminución en los efectos tóxicos de los compuestos presentes en la mezcla suelo-ripio impregnado con crudo pesado, lo cual está en concordancia con la reducción en el contenido de aceites y grasas (Tabla 3). Destaca la respuesta de los tratamientos bajo esterilización, en donde a los 120 días, el efecto tóxico es mayor respecto al resto de los tratamientos, en concordancia con el mayor contenido de aceites y grasas. Por su parte, el tratamiento de atenuación natural (T_1), mostró al final del ensayo el IG más alto de todos los tratamientos, pese a que no se adicionó humus de lombriz. Ello sugiere que la adición de humus de lombriz no redujo la toxicidad de la mezcla suelo desechos en

relación al proceso de atenuación natural. Por el contrario, tanto al inicio como al final del ensayo, el tratamiento T₁ es el que procura los más altos IG y en consecuencia es siempre el menos tóxico. En lo que respecta a cual tratamiento generó los índices de germinación más altos al finalizar el ensayo, los resultados siguieron el orden T₁ > T₃=T₅=T₄ > T₂ > T₆=T₇=T₈.

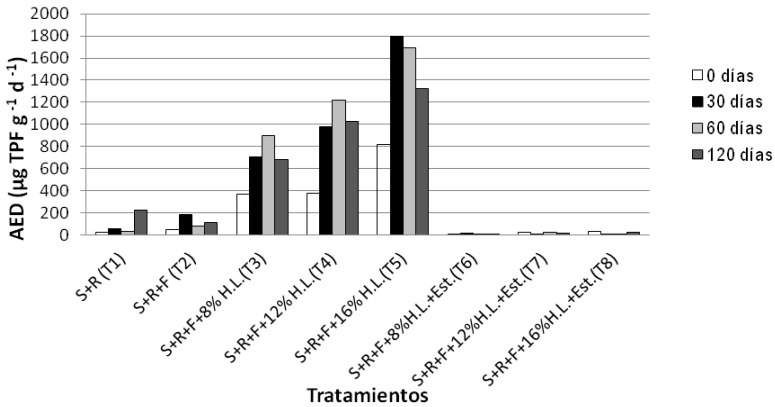


Figura 2. Actividad de la enzima deshidrogenasa (AED). Las barras representan el promedio y la desviación estándar (n=3) de cada tratamiento durante el ensayo. S. suelo, R. Ripio, F. Fertilizante, HL: Humus de lombriz, Est: Esterilización

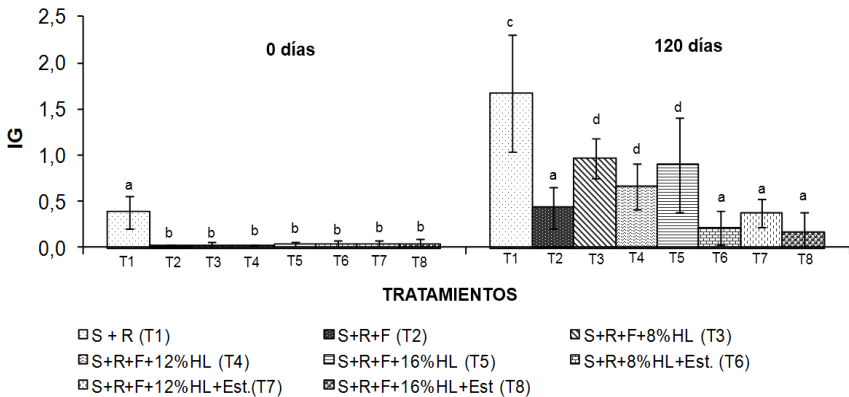


Figura 3. Índice de germinación (IG) al inicio (0 días) y final (120 días) del ensayo. Las barras representan la desviación estándar (n=3) del índice de germinación en cada tratamiento. Letras diferentes indican IG diferentes (LSD; p<0,05). S. suelo, R. Ripio, F. Fertilizante, HL: Humus de lombriz, Est: Esterilización

DISCUSIÓN

Los hidrocarburos de petróleo son una mezcla compleja de moléculas orgánicas que usualmente se clasifican en 4 fracciones: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Atlas, 1981), siendo las dos primeras las más biodegradables, mientras que las fracciones de resinas y asfaltenos son consideradas recalcitrantes por exhibir bajas tasas de biodegradación (Hervas, 1989; Leahy y Colwell, 1990). El suelo contaminado utilizado en este ensayo, presentó un contenido de 28% saturados y 26% aromáticos, lo que indicaría que al menos un 54% del contenido inicial de aceites y grasas inicial podría ser biodegradado. Los resultados muestran que luego de 120 días, el contenido de aceites y grasas disminuyó entre un 15 y 24%, lo que representa menos de la mitad de la fracción biodegradable presente en el suelo contaminado. En esta reducción, los microorganismos jugaron un papel importante, tal como lo demostraron los ensayos en donde las mezclas fueron esterilizados (T₆, T₇ y T₈), y en donde la reducción en el contenido de aceites y grasas fue muy baja (T₆, T₇) o no significativa (T₈) (Tabla 3). De hecho, al observar las diferencias entre los tratamientos esterilizados y no esterilizados con diferentes concentraciones de HL, la contribución porcentual de la actividad biológica en la disminución del contenido de aceites y grasas fue 82,9% para el tratamiento con 8% de HL, 100% para el tratamiento con 12% de HL y 60,8% para el tratamiento con 16% de HL.

Los resultados obtenidos no mostraron evidencias suficientes para soportar la hipótesis propuesta. Se esperaba que la adición del humus de lombriz mejorase las condiciones físicas y químicas del suelo contaminado con ripio y crudo pesado, y en consecuencia aumentaría la actividad microbiana y la biodegradación del hidrocarburo. Esta suposición se basaba en que el HL podía mejorar la capacidad de retención de agua y procurar una fuente adicional de N y P, además de la fertilización inorgánica utilizada. No obstante, no se observaron diferencias significativas a los 120 días en el contenido de aceites y grasas en los tratamientos con HL (T₃, T₄ y T₅) y el de atenuación natural (T₁), e incluso el tratamiento bajo atenuación natural fue más eficiente en la remoción de aceites y grasas respecto al tratamiento bajo fertilización inorgánica (T₂) a los 120 días. A este respecto, debe tomarse en cuenta que el N y P del fertilizante inorgánico se encuentra en forma soluble, mientras que en el caso del HL se encuentra principalmente en forma orgánica y debe ser mineralizado por los microorganismos para ser incorporado a las células. En relación a esto, Arancon *y col.* (2006), señalaron que la mayor parte de la materia orgánica del vermicompost es muy estable; es decir, tiene muy baja susceptibilidad a la degradación microbiana, y en consecuencia los aportes de N y P por mineralización son muy bajos. Se descartan los efectos tóxicos sobre la actividad microbiana por una eventual adición excesiva de N y P, ya que la

respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa no mostraron diferencias significativas entre el tratamiento control sin fertilización (T_1) y el resto de los tratamientos con fertilizantes (T_2 - T_8).

Otra posible explicación para entender la ausencia de cambios significativos en el contenido de aceites y grasas y la actividad microbiana entre los suelos con y sin humus de lombriz, son los cambios en las características químicas de las mezclas suelo-desecho. A este respecto, Martínez-Borges (2007) encontró diferencias significativas en la conductividad eléctrica y el contenido de cloruro de los suelos con HL respecto a los que no tenían incorporado este material. El incremento de la conductividad eléctrica fue de 3,2-3,5 mS cm^{-1} en suelo sin HL (T_1) a 6,2 a 9,0 mS cm^{-1} . Esta mayor conductividad eléctrica y de contenido de cloruros en presencia de HL, sugiere que el HL facilita la desorción de iones, creando condiciones osmóticas desfavorables para el desarrollo de los microorganismos. Los efectos tóxicos no se circunscriben solo a los microorganismos, sino también en las plantas, tal como demostraron los ensayos de toxicidad en lechuga y en donde los IG estimados para los tratamientos sin HL fueron menos tóxicos que aquellos que lo contenían (Figura 3).

La mayor tasa de respiración en los tratamientos con fertilización inorgánica confirma que el suministro de nutrimentos, mejora las relaciones C/N y C/P y favorece la actividad microbiana (Atlas, 1981; Infante y Vásquez, 1999; Liebeg y Cutright, 1999), pero como se ha mencionado, en este caso no se traduce en una mayor degradación de los hidrocarburos, ya que el tratamiento T_1 mostró una tasa de respiración menor, pero tasas de pérdida de aceites y grasas similares a los tratamientos fertilizados y sin esterilización (T_2 al T_5). En lo que respecta a la dinámica temporal de la respiración basal, el comportamiento observado es el más común, en donde las tasas iniciales de emisión de CO_2 son más altas y decrecen progresivamente en el tiempo. Margesin *y col.* (2000) y Marin *y col.* (2005), señalaron que la actividad microbiana medida como tasa de respiración o producción de CO_2 , aumenta al inicio con la incorporación del hidrocarburo en el suelo, y esta va decayendo a medida que la fracción lábil del hidrocarburo va siendo degradada, quedando las fracciones más recalcitrantes y en consecuencia menos biodisponibles para los microorganismos.

Exceptuando el tratamiento de atenuación natural (T_1), la conducta general observada es un incremento progresivo de la AED hasta alcanzar un máximo entre los 30-60 días y luego decae a los 120 días. Esto coincide con otros reportes en donde se ha observado un incremento inicial debido a la estimulación microbiana ante la fuente de carbono que constituye el hidrocarburo y luego una disminución en el tiempo, a medida que dichos compuestos van siendo degradados (Margesin *y col.*, 2000; Marin *y col.*, 2005). García *y col.* (1997),

encontraron una correlación positiva entre la AED y la respiración basal del suelo ($r=0,8573$ y $p=0,00001$) confirmando que la AED puede ser usado como marcador de la actividad microbiana del suelo y de la intensidad de su degradación.

El índice de germinación (IG) es un parámetro que tiene la ventaja de que permite evaluar niveles bajos de toxicidad que afectan el crecimiento de la raíz, así como niveles altos de toxicidad que afectan la germinación de la semilla, ambos dentro de una misma expresión (Celis *y col.*, 2006). Entre los efectos negativos que ejercen los hidrocarburos sobre la germinación, es que actúan como una barrera hidrofóbica alrededor de la semilla que bloquea o reduce el flujo de agua y oxígeno a la misma e impide la germinación (Molina-Barahona *y col.*, 2004; Mathew *y col.*, 2006). En este sentido, algunas moléculas de compuestos aromáticos pueden entrar en la semilla e inhibir el desarrollo del embrión (Marín *y col.*, 2005; Molina-Barahona *y col.*, 2005; Merkl *y col.*, 2006). Los resultados indicaron que luego de 120 días hubo una disminución en los efectos tóxicos de los compuestos presentes en los suelos contaminados, lo cual está en concordancia con la reducción en el contenido de aceites y grasas (Tabla 3) y del contenido de saturados y aromáticos en estos tratamientos (Martínez-Borges, 2007).

El tratamiento de atenuación natural (T_1) fue el tratamiento con el más alto IG tanto al inicio como al final del ensayo, hecho que refuerza la poca utilidad del humus de lombriz para biorrecuperar este tipo de desechos. El mayor IG que se observa al término del ensayo en los tratamientos con HL sin esterilización (T_3 , T_4 y T_5) respecto al tratamiento con fertilización (T_2) puede ser atribuido al mayor contenido de aceites y grasas de éste último y en consecuencia mayor potencial tóxico. Adicionalmente, al agregar ripio impregnado con crudo pesado en el suelo, se puede mejorar la estructura del mismo debido al incremento en la agregación y en la retención de humedad del suelo, favoreciendo así la germinación y crecimiento de la vegetación (Merkl *y col.*, 2006). Este resultado puede ser útil para la revegetación de áreas impactadas por disposición de ripios impregnados con crudos pesados, e indica que si bien el humus de lombriz no mejora la descontaminación de suelos en relación al proceso de atenuación natural, es una mejor opción que el uso de fertilizantes inorgánicos para reducir el efecto tóxico de los hidrocarburos sobre las plantas.

CONCLUSIONES

El uso de humus de lombriz en las concentraciones de 8, 12 y 16% no mejoró la biorremediación de ripios de perforación impregnados con aceite mineral y crudo pesado, respecto al proceso de atenuación natural y la biorremediación con el uso de fertilizante inorgánico. Las mezclas

suelo-desecho con humus de lombriz mostraron ser mas tóxicas que aquellas que no lo contienen y ello pudiera explicar la ausencia de una mejora significativa en la tasa de degradación de hidrocarburo de petróleos en presencia del humus de lombriz.

LITERATURA CITADA

- Alef, K. y P. Nannipieri. 1998. *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. San Diego. Academic Press. 221 pp.
- Álvarez-Bernal, D., E.L. García-Díaz, S.M. Contreras-Ramos y L. Dendooven. 2006. Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil added with manure or vermicompost. *Chemosphere*. 66(9):1616-1626.
- Arancon, N.Q., C.A. Edwards y P. Bierman. 2006. Influences of vermicompost on field strawberries: Part 2. Effects on soil microbiological and chemical properties. *Bioresource Technol.* 97:831-840.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbiological Rev.* 45(1):180-209.
- Atlas, R.M. 1981. Microbial hydrocarbons degradation of oil spill. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 52:149-156.
- Brook, T.R., W.H. Stiver y R.G. Zytner. 2001. Biodegradation of diesel fuel in soil under various nitrogen addition regimes. *Soil and Sediment Contam.* 10(5):539-553.
- Casida Jr., L.E., D. A. Klein y T. Santero. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 98:371-376.
- Celis, J., M. Sandoval, E. Zagal y M. Briones. 2006. Efecto de la adición de sólidos urbanos y de salmoneicultura sobre la germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L) en un suelo patagónico. *Journal of Soil Science Plant Nutr.* 6(3):13-25.
- Chaillan, F., C.H. Chaîneau, V. Point, A. Saliot y J. Oudot. 2006. Factors inhibiting bioremediation of soil contaminated with weathered oils and drill cuttings. *Environ Pollut.* 114(1):255-265.
- Deuel, L. Jr. y G.H. Holliday. 1997. Soil remediation for the petroleum extraction industry. Tulsa. Penn Well. 242 pp.
- Ferreras, L., E. Gómez, S. Toresani, I. Firpo y R. Rotondo. 2006. Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil. *Bioresource Technol.* 97:635-640.
- García, C., T. Hernández y F. Costa. 1997. Potential use of dehydrogenase activity as an index of microbial activity in degraded soils. *Commun Soil Sci. Plan.* 28:123-134.
- Gianfreda, L. y M.A. Rao. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme Microb. Tech.* 35:339-354.
- Hamdi, H., S. Benzarti, L. Manusadzianas, I. Aoyama y N. Jedidi. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39(8):1926-1935.
- Hervas, L., C. Mazuelos, N. Senesi y C. Saiz-Jimenez. 1989. Chemical and physico-chemical characterization of vermicompost and their humic acid fractions. *Sci. Total Environ.* 81/82:543-550.
- Infante, C. 2001. Biorrestauración de áreas impactadas por crudo por medio de INTEBIOS® y BIORIZE®. *Interciencia* 26(10):504-507.

- Infante, C., C. Ortega, F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y R. Pérez. 2010. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con crudo liviano. *Bioagro* 22(2):145-152
- Infante, C. y P. Vásquez. 1999. Explotación petrolera y ambiente. *Acta Cient. Venez.* 50(1):71-74.
- Leahy, J.G. y R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54(3):305-315.
- Liebeg, E.W. y T.J. Cutright. 1999. The investigation of enhanced bioremediation through the addition of macro and micronutrients in a PAH contaminated soil. *Int. Biodeterior* 44:55-64.
- Margesin, R., A. Zimmerbauer y F. Shinner. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40:339-346.
- Marin, J.A., T. Hernandez y C. Garcia. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil Microbial activity. *Environ. Res.* 98:185-195.
- Martínez-Bórges, J. 2007. Uso del humus de lombriz como acondicionador orgánico para el proceso de biorremediación de suelos mezclados con rípios de perforación base aceite mineral, e impregnados con crudo pesado. Caracas. Escuela de Biología. Facultad de Ciencias. UCV. 57 pp.
- Mathew, M., L.R. Tan, Q. Su, X. Yang, M. Baxter y E. Señor. 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.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante. 2006. Phytoremediation in the tropics: The effects of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioem. J.* 8(3-4):177-184.
- Molina-Barahona, L., R. Rodríguez-Vásques, M. Hernández-Velasco, C. Vega-Jarquín, O. Zapata-Pérez, A. Mendoza-Cantú y A. Albores. 2004. Diesel removal from contaminated soils by biostimulation and supplementation with crop residues. *Appl. Soil Ecol.* 27:165-175.
- Molina-Barahona, L., L. Vega-Loyo, M. Guerrero, S. Ramírez, I. Romero, C. Vega-Jarquín y A. Albores. 2005. Ecotoxicological Evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environ. Toxicol.* 20(1):100-109.
- Strauble, W.L., C.C. Nestler, L.D. Hansen, D. Ringleberg, P.H. Pritchard y J. Jones-Meehan. 2003. Remediation of polyaromatic hydrocarbons (PAHs) through landfarming with biostimulation and bioaugmentation. *Acta Biotechnol.* 23(2-3): 179-196.
- USEPA 1996. Ecological effects Test Guidelines. OPPTS 850. 42000. Seed Germination /Root elongation Toxicity Test. USEPA 712-C-96-154.
- Wang, C. Y., F. Wang, T. Wang, X. L. Yang, Y. R. Bian, F. O. Kengara, Z. B. Li y X. Jiang. 2011. Effects of autoclaving and mercuric chloride sterilization on PAHs dissipation in a two-liquid-phase soil slurry. *Pedosphere* (21):56-64.