



UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Evaluación de la capacidad fitorremediadora de
Megathyrsus maximus en suelos de sabanas
contaminados con hidrocarburos de petróleo pesado**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por el bachiller
Guillermo A. Méndez Calderón como
requisito parcial para optar por el título
de Licenciado en Biología
Tutor: Dr. Ismael Hernández-Valencia

CARACAS, VENEZUELA

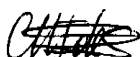
Mayo - 2014

ACTA

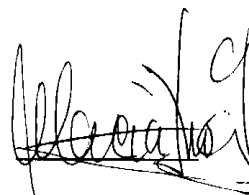
Los abajo firmantes, designados por la Universidad Central de Venezuela, como integrantes del jurado examinador del Trabajo Especial de Grado titulado: "Evaluación de la capacidad fitorremediadora de *Megathyrus maximus* en suelos de sabanas contaminados con hidrocarburos de petróleo pesado" presentado por el Br. Guillermo Antonio Méndez Calderón, 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



Dra. Carmen Infante



Dra. Marcia Toro

DEDICATORIA

A mi querido hermano Gustavo, por creer en mí, por su apoyo incondicional y ayuda en esos momentos críticos; gracias Gus sin ti no hubiera sido posible culminar esta etapa de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al profesor Ismael Hernández, por brindarme la oportunidad de trabajar bajo su guía, por su paciencia y pedagogía en aclarar todas las dudas durante el ensayo, por su actitud diligente para conseguir los reactivos y ayuda para finalizar aquellos ensayos que no dependían de mí. A Nancy, Joxmer y Lenny por su vital colaboración en la culminación de ensayos de contenido de aceites y grasas, y fraccionamiento del hidrocarburo. A Carmen Marrero, directora de la Biblioteca Alonso Gamero de la Facultad de Ciencias por animarme, y por su apoyo constante en lo referente a los libros de consulta.

ÍNDICE

Introducción.....	7
Antecedentes.....	17
Hipótesis.....	27
Objetivo general.....	27
Objetivos específicos.....	27
Materiales y Métodos.....	28
Diseño experimental:	
Suelos y especies.....	28
Descripción del material botánico.....	28
Caracterización del suelo:	
a) Análisis físico de las muestras de suelo:	
a.1) Textura.....	29
a.2) Capacidad de campo.....	29
b) Análisis químico de las muestras de suelo:	
b.1) Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E.), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (% S.B.) y bases intercambiables.....	30
b.2) Fósforo disponible.....	30
b.3) Nitrógeno total.....	21
b.4) pH.....	31
b.5) Contenido de materia orgánica.....	31
Efecto de la gramínea sobre los niveles de contaminación del suelo:	
Contenido de aceites y grasas.....	33
Fraccionamiento del hidrocarburo.....	34
Respiración basal.....	35

Carbono de la biomasa microbiana.....	36
Coeficiente metabólico.....	37
Actividad de la enzima deshidrogenasa.....	37
Análisis estadísticos.....	38
Resultados y Discusión	
Caracterización del suelo	
a) Análisis físico de las muestras de suelo:	
a.1) Textura y capacidad de campo.....	39
b) Análisis químico de las muestras de suelo:	
Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E.), aluminio intercambia-	
ble, porcentaje de saturación de bases (% S.B.) y bases intercambiables,	
fósforo disponible, nitrógeno total, pH, contenido de materia orgánica.....	41
Efecto de la gramínea sobre los niveles de contaminación del suelo:	
Contenido de aceites y grasas.....	42
Fraccionamiento del hidrocarburo.....	47
Respiración basal.....	50
Carbono de la biomasa microbiana.....	53
Coeficiente metabólico.....	57
Actividad de la enzima deshidrogenasa.....	60
Consideraciones finales.....	65
Conclusiones.....	67
Bibliografía.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Variación del contenido de aceites y grasas de petróleo pesado en el suelo con <i>Megathyrus Maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control.....	42
Figura 2: Variación de cada una de las fracciones de petróleo pesado (SARA) en el suelo con <i>Megathyrus maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control.....	46
Figura 3: Variación de la respiración basal en el suelo con <i>Megathyrus maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control.....	50
Figura 4: Variación del carbono de la biomasa microbiana en el suelo con <i>Megathyrus maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control.....	54
Figura 5: Variación del coeficiente metabólico en el suelo con <i>Megathyrus maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control.....	56
Figura 6: Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el suelo con <i>Megathyrus maximus</i> , suelo mejorado sin plantas y control	60

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Proporciones de arena, limo y arcilla de las muestras de suelo.....	38
Cuadro 2: Capacidad de campo del suelo no contaminado y suelo contaminado....	38
Cuadro 3: Resultados de los análisis químicos de las muestras de suelo.....	39
Cuadro 4: Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el tratamiento TC.....	61
Cuadro 5: Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el tratamiento TP.....	62
Cuadro 6: Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el tratamiento SP.....	62

INTRODUCCIÓN

La industrialización global de los últimos 200 años ha producido una contaminación extendida del ambiente con compuestos químicos orgánicos e inorgánicos, muchos de los cuales se caracterizan por su larga vida (Gaskin y Bentham, 2010). Ya sea por planificación o accidente, el suelo es recipiente primario de una miríada de sustancias usadas en la sociedad moderna. Cada año, millones de toneladas de productos industriales, domésticos y agrícolas tienen como destino final los suelos del mundo, y una vez allí, estos productos se vuelven parte de los ciclos biológicos que afectan a todas las formas de vida, incluyendo la de la especie humana (Meagher, 2000; Brady y Weil, 2008).

La extensión y gravedad del daño debido a la contaminación de suelos, ha hecho necesaria su limpieza; es decir, la remediación de esos suelos contaminados. La diversidad química de los contaminantes vertidos ha impuesto el desarrollo de variadas tecnologías de remediación; y entre ellos, el grupo de los contaminantes orgánicos ha concentrado la atención de los investigadores, en virtud de los volúmenes vertidos y de lo imprescindible de su uso en actividades domésticas e industriales. Con base a los volúmenes de suelo a ser remediados, así como el gasto económico que generan, los más importantes contaminantes orgánicos son: a) Petróleo y sus productos derivados, b) Compuestos orgánicos clorados (PCBs, diclorobenzenos, etc.), c) Compuestos nitro aromáticos (TNT, DNT, etc.), y d) Pesticidas y sus residuos (Cunningham y col., 1996).

La remediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos es un problema mundial que consume recursos económicos tanto de las actividades que los generan, como de los gobiernos que deben velar por la buena calidad del ambiente. Los suelos contaminados con compuestos orgánicos se pueden encontrar en todos los continentes, y están asociados con frecuencia a centros poblados, áreas de manejo y

almacenaje de petróleo y áreas donde se realizan actividades manufactureras (Cunningham y col., 1996).

El petróleo es la fuente primaria de combustible para el transporte y para muchos procesos industriales de producción. Como cualquier proceso industrial a gran escala, la exploración, producción, transporte y refinación de petróleo, puede ocasionar la contaminación del suelo y del agua. Entre las principales causas de contaminación del suelo por petróleo están las fugas en tanques de almacenamiento y oleoductos, la disposición en rellenos de lixiviados de lodos de perforación y derrames accidentales o intencionales (Bossert y col., 1984). Debido a lo anteriormente mencionado, muchos países en desarrollo enfrentan serios problemas con la contaminación del suelo por compuestos orgánicos, pero las preocupaciones respecto al ambiente parecen ser un lujo, dada la situación económica en estos.

Las tecnologías comunes de limpieza del suelo varían desde procesos físico químicos hasta biológicas; sin embargo, el empleo de tecnologías basadas en procesos físico químicos con frecuencia está fuera de las posibilidades financieras de los países en desarrollo, especialmente si grandes áreas o volúmenes de suelos están contaminados. Además, con el empleo de éstas técnicas, las características físicas, químicas y biológicas del suelo pueden ser alteradas significativamente, degradando de manera irreversible su uso para propósitos agrícolas (Merkl y col., 2006). Las tecnologías biológicas o de biorremediación implican el uso de organismos (bacterias, hongos y plantas), para estabilizar o degradar contaminantes a compuestos menos tóxicos (Vivaldi, 2001). La biorremediación que emplea microorganismos únicamente puede dividirse en (Malik, 2006):

1) Biorremediación intrínseca : En este proceso las condiciones y la microflora naturales existentes, disminuyen la concentración del contaminante.

2) Bioestimulación: Este proceso implica el añadir nutrientes *in situ* o *ex situ* (agua o suelo) para estimular a los microorganismos endógenos. Los fertilizantes y suplementos para el crecimiento son estimulantes comunes.

3) Bioventilación: Es similar a la bioestimulación, pero involucra el suministro de oxígeno para estimular el crecimiento de microorganismos naturales o inoculados. Usa un bajo flujo de aire para proveer oxígeno suficiente a fin de sostener la actividad microbiana.

4) Bioaumentación: Consiste en la inoculación de microorganismos degradadores de contaminantes (naturales/ exóticos/ adaptados/ modificados genéticamente) a fin de aumentar la capacidad biodegradadora de las poblaciones microbianas naturales.

5) Biofiltros: Uso de columnas microbianas de remoción (con microorganismos enriquecidos con suelo/compost) de compuestos orgánicos volátiles.

6) Composting: Es un proceso de tratamiento aeróbico y termofílico en el cual el material contaminado es mezclado con un agente acondicionante (composta rico en microorganismos biorremediadores). Es realizada *ex situ*.

7) Landfarming: Es un tratamiento que usa técnicas agrícolas de acondicionamiento del suelo y arado a fin de estimular el crecimiento de microorganismos degradadores en el suelo contaminado. Condiciones de humedad, aireación, pH, acondicionamiento y fertilización son controladas. Puede realizarse *in situ* o *ex situ* (Malik, 2006).

Existe una técnica de biorremediación que emplea microorganismos y plantas denominada fitorremediación, y constituye una de las técnicas mas prometedoras, ya que además de reducir la contaminación, incrementa el contenido de carbono, aumenta la agregación de partículas, y por tanto mejora el drenaje (Cunningham *et al.*, 1996) y la actividad microbiana (Gaskin y Bentham, 2010). La palabra fitorremediación tiene su

origen en el prefijo Griego *phyto* (planta) unido a la raíz latina *remedium* (corregir o remover el mal). La técnica en sí, consiste en el uso de plantas y su microbiota asociada, junto con técnicas agronómicas con el fin de remover, contener o, volver inocuos contaminantes ambientales (Cunningham y col., 1996).

La fitorremediación se presenta como una solución alterna a las técnicas de descontaminación basadas en procesos físicos y químicos, pues sus costos son menores. Así, por ejemplo, los costos de remediación por técnicas basadas en procesos físicos y químicos en Estados Unidos pueden llegar a 1.000.000 \$ por hectárea para remediar hasta una profundidad de medio metro. La fitorremediación por el contrario, debido a la reducción de costos en manejo y manipulación, tiene unos costos estimados entre 2.500 y 15.000 \$ por hectárea a una profundidad de 15 cm; adicionalmente, no es una técnica degradadora y tiene un efecto rehabilitador en la estructura y ecología del suelo (Cunningham y col., 1996). Otras ventajas que ofrece la fitorremediación son:

- a) Por lo general se realiza *in situ*.
- b) Las plantas son fácilmente monitoreadas.
- c) Permite la utilización de técnicas agrícolas convencionales.
- d) Puede tratar volúmenes mayores de suelo en comparación con las técnicas basadas en procesos físicos y químicos.
- e) Es una técnica relativamente fácil de aplicar y estéticamente agradable.

Sin embargo, a la fitorremediación también se le han reconocido limitaciones, y estas son:

- a) Sólo es aplicable si la concentración del contaminante en el suelo no es tóxica para la planta.
- b) Esta limitada a la profundidad del suelo a la cual pueden penetrar las raíces.

c) Su aplicación requiere de períodos más largos que las técnicas basadas en procesos físicos y químicos.

d) El potencial de contaminación de la cadena trófica debe ser considerado.

e) La volatilización de los contaminantes a la atmósfera puede generar problemas de contaminación atmosférica.

f) Podrían necesitarse mecanismos de control de la erosión durante la fase de establecimiento de las plantas.

La fitorremediación de suelos contaminados consta de dos procesos principales: (1) fitodescontaminación y (2) fitoestabilización. La fitodescontaminación, es un proceso en el cual la concentración del contaminante es reducida a través de la acción de las plantas, su microflora asociada, y las técnicas agronómicas que se aplican al suelo. Esto implica un conjunto de procesos inherentes descritos a continuación (Cunningham y col., 1996):

a) Fitoextracción: Incorporación del contaminante al tejido de la planta, seguido por la subsecuente cosecha para la destrucción.

b) Fitovolatilización: Las plantas y la actividad de su microbiota asociada incrementan la tasa de volatilización del contaminante del suelo. La volatilización puede ocurrir desde el tallo o las raíces, así como desde la superficie del suelo.

c) Fitodegradación: Las plantas absorben el contaminante y lo metabolizan, transformándolo en un compuesto ambientalmente inofensivo.

d) Rizodegradación: Las raíces de las plantas y su microflora asociada y/o productos excretados destruyen el contaminante en la rizosfera.

La fitoestabilización consiste de procesos que disminuyen la disponibilidad biológica para receptores potenciales. Estos procesos son:

- a) Humificación: Transformación de los contaminantes e incorporación de los catabolitos al humus del suelo, resultando en una bio-disponibilidad menor.
- b) Lignificación: Los contaminantes orgánicos son atrapados de manera irreversible en los constituyentes de la pared celular.
- c) Enlace irreversible: Los compuestos se enlazan con el suelo y con ello disminuyen su disponibilidad.

Las plantas promueven la actividad y el crecimiento microbiano en la rizósfera (efecto rizosférico) regulando o alterando positivamente el ambiente del suelo (por ejemplo pH, humedad, etc.) (Cunningham y col., 1996). Así como los microorganismos se benefician de las plantas, también existe el efecto inverso, ciertas bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (plant growth promoting rhizobacteria o PGPR en inglés), tienen un efecto benéfico para las plantas, pues incrementan la tolerancia de las plantas a la contaminación con petróleo. Ellas promueven el crecimiento de las plantas, el cual resulta en una acumulación rápida de biomasa. Esto lo logran evitando la síntesis de etileno y proveyendo auxinas a las raíces, lo cual resulta en una mayor biomasa, especialmente de las raíces, y en consecuencia una remediación más rápida (Huang y col., 2005).

Debido a la penetración de las raíces en el suelo, se facilita el ingreso del oxígeno necesario para la oxidación de los contaminantes hacia zonas más profundas de éste. Por otra parte, los exudados de la raíz liberados en el suelo, sirven como sustratos fácilmente degradables por los microorganismos y pueden selectivamente aumentar el crecimiento de éstos en la rizósfera (Burken y Schnoor, 1996; Cunningham y col., 1996; Hedge y Fletcher, 1996; Chaîneau y col., 2000; White y col., 2006; Wenzel, 2009). Los sustratos liberados por las raíces en su mayoría consisten de carbohidratos, vitaminas, amino ácidos, ácidos orgánicos y nucleótidos (White y col., 2006). Además

de sustratos degradables, las raíces de las plantas también exudan enzimas y co-factores de éstas, siendo de particular interés para la fitorremediación, la dehalogenasa (transformación de compuestos clorados), peroxidasa (transformación de compuestos fenólicos), nitroreductasa (transformación de explosivos y otros compuestos nitrogenados), nitrilasa (transformación de compuestos aromáticos con cianuro) y fosfatasa (transformación de pesticidas organofosfatados) (Susarla y col., 2002).

Por décadas, la industria del petróleo ha sido un puntal en la economía venezolana; como consecuencia, la larga historia de producción de petróleo ha dejado su marca en el ambiente, especialmente en las áreas de producción y refinación. En la zona oriental, al sur de los estados Anzoátegui, Guárico y Monagas, se encuentra la Faja Petrolífera del Orinoco (FPO), donde esta actividad se desarrolla con mayor empuje, y por ende, donde se producirán los mayores problemas de contaminación de suelos con petróleo (Infante y col., 2010a).

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos que incluye una fracción saturada, una fracción aromática, asfaltenos (fenoles, ácidos grasos, cetonas, ésteres y porfirinas), y resinas (piridinas, quinolinas, carbazoles, sulfóxidos y amidas) (Atlas, 1981; Leahy y Colwell, 1990), y se clasifica según su gravedad API (American Petroleum Institute), usando como referencia la gravedad específica del agua destilada (valor expresado en grados API es 10°), en liviano (30 – 40° API), mediano (22 – 30° API), pesado (10 – 22° API) y extrapesado (< 10° API). Esta complejidad hace que el petróleo crudo no pueda ser completamente degradado por una sola cepa de microorganismos, y que su descomposición sea lograda por un grupo de microorganismos y su amplia capacidad enzimática combinada (Leahy y Colwell, 1990). La co-oxidación ocurre comúnmente en el petróleo; es decir los compuestos que no pueden ser degradados por un microorganismo en particular, pueden ser atacados por

las enzimas de otros microorganismos adaptados a crecer en compuestos diferentes pertenecientes a esa mezcla de hidrocarburos que es el petróleo (Horvath, 1972). En la FPO, la mayor reserva de crudos de Venezuela, predomina el petróleo pesado y extrapesado con un alto contenido de azufre (Merkl y col., 2006). Esta característica es importante pues la biodegradabilidad del petróleo decrece a medida que el peso molecular de los compuestos que lo forman se incrementa. Ello se explica porque la aromaticidad y el grado de condensación aumentan para las moléculas de mayor peso molecular. Consecuentemente, a pesar de su origen, mientras más pesado sea el petróleo crudo mayor será la fracción de compuestos recalcitrantes difíciles de degradar (Infante y col., 2010a).

Son pocos los ensayos de fitorremediación de suelos contaminados con petróleo realizados en Venezuela, debido a esto poco se sabe de las especies tropicales que podrían servir como fitorremediadoras de suelos contaminados con petróleo. Es por esto que mucha de la investigación se ha enfocado en determinar cuales especies de plantas, autóctonas y exóticas ya establecidas, son más aptas para este proceso (Hernández-Valencia y Mager, 2003; Merkl y col., 2005b; Brandt y col., 2006; Merkl y col., 2006). Debido al tipo de petróleo de la FPO, se está haciendo énfasis en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo pesado y extrapesado (Infante y col., 2010a). De esta manera, cualquier investigación que ayude en el proceso de selección de las especies más aptas para fitorremediar este tipo de contaminación será un aporte al manejo de los pasivos ambientales que se derivan de la actividad petrolera.

Las sabanas son uno de los ecosistemas más extensos de la geografía venezolana, comprendiendo más de un tercio de su superficie, pudiendo éstas presentar suelos bien drenados o con drenaje pobre. Las sabanas se caracterizan por el dominio de gramíneas y ciperáceas, con muy poca cobertura de plantas leñosas. Las plantas de sabana se

desarrollan bajo un clima estacional, en suelos ácidos, pobres en nutrientes y soportando la quema, intencional o natural, de manera recurrente (Hernández-Valencia y López, 2002). Las sabanas son los ecosistemas dominantes en la FPO, y debido a que la explotación de esta reserva es prioritaria para Venezuela, se consideran los ecosistemas más vulnerables a la contaminación que la explotación y transporte de petróleo acarrea. Por esta razón, se hace necesario investigar los procesos de rehabilitación en áreas de sabanas degradadas por derrames de hidrocarburos pesados y extrapesados, haciendo énfasis en aquellas especies de plantas más abundantes, más resistentes a los efectos del petróleo en el suelo, y con mayor capacidad de descontaminar al el menor costo económico posible.

Megathyrsus maximus Jacq. (gamelote) es una especie de gramínea perenne, característica de zonas cálidas tropicales y subtropicales, oriunda de África. Crece en haces o manojos, con alturas entre 0,5 y 3,0 m y posee rizomas cortos. Esta adaptada a una gran variedad de suelos, principalmente aquellos con buen drenaje, aunque algunas variedades son tolerantes a suelos con mal drenaje. Según la variedad, puede ser plantada en zonas con precipitaciones anuales menores a los 800 mm ó superiores a los 1000 mm; sin embargo no toleran períodos de sequía superiores a los cuatro o cinco meses. Crece bien a plena luz del sol, pero los mejores rendimientos se han producido bajo una sombra del 30 % (Usberti y Jain, 1979; Cook y col., 2005). En Venezuela, a esta especie se le observa creciendo en áreas intervenidas, como son las áreas urbanas, bordes de carretera y predios abandonados, además de pastizales en donde se ha establecido para cría de vacunos. Estas condiciones sugieren que la especie puede ser tolerante a la contaminación por petróleo y el manejo del suelo que requieren las labores de fitorremediación.

Con base a lo anteriormente expuesto, el presente estudio evaluará la capacidad remediadora de *Megathyrsus maximus* en suelos contaminados con petróleo pesado, en lo que respecta a la capacidad que tiene la planta para estimular la actividad microbiana, y con ello la disminución del contenido de petróleo del suelo. La selección de esta gramínea que es utilizada como forraje, se debe a: a) rápido crecimiento, b) sus semillas son accesibles en gran número y comercialmente, c) sus raíces son fasciculadas, lo que permite un desarrollo más homogéneo en el suelo, d) los requerimientos agronómicos son ampliamente conocidos y e) se desarrolla en ambientes perturbados donde tolera la sequía y el fuego.

ANTECEDENTES

Numerosos estudios sobre la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo han sido conducidos en las zonas templadas con especies adaptadas a estas condiciones. En las zonas tropicales y subtropicales han sido escasos los ensayos de fitorremediación realizados, pese a que en estas zonas las condiciones climáticas favorecen el crecimiento de las plantas y la actividad de los microorganismos en la zona de la rizósfera, siempre y cuando el agua y los nutrientes sean suministrados en cantidades adecuadas (Infante y col., 2010b). Estudios en ambientes tropicales han mostrado que las plantas favorecen la remoción de aceites y grasas en suelos contaminados con petróleo, como en el caso del pasto *Brachiaria birzantha* (Hochst. Ex A. Rich) Stapf (Hernández-Valencia y Mager, 2003; Merkl y col., 2005a, b; Merkl y Schultze-Kraft, 2006; Mager y Hernández-Valencia, 2013). Como la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo se debe a un efecto compuesto de plantas y microorganismos, esta técnica puede ser particularmente efectiva en los trópicos, dadas las condiciones de alta radiación solar y temperaturas de esta zona (Merkl y col., 2004).

Rivera-Cruz y col., (2003), en el Edo. Tabasco en México, realizaron ensayos con el fin de descontaminar suelos con petróleo crudo utilizando microorganismos autóctonos y *Echinocloa polystachya* (pasto alemán). Estos investigadores querían determinar si la rizosfera de *E. polystachya*, junto con hidrocarburos de petróleo, modifican el tamaño de las poblaciones de bacterias y hongos. Por otra parte, también se quería demostrar si la inoculación de bacterias y hongos en suelos con rizósfera del pasto alemán reducía la concentración de hidrocarburos del petróleo, así como la respuesta de producción de biomasa del pasto alemán al inóculo de bacterias en suelos. Las bacterias y hongos utilizados fueron recolectados de la rizósfera de pasto alemán que crecía en campos peroleros, y fueron seleccionados porque se aclimataron y

crecieron *in vitro* en sustratos enriquecidos con 100000 mg de petróleo liviano por kg de suelo.

A los 120 días, encontraron que el petróleo y el sistema rizosférico de *E. polystachya* habían incrementado las poblaciones de bacterias, atribuyendo este incremento a la mayor disponibilidad de carbono y nitrógeno; además por la adaptación de las bacterias autóctonas que ellos habían previamente cultivado. Cuando estas bacterias se asociaron con hongos, sus poblaciones disminuyeron y las de hongos aumentaron, producto de las relaciones bacteria-hongo, en las que el hongo obtenía beneficios por las relaciones de parasitismo o depredación. Este consorcio o asociación bacteria-hongo ocasionó en el suelo rizosférico una significativa reducción de los hidrocarburos de petróleo.

En Venezuela, Hernández-Valencia y Mager, (2003), evaluaron el uso de *Megathyrsus maximus* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano en ensayos de invernadero utilizando semillas certificadas. También evaluaron la actividad microbiana durante el proceso de fitorremediación, mediante ensayos para determinar la actividad de la enzima deshidrogenasa y el contenido de carbono microbiano. Para ello establecieron tres tratamientos en suelos contaminados con un crudo liviano al 3 % (p/p), de los cuales en uno se sembró *M. maximus*, en otro *B. brizantha* y un control sin plantas. Todos los tratamientos fueron encalados y fertilizados para disminuir la acidez y favorecer el desarrollo, tanto de plantas como de los microorganismos del suelo. Una vez preparados los suelos sembraron semillas de cada especie en los envases correspondientes, manteniéndose el suelo al 60 % de su capacidad de campo, mediante riego. Se tomaron muestras al azar de cada contenedor al inicio, 30, 60, 120 y 240 días, las cuales permanecieron refrigeradas hasta el inicio de los análisis.

Al término del ensayo, 240 días, la concentración de aceites y grasas fue inferior en los suelos tratados con las gramíneas, mostrando que estas especies poseían capacidad para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *M. maximus* redujo el contenido inicial de aceites y grasas en un 63 %, *B. brizantha* en un 55 %, mientras la reducción del control fue de 40 %. Cuando compararon en valores absolutos la concentración final de aceites y grasas fue de 1,0; 1,2 y 1,6 % para *M. maximus*, *B. brizantha* y el control respectivamente, siendo estadísticamente diferentes todos los tratamientos.

La actividad de la enzima deshidrogenasa mostró un máximo a los 30 días para los tratamientos con plantas, y a los 60 días para el control. Se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos a los 120 y 240 días, siendo mayor la actividad enzimática en *B. brizantha* que en *M. maximus*, y ambos superiores al control.

El carbono microbiano mostró la misma tendencia en todos los tratamientos, con un incremento de biomasa hasta los 60 días del inicio del ensayo, y posteriormente una reducción hasta los 240 días; no encontrándose diferencias significativas entre éstos. Los investigadores explicaron la ausencia de diferencias entre los tratamientos debido a la gran variabilidad de la data.

En el año 2004, Merkl y col., estudiaron el efecto del petróleo pesado sobre la germinación y la producción de biomasa de dos especies de gramíneas (*Brachiaria brizantha* y *Megathyrsus maximus*) y seis especies de leguminosas (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Desmodium glabrum*, *Mimosa orthocarpa*, *M. camporum* y *Stylosanthes capitata*), seleccionadas por crecer de manera natural en áreas contaminadas con el hidrocarburo en las sabanas orientales de Venezuela. Para ello evaluaron la germinación y sobrevivencia de semillas sembradas, así como longitud del

vástago, longitud de la raíz y producción de biomasa en suelos de sabanas con petróleo pesado en concentraciones de 3 y 5 % (p/p).

De las especies probadas, sólo *D. glabrum* mostró una disminución significativa de germinación de 89 % y 88 % con respecto al control, tanto a 3 % como a 5 % de contaminación respectivamente. También *C. mucunoides* exhibió una reducción en la germinación en ambos niveles de contaminación, pero para el resto de las especies, la contaminación no tuvo un efecto significativo. *M. camporum* y *S. capitata* tuvieron una proporción de germinación excepcionalmente baja en los suelos contaminados y en los controles.

La longitud del vástago para la mayoría de las especies fue reducida significativamente; no obstante, el incremento en la concentración de 3 % a 5 % no causó una disminución adicional. *D. glabrum* mostró una correlación lineal negativa entre largo del vástago y concentración de petróleo. También se halló una correlación significativa para *B. brizantha* y *M. maximus* con respecto al nivel de contaminación. Para *M. orthocarpa* sólo la concentración del 5 % causó una ligera reducción en el largo del vástago.

En cuanto a longitud de la raíz, se halló una reducción significativa en suelo contaminado para todas las leguminosas, excepto para *D. glabrum* y *M. camporum*. Una diferencia significativa, por efecto de concentración de petróleo entre 3 % y 5 %, fue encontrada para *C. brasilianum*. Solamente la concentración más alta afectó el crecimiento de raíz de *M. orthocarpa* y *S. capitata* mostró una alta correlación entre concentración de petróleo y longitud de raíz.

La producción de materia seca (biomasa de vástago y raíz) de vástago y raíz de todas las especies fue significativamente más baja en suelo contaminado que en suelo no contaminado, excepto para la biomasa de raíz para *C. mucunoides*. Las especies más

afectadas, con sólo 15 % a 18 % de la biomasa del control, fueron *M. maximus*, *S. capitata* y *B. brizantha*. La biomasa más alta se observó en *C. mucunoides* con una reducción de 19 % y 27 %, en 3 % y 5 % de contaminación de petróleo crudo, respectivamente. Finalmente estos investigadores concluyeron que las especies *B. brizantha*, *C. brasilianum* y *C. mucunoides*, merecen ser mas estudiadas con respecto a su uso en fitorremediación.

Merkl y col. (2005a) determinaron la influencia del petróleo crudo pesado sobre las características morfológicas de las raíces de graminoideas en suelos contaminados. Para el ensayo se utilizaron tres especies *Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus* y *Eleusine indica*, las cuales fueron sembradas en suelo contaminado con petróleo pesado al 5 % (p/p). Estos investigadores evaluaron la longitud de la raíz, el área superficial, el volumen de raíz y el diámetro promedio de la raíz. Estas variables se relacionaron con el peso seco de la raíz, con el fin de obtener la longitud específica, superficie de área específica y volumen específico de raíz. Además de determinar el efecto de la contaminación sobre la morfología radical, también evaluaron cual especie reducía más el contenido de petróleo pesado en el suelo contaminado. Transcurridos 90 días, encontraron que para *B. brizantha*, la longitud específica tendía a ser ligeramente menor, mientras que área superficial, volumen específico y diámetro promedio eran mayores en comparación con el control. Las diferencias fueron significativas con un menor diámetro promedio con respecto al control para *C. aggregatus*. Para *E. indica*, no se hallaron diferencias significativas. Tanto *B. brizantha* como *C. aggregatus* alcanzaron una mayor degradación de petróleo que el control, mientras que *E. indica* no mostró diferencia significativa alguna entre los suelos contaminados y sus controles.

Si bien la morfología radical de *B. brizantha* y *C. aggregatus* fué mas afectada debido a la alteración de las características físicas y químicas del suelo contaminado, en

comparación con los controles, esto no las descartaría como candidatos para la fitorremediación, pues bajo estos tratamientos se logró una mayor degradación del petróleo comparada con los suelos no plantados. Por último, este estudio demostró que los hidrocarburos de petróleo alteran la biomasa y la estructura de las raíces, y en consecuencia el volumen de las raíces que pueden catalizar la descontaminación de los suelos.

Luego de evaluar el efecto del petróleo en el crecimiento de plantas tropicales, Merkl y col. (2005b) procedieron a realizar ensayos de fitorremediación con las especies seleccionadas en su trabajo anterior (2005a) con el objetivo de determinar el desempeño de las mismas en suelos contaminados con petróleo pesado y mejorar la degradación de éste. Con este fin en mente, mezclaron suelos de las sabanas orientales de Santa Bárbara, Edo. Monagas (Venezuela), con petróleo pesado al 5 % (p/p). Tres especies de leguminosas (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum* y *Stylosanthes capitata*) y tres especies de gramíneas (*Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus* y *Eleusine indica*) fueron establecidas tanto en suelos contaminados y no contaminados, además de un control sin plantas. La toma de muestras de plantas y suelos se realizó a los 90 y 180 días, para determinar producción de biomasa, contenido total de aceites y grasas y, análisis de fracción (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos). A diferencia de los resultados del trabajo anterior, todas las leguminosas murieron entre las seis y ocho semanas del tratamiento, siendo esto atribuido a una duración mayor del experimento, la forma de los contenedores y al exceso de fertilizante.

La producción de biomasa fue significativamente reducida en suelo contaminado, excepto para *E. indica*, después de 180 días. *B. brizantha* tuvo la producción de biomasa más alta, para vástago y raíz, al final del experimento en suelo contaminado y no

contaminado; sin embargo, el crecimiento de las raíces fue sumamente afectado cuando se le comparó con el control no contaminado. Después de 90 días el crecimiento del vástago de *C. aggregatus* mostró la mayor inhibición debida a la contaminación; no obstante, se recuperó hacia el final del experimento. *E. indica* tuvo la mayor biomasa de vástago y raíz a los 90 días, pero transcurridos 180 días, ambos valores no mostraron un incremento.

El contenido de aceites y grasas totales, mostró una influencia significativa de las plantas en la degradación del petróleo en ambas fechas de muestreo. También hubo un efecto significativo de la especie de planta en el contenido total de aceites y grasas. Así, los suelos plantados con *B. brizantha*, exhibieron concentraciones mas bajas de aceites y grasas que los controles a los 90 y 180 días.

Si bien *B. brizantha* fue la gramínea mas afectada, al final del experimento tenía el mayor valor de biomasa en vástago y raíz. Basados en estos resultados, *B. brizantha* fue considerada como una especie prometedora para fitorremediación de suelos contaminados con petróleo, pues mostró la mayor producción de biomasa, además de producir la más alta disipación de petróleo comparada con el suelo no plantado.

En el año 2006, Merkl y col. evaluaron el efecto de *B. brizantha*, en las poblaciones microbianas y su actividad, en suelos contaminados con 5 % de petróleo pesado, además de determinar si estas diferían de suelos no plantados. Esta especie fue seleccionada en base al trabajo anterior, en el cual exhibió los valores más altos de producción de biomasa y degradación de petróleo en suelos contaminados. El objetivo de este ensayo era aclarar si la cantidad de microorganismos y su actividad, diferían entre suelos contaminados con petróleo pesado, y plantados con *B. brizantha*, y suelos contaminados y sin plantas. Además, también evaluó si las poblaciones microbianas se

correlacionaban con la declinación de hidrocarburos de petróleo encontrada en ensayos anteriores.

Para el muestreo los investigadores distinguieron dos zonas: la rizósfera y la zona alejada de la rizósfera. En cada una de estas zonas contaron bacterias y hongos degradadores mediante técnicas de microbiología, y midieron la respiración del suelo inducida por sustrato (SIR) y el pH. Transcurridas 30 semanas hallaron significativas diferencias en el número de hongos y degradadores de petróleo crudo en el suelo de la rizósfera respecto a suelos alejados de la rizósfera o suelos no plantados. En cuanto a la respiración del suelo, la rizósfera siempre tuvo actividad microbiana menor que el suelo no plantado o que el suelo alejado de la rizósfera. El pH fue menor en suelos plantados con la gramínea respecto a suelos no plantados, y atribuyeron esta diferencia a la acumulación de ácidos orgánicos debida a una mayor actividad metabólica de las bacterias y hongos en los suelos plantados. Los investigadores hallaron una alta correlación entre los valores de pH y la respiración microbiana, y esta disminución en el pH afecta la actividad microbiana en el proceso de degradación de hidrocarburos y se reflejó en una menor respiración en la rizósfera. Los autores también encontraron que la regulación del pH dentro de las condiciones de neutralidad mejoraría el desempeño de bacterias y hongos.

En el año 2012 Navas evaluó la capacidad fitorremediadora de *Megathyrus maximus* en suelos de sabanas contaminados con petróleo extrapesado. Para ello sembró plantas de la especie en suelos contaminados al 5 % con petróleo extrapesado, y mejorado con cáscara de arroz y fertilizado. Como controles se usó el mismo tipo de suelo contaminado, pero sin plantas. Los parámetros evaluados fueron el contenido de aceites y grasas, y el fraccionamiento del crudo. Adicionalmente, también se evaluó el efecto que la planta tiene en la población microbiana mediante la determinación de la

respiración basal, carbono de la biomasa microbiana, coeficiente metabólico y actividad de la enzima deshidrogenasa. Al finalizar el ensayo de 120 días, encontró que esta especie mostró capacidad para fitorremediar, pero requiere de un período superior a la duración del ensayo para alcanzar el límite de limpieza establecido por la legislación venezolana. También halló que la planta tuvo una influencia beneficiosa sobre los microorganismos, pues la respiración basal, el carbono de la biomasa microbiana, y la actividad de la enzima deshidrogenasa mostraron valores superiores en presencia de la planta. El coeficiente metabólico exhibió valores inferiores al control, pero se explica porque en presencia de esta especie hay una mayor población de microorganismos, que en los envases sin plantas.

En la búsqueda de procesos de limpieza del suelo más eficientes, se han creado sistemas más complejos que involucran diferentes técnicas de biorremediación que se implementan de manera secuencial, o en fases, conocidas como “sistemas multiprocesos”. En el año 2005, Huang y col. realizaron una biorremediación por fases implementando un sistema de fitorremediación por multiprocesos (multiprocess phytoremediation system, MPPS) para descontaminar suelos con hidrocarburos de petróleo (50 g/kg de lodos de refinería). El MPPS constó de varias fases; primera, landfarming; mezclando el suelo dos veces por semana durante 15 días, la segunda bioaumentación, consistente en la inoculación al suelo de un cultivo de bacteria degradadora y por último la fitorremediación mediante la siembra de semillas de *Festuca arundinacea* a los 20 días, previamente tratadas con dos cepas de bacterias promotoras del crecimiento (plant growth promoting rhizobacter, PGPR). Este MPPS fue comparado con tratamientos consistentes únicamente de, landfarming, biorremediación y fitorremediación. Se tomaron muestras del suelo y de las plantas al inicio, 30, 60, 90, 120 y 240 días. A las cuales se les determinó el contenido de aceites y

grasas y así como su toxicidad con el uso del colémbolo (*Onychiurus folsomi*). Transcurridos 120 días, todos los tratamientos, landfarming, bioaumentación, fito remediación y MPPS, fueron realizados nuevamente en sucesión por otros 120 días. Una vez finalizado el ensayo la reducción de la concentración de hidrocarburos fue menor en los suelos que fueron tratados sólo con un proceso, siendo la reducción del landfarming 20 %, segundo la biorremediación con 40 %, tercero la fitorremediación con 55 % y MPPS con 90%. Por su parte, los ensayos de toxicidad demostraron que el suelo de landfarming todavía era tóxico para *O. folsomi*, al igual que el suelo del tratamiento fitorremediador también afectaba la germinación de las plantas, mientras que los suelos de MPPS no eran tóxicos y no afectaron la germinación de *F. arundinacea*.

HIPÓTESIS

La especie *Megathyrsus maximus* posee capacidad para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo pesado.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad fitorremediadora de *Megathyrsus maximus* en suelos de sabana contaminados con petróleo pesado al 5%.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de *Megathyrsus maximus* para reducir el contenido de aceites y grasas en un suelo contaminado con crudo un pesado al 5%.
2. Evaluar como cambian las diferentes fracciones del hidrocarburo por el establecimiento de *Megathyrsus maximus* durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo pesado al 5 %.
3. Evaluar los cambios en indicadores de la actividad microbiana, tales como el C microbiano y la respiración basal por el uso de *Megathyrsus maximus* durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo pesado al 5%.

MATERIALES Y MÉTODOS

Suelos y especies vegetal utilizados:

Los suelos utilizados para los ensayos pertenecen al horizonte A de un Typic Haplustox proveniente de la localidad de El Sombrero, Edo. Guárico. Los ejemplares de *Megathyrsus maximus* fueron colectados en los alrededores del Instituto de Zoología y Ecología Tropical (I.Z.E.T.), seleccionando ejemplares que tenían una altura de entre 25 y 30 cm.

Descripción del material botánico:

Inicialmente el proyecto fue diseñado para evaluar la capacidad fitorremediadora de la gramínea *Hyparrhenis rufa*; sin embargo, los ejemplares trasplantados en suelos contaminados no sobrevivieron, y se descartó el uso de esta especie. Por esta razón se decidió cambiar a la especie *Megathyrsus maximus*, la cual ha sido evaluada en ensayos anteriores, demostrando su capacidad de tolerar y fitorremediar, suelos contaminados con hidrocarburos extrapesados a concentraciones iguales a las del presente ensayo (Navas, 2012).

Megathyrsus maximus Jacq. es una gramínea perenne perteneciente a la familia Poaceae, que forma haces o manojos, pudiendo alcanzar hasta los tres metros de altura y 1,5 metros de diámetro; de tallos erectos y ascendentes, con vena central pronunciada; cuyas raíces son largas y fibrosas, las cuales forman rizomas ocasionalmente, pudiendo soportar niveles moderados de sequía (Cook y col., 2005).

Caracterización del suelo:

Las muestras de suelo se analizaron por triplicado con el fin de obtener información acerca de sus características físicas y químicas utilizando la metodología descrita por Anderson e Ingram (1992). Los análisis realizados fueron del tipo físico y químico.

a) Análisis físico de las muestras del suelo.

a.1) Textura.

Para estimar el contenido de arenas, limos y arcillas se aplicó el análisis mecánico de Bouyoucos a las muestras de suelo. Se tomaron 50 g de suelo seco y tamizado (partículas < 2 mm), se mezclaron con 125 ml de agua destilada y con 50 ml de solución de pirofosfato de sodio 0,02 N. La mezcla se agitó por 10 minutos en una batidora eléctrica, para luego trasvasarla a un cilindro graduado de 1000 ml y enrasado con agua destilada. Posteriormente se tapó el cilindro, se invirtió su contenido cuidando de no derramarlo para suspender todas las partículas y se dejó en reposo. Se realizaron mediciones de temperatura y densidad a los 40 segundos y 5 horas en reposo, utilizando para ello un termómetro y un hidrómetro previamente calibrado.

Las proporciones de arenas, limos y arcillas fueron determinadas por medio de las siguientes ecuaciones:

$$\% \text{ Arenas} = 100 - \frac{(\text{lectura corregida a los 40 segundos}) \times 100}{\text{Peso seco de la muestra}}$$

$$\% \text{ Arcillas} = \frac{\text{lectura corregida a las 5 horas} \times 100}{\text{Peso seco de la muestra}}$$

$$\% \text{ Limo} = 100 - (\% \text{ arcilla} + \% \text{ arena})$$

a.2) Capacidad de campo:

Este parámetro se determinó tanto para suelo no contaminado como para suelo contaminado. Para el suelo no contaminado se tomaron 20 g de suelo seco y tamizado (partículas < 2 mm), se colocaron en un embudo con papel filtro Wattman # 2, previamente humedecido con agua colocado sobre un matraz, y se pesó el conjunto. Posteriormente, se añadió por goteo agua destilada utilizando una bureta hasta que la primera gota cayó del suelo en el matraz. Se anotó el volumen utilizado, se tapó el

embudo junto con el matraz con plástico y se dejó reposar por tres días alejado de la luz directa del sol. Transcurrido este período se pesó el conjunto. La cantidad de agua retenida por el suelo constituye su capacidad de campo.

En cuanto al suelo contaminado, se preparó una mezcla de 85 % de suelo, 10 % de cáscara de arroz y 5 % de crudo. De esta mezcla se tomaron 20 g y se realizó el mismo procedimiento para determinar la capacidad de campo del suelo contaminado.

b) Análisis químico de las muestras de suelo.

b.1) Capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (% SB) y bases intercambiables.

Se utilizó el método de extracción con acetato 1 M a un pH de 7,0 para determinar los cationes intercambiables, y la concentración de éstos a través de espectrofotometría de absorción atómica. El contenido de aluminio intercambiable se determinó por medio de una titulación con hidróxido de sodio 0,1 M, previa lixiviación del aluminio de la muestra con cloruro de potasio 1M. Con estos resultados se obtuvo la capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E.) y el porcentaje de bases (SB) mediante las ecuaciones:

$$\text{CICE} = \Sigma \text{concentración de cationes intercambiables}$$

$$\text{SB} = ((\Sigma \text{cationes básicos})/\text{C.I.C.E.}) * 100$$

b.2) Fósforo disponible.

A través del método vanadato-molibdato, se extrajo el P disponible a 2g de suelo seco y tamizado (partícula < 2 mm), mediante una solución extractora de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 0,5 M a un pH de 8,5; luego se mantuvo en agitación por 30 minutos. Se transfirieron 6 ml del extracto a un balón aforado de 50 ml, se agregó una gota de p-nitrofenol y se ajustó el pH con HCl y NaOH 5 N. Luego se agregaron 8 ml del reactivo

B y se enrasó con agua destilada. Al desarrollar el color se midió la absorbancia a 880 nm.

b.3) Nitrógeno total.

La determinación se realizó siguiendo la técnica de oxidación de Kjeldahl. Para ello se tomó una muestra de 0,2 g de suelo seco y tamizado (partícula < 0,15 mm), la cual fue sometida a digestión en una mezcla de H₂SO₄ concentrado y H₂O₂ a 360° C durante dos horas. Posteriormente se destiló el extracto y tituló con HCL 0,01 N, utilizando como indicador rojo de metilo y verde bromocresol. El porcentaje de N total se calculó por medio de la fórmula:

$$\% \text{ N} = \frac{(\text{valoración del destilado} - \text{valoración del blanco}) \times \text{Molaridad del HCl} \times \text{M}}{\text{Peso de la muestra}}$$

b.4) pH.

Una suspensión 1:2,5; suelo: agua fue preparada, utilizando 6 g de suelo seco y tamizado (< 2 mm) y 15 ml de agua destilada, se agitándose por 30 minutos. Luego se dejó reposar por 30 minutos más y se determinó el pH con un electrodo de vidrio.

b.5) Contenido de materia orgánica.

Se tomó una muestra de 0,5 g de suelo seco y tamizado (< 0,15 mm), se añadieron 2 ml de K₂Cr₂O₇ al 8 % y 3 ml de H₂SO₄ concentrado, y se sometió a una digestión húmeda a 150 °C por 30 minutos. Al enfriarse la muestra se añadieron 10 ml de agua destilada y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se trasvasaron las muestras a celdas de cuarzo y se midió su absorbancia a 650 nm. Por medio del factor de Van Bemmelen (1,724) se obtuvieron los valores de CO a materia orgánica, mediante la ecuación:

$$\% \text{ MOS} = \% \text{ CO} \times 1,724$$

Evaluación de la capacidad de *Megathyrus maximus* para reducir el contenido de aceites y grasas en suelos contaminados con crudo pesado:

Para este estudio se establecieron tres tratamientos:

TP: Este tratamiento permitiría establecer el efecto de *Megathyrus maximus* sobre la concentración de aceites y grasas en el suelo. Ello se evaluó mediante la siembra de plantas de esta especie en 2000 g de una mezcla consistente de 85 % de suelo, 10 % de cáscara de arroz, utilizada como acondicionador de suelo, fertilización y petróleo pesado reformulado hasta alcanzar una concentración del 5 %. Este petróleo reformulado se obtuvo de mezclar petróleo extrapesado y petróleo mediano en proporciones establecidas por algoritmo determinado por PDVSA – INTEVEP (Zamora, 2006).

SP: Un segundo tratamiento permitiría estimar los cambios en la concentración de aceites y grasas en ausencia de *M. maximus*. Este tratamiento consistió de una mezcla idéntica a la de los envases con *M. maximus*; 2000 g de mezcla con 85 % de suelo, 10 % de cáscara de arroz, fertilización y petróleo pesado reformulado hasta alcanzar una concentración del 5 %, pero sin plantas.

TC: por último se estableció un tratamiento control, en donde se evaluó el cambio en la concentración de aceites y grasas en el suelo contaminado al 5 %, sin plantas, cáscara de arroz ni fertilizantes. Este control constaba de 2000g de una mezcla de suelo en un 95 %, y petróleo pesado reformulado en un 5 %.

Los tratamientos y el control fueron depositados en envases cilíndricos de PVC de 30 cm de alto y 10 cm de diámetro. Para cada tratamiento se establecieron 5 réplicas, obteniendo un total de 15 unidades experimentales.

Los primeros ejemplares de *M. maximus* trasplantados no resistieron la contaminación inicial y murieron, por lo que se decidió realizar un proceso de bioestimulación en todos los tratamientos en los primeros 30 días. Esta bioestimulación consistió en sacar el suelo de su envase y extenderlo en una capa uniforme no mayor a dos cm, y cubrirlo con un plástico para conservar la humedad, regarlo y removerlo a los 15 días. Una vez finalizada esta fase, los suelos se retornaron a los envases y se trasplantaron las plantas nuevamente en el tratamiento TP.

Como los suelos de sabanas, al igual que los suelos contaminados, suelen presentar deficiencias en nitrógeno y fósforo, (Cawenberghe y Roote, 1998), sólo a los suelos de los tratamientos con la mezcla de cáscara de arroz (TP y SP) recibieron fertilización de C:N:P en una relación 100:2:0,2 (Hutchinson y col., 2001), utilizando como fuentes de nutrimentos N:P:K (15:15:15) y urea. La fertilización se incorporó un 50% al comienzo del ensayo, un 25% a los 30 días, y otro porcentaje igual a los 60 días. A las plantas se les suministró agua semanalmente, si se consideraba que necesitaban agua, manteniendo el suelo al 50 % de su capacidad de campo.

Se colectaron muestras de suelo al inicio, 15, 30, 60, 90, 120 y 180 días de iniciado el ensayo. A cada muestra se le practicaron los siguientes análisis:

Contenido de aceites y grasas.

Para la determinación del contenido de aceites y grasas se utilizó el protocolo de EPA 3540 (EPA 1986). Como extractante se empleo di-clorometano. Para ello se pesaron 20 g de suelo seco, y se colocaron en un dedal de celulosa, luego se colocó la muestra en un extractor de solvente con 80 ml del extractante por 60 minutos. Una vez obtenido el extracto, se permitió la evaporación del diclorometano, quedando como residuo remanente, los aceites y grasas extraídos del suelo. El contenido de aceites y grasas fue calculado mediante la fórmula:

$$\% \text{ A y G} = \frac{P_f - P_o * 100}{P_m}$$

En la cual:

Pf: Peso final del envase colector

Po: Peso inicial del envase colector

Pm: Peso de la muestra del suelo contaminado

Este método no permite discriminar entre aceites y grasas de origen biológico de aquellos provenientes del petróleo. Sin embargo, como el contenido de materia orgánica de estos suelos es muy bajo, se puede considerar que la mayor contribución de aceites y grasas en el suelo proviene de los aportes del petróleo utilizado.

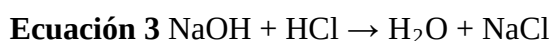
Fraccionamiento del hidrocarburo.

La realización de este ensayo permite determinar el contenido de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), que son las distintas fracciones que componen el petróleo. Muestras del suelos, colectadas al inicio y al final del ensayo, fueron procesadas según el método 5520 (APHA, 1992). Se tomaron 10 g de suelo y se colocaron en un extractor de solventes con 80 ml de n-heptano por 30 minutos, con el fin de separar los saturados, aromáticos y resinas (SAR), luego se permitió la evaporación del n-heptano, se pesó el extracto obtenido y se sembró en una columna de silica gel y hexano, separando con tolueno los aromáticos y con metanol las resinas. Cada extracción se realizó por separado, en envases previamente pesados; calculando, por diferencia de peso, los saturados (peso del SAR se determinó antes). Como último paso se extrajeron los asfaltenos, con diclorometano en el extractor por 30 minutos, dejando evaporar el extractante y pesando el envase.

Respiración basal.

Al consumir el carbono que forma parte del petróleo, los microorganismos lo asimilan y metabolizan, luego parte de éste carbono se oxida durante la respiración, utilizando oxígeno como aceptor final de electrones y formando CO₂, el cual es liberado a la superficie. Midiendo cuánto CO₂ se libera se puede cuantificar la actividad metabólica de los microorganismos del suelo.

El CO₂ liberado por los microorganismos durante el proceso de degradación de los hidrocarburos, fue determinado como respiración basal mediante el protocolo de Alef y Nannipieri (1995), utilizando una alícuota de suelo de 25 g (peso seco) proveniente de cada una de las réplicas de los tratamientos, que previamente se mantenían refrigeradas (< 4 °C), y a 50 % de la capacidad de campo. Estas muestras se colocaron en un envase de vidrio cerrado herméticamente junto con 10 ml de NaOH 0,5 M, el cual sirvió como solución trampa del CO₂. El envase contentivo de vidrio se incubó en la oscuridad a 25° C por 72 horas, permitiendo la captura de CO₂ por la base (ver ecuación 1). Una vez finalizado el período de incubación, se extrajeron los envases y se añadió 3 ml de BaCl₂ a los envases con NaOH, para obtener el carbonato proporcional al CO₂ fijado (ecuación 2), y el NaOH restante se tituló con HCl 0,5 M, utilizando fenolftaleína (ecuación 3).



El cálculo del CO₂ fijado se hizo a través de la siguiente fórmula:

$$\text{mg CO}_2 / \text{Kg suelo} \cdot \text{h} = (\text{ml HCl blanco} - \text{ml HCl muestra}) \times \text{Molaridad} \times 22 \times (10/2) \\ \times (100/25) \times (\text{Kg suelo seco} / \text{Kg suelo húmedo}) / \text{horas}$$

Carbono de la biomasa microbiana.

Mediante este ensayo se puede estimar como influyen los diferentes tratamientos sobre la biomasa del carbono contenida en los microorganismos del suelo. Dado el papel vital que juegan los microorganismos en la disminución de la concentración de petróleo en el suelo, es importante estimar su biomasa, y monitorear como ésta varía durante el proceso de descontaminación.

La determinación de la biomasa del carbono microbiano se realizó de acuerdo al método de Anderson y Domsch (1978, 2010), el cual fue calibrado por estos investigadores por el de fumigación-extracción de Vance y col. (1987).

Se tomaron 25 gramos de suelo fresco (a la humedad de campo o ajustados al 60-70 % de la capacidad de campo) por triplicado para cada serie de tiempo, se le añadieron 1 ml de solución de glucosa al 8 %, y se dejaron a temperatura ambiente por dos horas. Una vez transcurrido este tiempo, se midió la emisión de CO₂ durante 4 horas, con el mismo método utilizado para estimar la respiración basal. La única diferencia fue que tanto las soluciones de HCl como las de NaOH fueron mas diluidas (0,05 M).

La cantidad de CO₂ emitida por el suelo fue calculada por medio de la siguiente fórmula:

$$\frac{(BW - VP) \times 1,1 \times 100}{4 \times EW} = \frac{\text{mg de CO}_2}{100 \text{ g PS} \times \text{h}}$$

Para un coeficiente de respiración se cumple que:

$$1 \text{ mg de CO}_2 / 100 \text{ g PS} \times \text{h} = 20,6 \text{ mg C} - \text{biomasa} / 100 \text{g PS}$$

donde:

BW: promedio del consumo de HCl del blanco o control (ml)

VP: promedio del consumo de HCl de la muestra (ml)

1,1 Factor: 1 ml de HCl 0,05 M equivale a 1,1 mg de CO₂

4: tiempo de incubación

EW: peso del suelo seco (g)

Coeficiente metabólico.

Una vez determinada la respiración basal y estimado el carbono microbiano, se calculó la relación entre estas dos variables, conocida como coeficiente metabólico ($q\text{CO}_2$):

$$q\text{CO}_2 = \text{RB} / C_{\text{mic}}$$

Este indicador es una medida del uso eficiente del carbono del suelo y de las condiciones de stress al cual pueden estar sometidos los microorganismos (Anderson y Domsch, 1993).

Actividad de la enzima deshidrogenasa.

La oxidación de sustancias orgánicas en condiciones aeróbicas se debe a actividades enzimáticas, y ocurre, por lo general, mediante un proceso de deshidrogenación catalizado por la deshidrogenasa (Alef y Nannipieri, 1995). La actividad de esta enzima es intracelular, por lo tanto la medición de su actividad es un indicador directo de la actividad microbiana (García y Hernández, 1997).

Se utilizó el método de Casida et al. (1964, modificado en 1977), para determinar la actividad de esta enzima, el mencionado método se basa en la tasa de reducción del cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) a trifenil formazán (TPF), éste forma un precipitado de color rojo, insoluble en agua, pero soluble en solventes orgánicos.

Se tomaron 1,5 g de suelo (peso seco), y se colocaron en tubos de ensayo junto con 0,25 ml de TTC al 3 %, 0,05 g de CaCO_3 y 2,5 ml de agua destilada. Se incubó la muestra por 24 horas a 37°C , se añadieron 2,5 ml de CH_3OH , se agitó durante un minuto; se filtró la muestra, se añadieron 25 ml de CH_3OH y se midió la absorbancia a 485 nm. Luego se determinó la concentración de TPF por medio de una curva de

calibración, cuyos patrones fueron preparados a partir de una solución estándar de TPF (1 mg/L). La actividad de la enzima se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$AD = \frac{\mu\text{g TPF/ml} * 25}{1,5 \text{ g suelo}}$$

Análisis estadísticos.

Los resultados de los tratamientos evaluados fueron comparados mediante un análisis de varianza de dos factores y comparaciones a posteriori Fisher LSD (Least Significant Difference), con un nivel de significancia de 0,05. Además se realizó un análisis de correlación lineal entre tratamientos, todos ello empleando el software PAST.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del suelo:

a) Análisis físico de las muestras de suelo:

Textura y Capacidad de campo:

El conocimiento de las proporciones de partículas de diferente tamaño del suelo, su textura, es crítico para entender el comportamiento del mismo y su manejo, pues la textura es una propiedad básica del suelo, no sujeta a cambio fácilmente. El término textura se refiere propiamente a aquella fracción de partículas menores o iguales a 2 mm. Así, el término textura indica en que proporción se encuentran la arena, limo y arcilla; expresada ésta en porcentajes de peso (Brady y Weil, 2008).

Cuando un suelo es denominado como franco, indica una mezcla de arena, limo y arcilla poseedora de propiedades de los tres componentes en iguales proporciones; no obstante no debe entenderse que los tres componentes están en cantidades iguales. Ello se explica porque una pequeña proporción de arcilla basta para conferir propiedades arcillosas a un suelo, mientras que pequeñas cantidades de arena y limo tienen una influencia menor en el comportamiento de éste (Brady y Weil, 2008).

A los suelos francos con un porcentaje importante de arena, se les añade el término arenoso; debiendo poseer al menos una proporción de arena del 45 %. Por la alta proporción de arena, estos suelos poseen poros relativamente grandes, y no pueden retener agua u otros líquidos contra la gravedad, por esta causa se drenan y promueven la entrada de aire rápidamente, siendo el movimiento de los líquidos más rápido hacia abajo que lateral (Brady y Weil, 2008). Es debido a estas características físicas, que los hidrocarburos en suelos arenosos percolan a una mayor profundidad en menor tiempo (Deuel y Holliday, 1997; Brady y Weil, 2008). Es éste movimiento vertical el que puede disminuir la disponibilidad del hidrocarburo para los microorganismos degradadores,

los cuales se encuentran en mayor abundancia cerca de la superficie (Cauwenberghe y Roote, 1998; Frick y col., 1999). No obstante, a pesar de que este suelo posee casi 2/3 de arena, las porciones de limo y arcilla de los suelos franco arenosos limitan la propagación del hidrocarburo, y aumentan la capacidad de retención de agua. El suelo utilizado para este ensayo se clasifica como franco arenoso (Cuadro 1), y posee una capacidad de campo de 41,6 %, considerada como alta, permitiendo una disponibilidad de agua en cantidades suficientes para el establecimiento de plantas y la supervivencia de microorganismos.

Cuadro 1. Proporciones de arena, limo y arcilla del suelo

Partículas de suelo	%
Arena	71,6
Arcilla	16
Limo	12,4

Al añadir la cáscara de arroz (10 % del total) y el petróleo pesado (5 % del total), la capacidad de campo no mostró diferencias significativas respecto al suelo limpio.

Cuadro 2. Capacidad de campo de suelo no contaminado y contaminado

Capacidad de campo (%)	
Suelo no contaminado	41,6
Suelo contaminado	40

b) Análisis químico de las muestras de suelo:

Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (% S.B), bases intercambiables, pH, contenido de materia orgánica, fósforo disponible y nitrógeno total.

El suelo utilizado en este ensayo provino del estado Guarico, el cual forma parte de las regiones de Venezuela caracterizadas por tener suelos ácidos; junto con los llanos orientales y el sur del país (Casanova, 2005).

El Cuadro 3 muestra los valores obtenidos del análisis químico del suelo, y en él se puede apreciar la poca fertilidad de éste, causada por las bajas concentraciones de N y P disponibles, bases intercambiables, capacidad de intercambio catiónico y el escaso contenido de materia orgánica.

Adicionalmente, el bajo pH (4,9) indica la acidez característica de los suelos de sabana, escasos de nutrientes; afectando el crecimiento de las plantas y la actividad biológica de los microorganismos (Cauwenberghe y Roote, 1998).

Cuadro 3. Resultados de los análisis químicos de las muestras de suelo.

C.I.C.E (cmoles/kg)	1,53
% S.B	67,97
Σ Bases intercambiables (cmoles/kg)	1,04
Acidez intercambiable (cmoles/kg)	0,59
Ca (cmoles/kg)	0,19
Mg (cmoles/kg)	0,16
K (cmoles/kg)	0,1
P disponible (mg/kg)	15
N total (mg/kg)	590
% M.O	1,65
pH	4,9

A causa de las bajas concentraciones de fósforo y nitrógeno, y por la contaminación con petróleo pesado, se adicionaron fertilizantes (N:P:K y urea) de manera dosificada, según las proporciones determinadas por Hutchinson y col. (2001); esto permitió tanto a plantas como a microorganismos contar con los nutrientes necesarios para tener un mejor crecimiento. En lo referente a la acidez, se decidió no aumentar el pH mediante encalado pues la degradación de hidrocarburos es posible en suelos ácidos (Stapleton y col., 1998).

Evaluación de la capacidad de *Megathyrsus maximus* para reducir el contenido de aceites y grasas en suelos contaminados con crudo pesado:

Contenido de aceites y grasas:

Las técnicas actualmente empleadas sólo permiten una recuperación parcial del crudo. De la mezcla al 5 % originalmente preparada, la evaluación inicial del contenido de aceites y grasas estimó un valor de 3,5 %, hecho que indica una recuperación del 70 %. Esto se explica porque el solvente utilizado no logró una extracción completa del crudo, además se producen pérdidas durante la preparación de la mezcla suelo-desecho, así como en la extracción por la volatilización de la porción mas ligera. En todo caso los valores de recuperación obtenidos en este estudio están dentro de lo previsible según la literatura consultada (Mc Gill y Rowell, 1980; Infante y col., 2010b).

La variación de la concentración de aceites y grasas con respecto al tiempo, es uno de los parámetros más importantes a evaluar en este ensayo, por ser una medida del cambio en el tiempo de la concentración de crudo en el suelo, y de la efectividad del proceso biorremediador en cuestión (Infante y col., 2010b). Cabe aclarar que la determinación de aceites y grasas no permite discriminar los aceites y grasas de origen mineral de aquellos de origen vegetal; no obstante dadas las características del suelo

utilizado (muy bajo contenido de materia orgánica) se estima que esta contribución debe ser muy baja.

La legislación nacional establece en el Decreto 2635 (República de Venezuela), en cuanto a los requerimientos mínimos para realizar biotratamiento, lo siguiente: 1) El contenido hidrocarburos biodegradables en el desecho debe estar entre 1 y 10 % (Artículo 53, numerales 1 y, 2) el suelo contaminado con esparcimiento de hidrocarburos se considerará limpio cuando el contenido de aceites y grasas sea menor al 1 % (Artículo 50, numeral 4).

En la Figura 1 se observa la variación del contenido de aceites y grasas, con respecto al tiempo, para el suelo con tratamiento TP, los suelos con SP y TC, durante el período del ensayo. El contenido de aceites y grasas al inicio del estudio fue para los tres tratamientos 3,5 %, el cual disminuyó a 1,89 % en el suelo con *Megathyrsus maximus*; 2,19 % para el tratamiento sin plantas; y 2,53 % para el suelo control al término del ensayo (180 días), siendo los tratamientos estadísticamente diferentes entre sí ($p = 0,0063$), y con respecto al inicio del ensayo ($p = 0$)(ANOVA de dos vías), confirmando la disminución de los niveles de contaminación del suelo en todos los tratamientos considerados; así, TP redujo en un 46 % la concentración de aceites y grasas, SP en un 37 % y TC en un 28%.

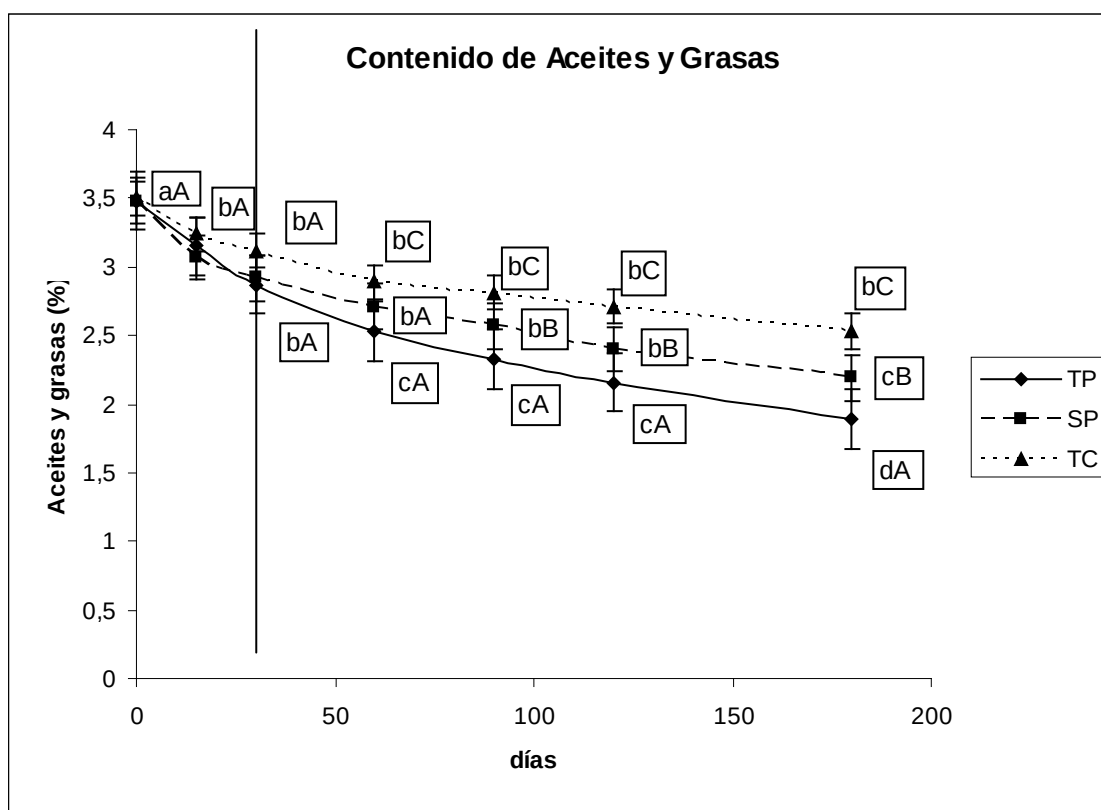


Figura 1: Variación del contenido de aceites y grasas de petróleo pesado (15 ° API) en los diferentes tratamientos evaluados. Tratamiento con suelo mejorado y *M. maximus* (TP), suelo mejorado sin plantas (SP), y en suelo contaminado con petróleo sin ninguna mejora (TC). Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo. La línea vertical indica el inicio del proceso de fitorremediación.

En referencia específica al tratamiento con *M. maximus*, éste también mostró diferencias significativas con respecto al día 180 y el resto de los días. Los valores críticos calculados; 14,48 para los tratamientos y; 41,41 para los tiempos, fueron muy superiores a los valores críticos obtenidos; 3,89 y 3, para tratamientos y tiempos, respectivamente. A pesar de que el efecto del factor tiempo es mucho mayor que el efecto del factor tratamiento, la presencia de las plantas produjo una mayor disminución, estadísticamente significativa, de las concentraciones de crudo con respecto a los tratamientos SP y TC durante el período del ensayo ($p = 0,003$ y $p = 0,008$ respectivamente).

La gravedad API del crudo utilizado en este ensayo, 15 ° y considerada como baja, obviamente influyó en los resultados obtenidos (McMillen y col.; 2004, Infante y col., 2010a; Infante y col., 2010b; Navas, 2012). Los crudos cuya gravedad API se encuentre entre 10 y 22 °, son clasificados como pesados, y contienen una mayor proporción de resinas y asfaltenos que los crudos livianos y medianos; haciéndolos más resistentes a la biodegradación.

El tratamiento de bioestimulación, aplicado durante los primeros 30 días del ensayo, posiblemente aumentó en gran medida la volatilización de los compuestos saturados y aromáticos de bajo peso molecular (Mc Gill y Rowell, 1980; Bossert y col., 1984; Infante y col., 2010b), disminuyendo la concentración de éstos y el efecto tóxico que tienen en plantas y microorganismos. Ello a su vez facilitó tanto la acción remediadora de los microorganismos, como el establecimiento de las plantas luego de 30 días.

La disminución más rápida de la concentración de crudo se obtuvo en el proceso de biestimulación inicial para el suelo mejorado (con petróleo, cáscara de arroz y fertilizante) tanto para TP y SP; los primeros 30 días, siendo ésta de 11 %, esto se debió a la adición de cáscara de arroz y fertilizantes. La tasa de disminución para el control (suelo con petróleo, sin cáscara de arroz ni fertilizantes) fue menor, un 8 %. Si bien la disminución del contenido de aceites y grasas en la fase de fitorremediación (TP) fue menor a la fase previa de bioestimulación, se obtuvo una disminución del 46 % en un período de 150 días. Esto se logró con el suelo en envases, con sólo una pequeña superficie del mismo expuesta directamente a la atmósfera dada la forma de los envases y sin remoción del suelo. Los exudados radicales parecen haber estimulado la actividad microbiana, favoreciendo esto a su vez la degradación del crudo, dado que este es usado como fuente alternativa de carbono (Mager y Hernández-Valencia, 2013). La

disminución de las concentraciones de crudo para los dos tratamientos restantes fueron significativamente menores en el mismo período; 37 % para SP y 28 % para TC.

Los resultados obtenidos en ensayos anteriores con *M. maximus* (Hernández – Valencia y Mager, 2003; Mager y Hernández-Valencia, 2013), confirman la capacidad fitorremediadora de esta especie. En estos trabajos el porcentaje de reducción fue muy superior; un 63 %; sin embargo, los ensayos tuvieron una duración de 240 días, se utilizó un crudo liviano con una mayor proporción de aromáticos y saturados, y el nivel de contaminación fue del 3 %. Un factor adicional a considerar en los resultados obtenidos del ensayo del 2013 es que Mager y Hernández-Valencia (2003), trataron el suelo con cal para disminuir la acidez (aumentar el pH de 4,9 a 6,5) y mejorar el desarrollo de las plantas; algo que eventualmente pudo favorecer la actividad microbiana, así como su densidad poblacional, ya que los hongos no son afectados por la acidez (Brady y Weil, 2008), pero un pH superior favorece a las poblaciones de bacterias y su actividad. La presencia de bacterias y hongos formando los denominados “consorcios” aumenta la densidad de poblaciones de hongos y acelera la degradación del petróleo (Rivera-Cruz y col., 2003). Navas (2012) obtuvo una menor disminución, bajando de 3,745 % a 3,11 % de aceites y grasas; posiblemente porque no hubo una fase de bioestimulación, el ensayo tuvo una menor duración y utilizó petróleo extrapesado, más difícil de degradar. Por otra parte, Infante y col. (2010a), aplicando únicamente bioestimulación durante 180 días, lograron una disminución del 80 % de la concentración de aceites y grasas de lodos petrolizados extraídos de fosas en el occidente de Venezuela; hay que aclarar que los hidrocarburos de estos lodos constaban de saturados y aromáticos.

Si bien la disminución del contenido de aceites y grasas al final del ensayo, 1,89 % para el tratamiento con *M. maximus*, no cumplió con el límite establecido por el

Decreto 2635, pues excede el 1 %; la cercanía de los valores obtenidos sugiere que en un período más largo, esta concentración podría ser menor al porcentaje máximo exigido por la ley. Incluso una mayor frecuencia de aireación en la fase de bioestimulación, dos o tres veces por semana, y el aporque en los tratamientos TP y SP hubieran podido reducir más significativamente la concentración de aceites y grasas (Infante y col., 2010a). Además el encalado de los suelos para disminuir las acidez, hubiera favorecido a las bacterias y su metabolismo, acelerando la degradación del crudo (Mager y Hernández-Valencia, 2013).

Fraccionamiento del hidrocarburo:

La evaluación de los cambios al inicio y al final del ensayo de las distintas fracciones constituyentes del petróleo, permiten conocer cuáles de estas fracciones han disminuido con mayor intensidad por la acción del tratamiento aplicado. Esta determinación es extensamente utilizada para evaluar resultados de la degradación de crudos mediante biorremediación (Infante y col., 2010b), pues se ha determinado que los hidrocarburos saturados y aromáticos son las fracciones más fácilmente biodegradables del petróleo, mientras que resinas y asfaltenos son los más recalcitrantes (Atlas, 1981; Bossert y col., 1984; Atlas y Bartha, 1998).

La Figura 2 presenta la variación de cada una de las fracciones del hidrocarburo en los diferentes tratamientos evaluados. Al inicio del ensayo se obtuvo una concentración de 33,20 % de saturados; 15,29 % de aromáticos; 30,07 % de resinas y 21,44 % de asfaltenos. Como puede observarse la proporción de compuestos polares (resinas y asfaltenos) es ligeramente superior a la suma de saturados y los aromáticos de menor peso molecular y biodegradables (Infante y col., 2010b).

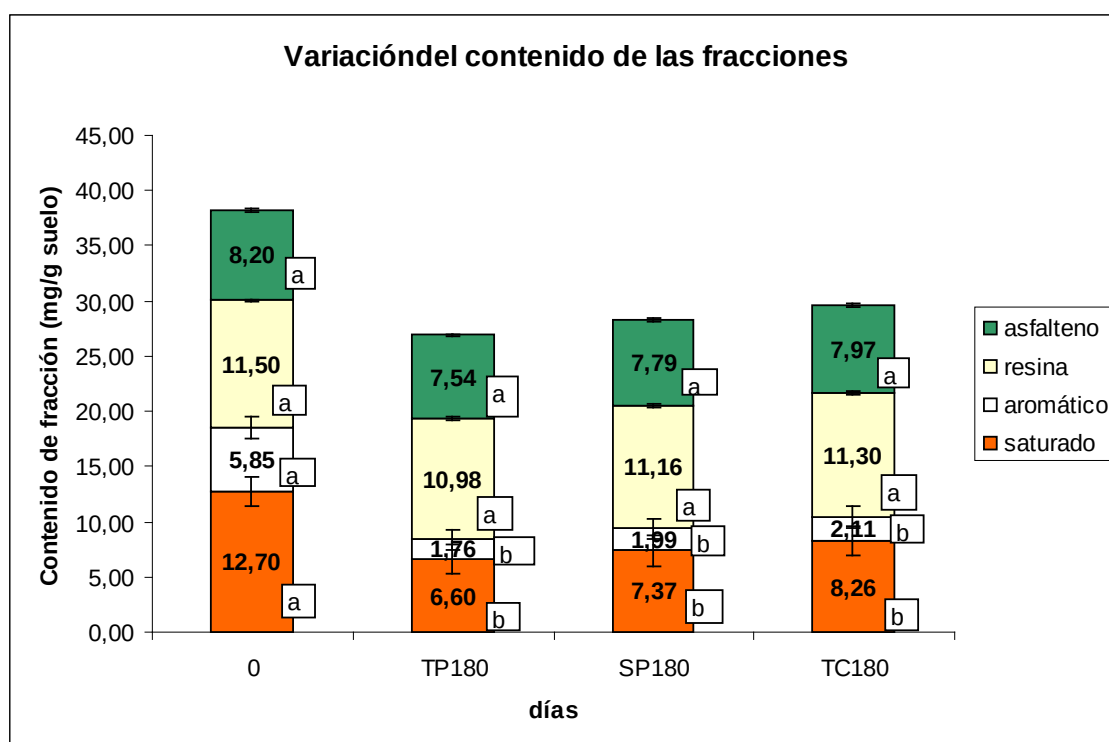


Figura 2: Variación de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) en los diferentes tratamientos evaluados, al inicio (día 0), y fin del ensayo, (180 días). Las letras iguales indican que no hay diferencia dentro de cada fracción en el tiempo.

El tratamiento con TP mostró para los saturados una disminución del 48 %, en tanto que el tratamiento SP un 42 %, y el control TC un 34,8 %. Para los aromáticos la pérdida fue de un 70 % para el suelo TP, un 66 % para el suelo SP sin planta, y un 64 % para el suelo TC. Al realizar el anova de dos vías no se obtuvieron diferencias significativas entre los tratamientos; pero si se hallaron diferencias significativas para el tiempo ($p = 0,00069$), por lo que es el tiempo el factor decisivo en la disminución de esta fracción para los tres ensayos. Ensayos realizados en campo han obtenido disminuciones del 60 %, en lodos contaminados con saturados y aromáticos, a los 60 días, aplicando bioestimulación, consistente de aireación (tres veces por semana) y fertilización (Infante y col., 2010a). Podría entonces ser posible que una porción importante de esta disminución haya sucedido en la fase de bioestimulación.

Los resultados obtenidos parecen indicar que los diferentes tratamientos no producen cambios significativos en la tasa de degradación de las diferentes fracciones de hidrocarburos durante el tiempo que se llevó a cabo el ensayo. Es posible que un período más largo hubiera permitido detectar mejor las diferencias entre los distintos tratamientos. El ensayo duró 150 días, y en el caso de la fitorremediación se ha reconocido que se requieren plazos más largos para una descontaminación más efectiva (Cunningham y col., 1996; Huang y col., 2005). Además al aumentar la biomasa de las raíces, incrementa el efecto rizosférico, hecho que pudiera favorecer una descontaminación más efectiva.

Las resinas no mostraron una disminución significativa, ni entre tratamientos ni entre tiempos. Para los asfáltenos tampoco se hallaron diferencias significativas para tratamientos o para tiempos.

Ensayos anteriores realizados con crudos pesados por Merkl y col. (2005b), encontraron que luego de 180 días, las fracciones de resinas y asfaltenos no fueron degradadas, mientras que los saturados y aromáticos disminuyeron su concentración, tanto en suelos con plantas como los suelos sin plantas. Para los suelos plantados con *B. brizantha* y *C. aggregatus*, obtuvieron una disminución de 50 y 30 % respectivamente, para los saturados; mientras los aromáticos mostraron una disminución del 15 %, en comparación con el control, en los suelos con *B. brizantha*. La disminución en aromáticos es mucho menor en comparación con la de este ensayo (70 %), porque Merkl y col. no realizaron un biotratamiento previo como en nuestro caso.

Para lograr una disminución efectiva de las fracciones polares se requiere una biorremediación por fases con un período más largo (240 días), que incluya además la fitorremediación. Se ha logrado una reducción de 90 % de todas las fracciones con el sistema de fitorremediación multiprocesos (Huang y col., 2005). Este sistema de

biorremediación por fases ha logrado degradar las fracciones de resinas y asfaltenos de manera significativa. No obstante este ensayo requirió de largos períodos (al menos 240 días) para lograr tan altos niveles de reducción y sembrar dos veces (a los 100 días se sembró nuevamente).

Respiración basal:

El monitoreo del proceso de biodegradación de suelos contaminados con petróleo, puede realizarse a través de la evaluación de diversas actividades biológicas de los microorganismos que habitan en éste. Entre estas actividades se encuentra la respiración basal, pues la actividad microbiana dependerá de la cantidad de compuestos carbonados biodisponibles, y consecuentemente a mayor disponibilidad de sustratos carbonados para degradar, también será mayor la actividad enzimática de los microorganismos y el carbono de la biomasa microbiana (Margesin y col., 2000).

La intensidad de la biodegradación es influenciada por varios factores, tales como el contenido de nutrientes, la disponibilidad de oxígeno, valores de pH, composición, concentración y biodisponibilidad de los contaminantes (Margesin y Schinner, 2001; García Izquierdo y col., 2003). Específicamente en este ensayo, el petróleo pesado es un sustrato de carbono utilizable por los microorganismos como fuente de energía, y la oxidación de éste genera CO_2 ; así, mientras más hidrocarburos degraden los microorganismos, mayor será la emisión del gas.

La variación de la respiración edáfica, determinada a través del CO_2 emitido por los microorganismos en cada uno de los tiempos de muestreo, se puede apreciar en la Figura 3. En general, para todos los tratamientos se obtuvo un pico en la respiración basal para el día 15 del ensayo y luego decae progresivamente hasta el día 150. Esta conducta se relaciona con la biodisponibilidad de sustratos carbonados. Al inicio, la contaminación genera un impacto sobre la comunidad microbiana del suelo, y solo

favorece a aquellos grupos que pueden tolerar la contaminación y aprovechar la fuente de carbono que representa el hidrocarburo. Posteriormente, los microorganismos aptos para aprovechar esta fuente de carbono, aumentan su actividad y comienzan a crecer. Cuando los sustratos carbonados biodisponibles comienzan a escasear, la actividad microbiana disminuye (Margesin y col., 2000).

Los valores más altos de respiración basal se obtuvieron tanto para TP como SP, durante el proceso de bioestimulación; a los 15 y los 30 días. Esta respuesta es consistente, si se considera que las mejoras a la mezcla suelo: desecho hechas a estos tratamientos (cáscara de arroz y fertilizante), permitió a los microorganismos de estas mezclas contar con mejores condiciones para el aprovechamiento del carbono disponible y para su actividad en general. La respiración basal mostró diferencias significativas, con respecto al inicio del ensayo, a los 15 y 30 días ($p= 0,00012$ y $p= 0,003$ respectivamente) para TP y SP. Igualmente se encontraron diferencias significativas de los tratamientos TP y SP con respecto a TC a los 15 y 30 días ($p = 0,0001$ y $p = 0,0002$ respectivamente). Los tres tratamientos alcanzaron sus valores más altos; 58,06; 59,23 y 37,9 mg CO₂/kg suelo día para TP, SP y TC respectivamente, a los 15 días.

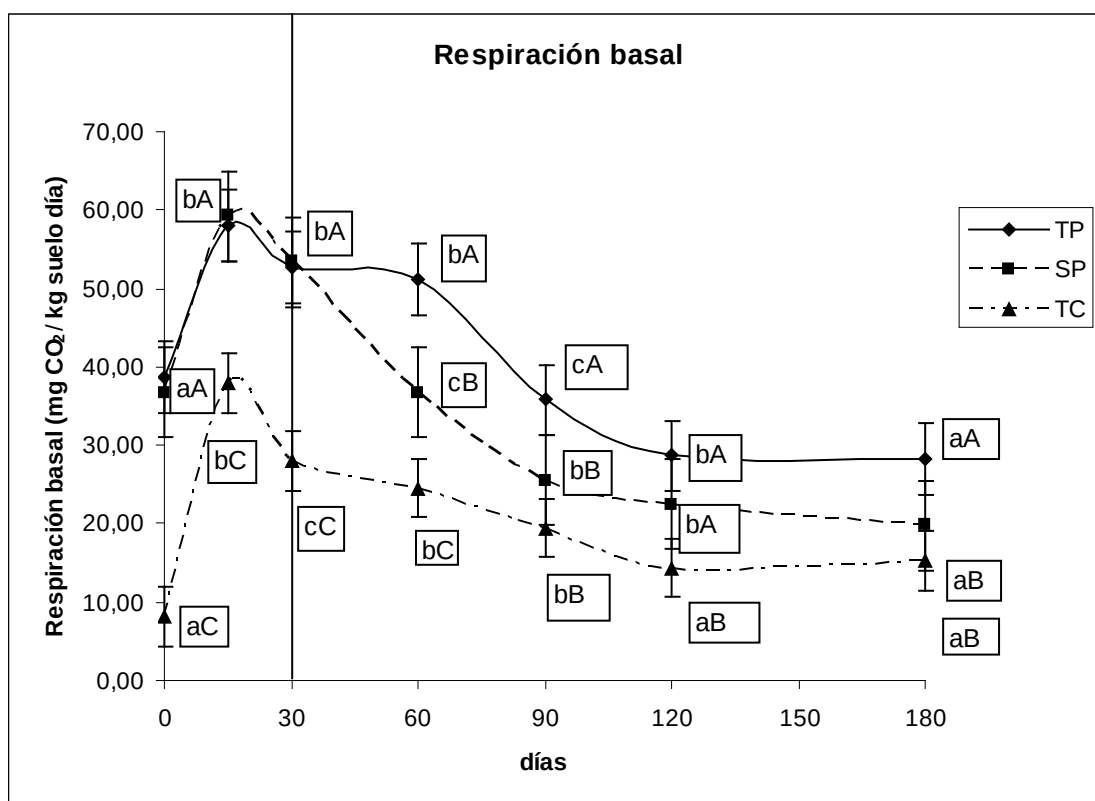


Figura 3: Variación de la respiración edáfica en los diferentes tratamientos evaluados. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo, con respecto al comienzo, y con respecto al día inmediato anterior. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo. La línea vertical indica el inicio del proceso de fitorremediación.

Una vez iniciado el proceso de fitorremediación (día 30) se observa una diferenciación significativa, para el tratamiento TP, primero con respecto al inicio del ensayo para los días 60 ($p=0,04$), 120 ($p=0,0065$) y 180 ($p=0,00002$), y segundo con respecto a la emisión de CO₂, entre el tratamiento con *Megathyrsus maximus* (TP) y el tratamiento sin la planta (SP) a los 60 ($p=0,013$), 90 ($p=0,005$) y 180 días ($p=0,0072$). La diferencia significativa entre TP y SP a los 60, 90 y 180 días, se debe al efecto de las plantas. La presencia de exudados en la rizósfera parecen haber estimulado la actividad microbiana, lo cual se refleja en valores superiores de respiración basal de TP con respecto a SP y TC (Mager y Hernández-Valencia, 2013). Igualmente cuando se

compararon los valores de TP con los de TC, se encontraron diferencias significativas a los 15 ($p= 0,00001$), 30 ($p= 0,0002$), 60 ($p= 0,00002$), 90 ($p= 0,00002$), 120 días ($p= 0,001$) y 180 días ($p =0,004$).

Otros factores a tomar en cuenta de los valores superiores de TP con respecto a SP y a TC, es que el tratamiento con *M. maximus* (TP), cuenta con mejor aireación y mejor distribución del agua por las raíces, factores que también favorecen una mayor actividad microbiana (fig. 4) que el tratamiento sin plantas (SP) y el control (TC).

Para los 120 días no se hallaron diferencias significativas entre los tratamientos TP y SP; manteniendo el tratamiento con *Megathyrsus maximus* (TP) los valores más altos en cada muestra.

Al comparar el tratamiento SP con TC a partir de los 30 días, se hallaron diferencias significativas a los 60 ($p= 0,0002$), 90 ($p= 0, 002$) y 120 días ($p = 0,008$) debidas a las mejoras del acondicionamiento y fertilización, con respecto al suelo contaminado de TC. Esto permitió una mejor aireación y disminuyó la hidrofobia del suelo contaminado, proporcionando una mejor distribución del agua y aire. Además al ser fertilizado, el suelo con tratamiento SP contó con mayor cantidad de nutrientes, esto permitió a los microorganismos aumentar su biomasa microbiana, lo cual se reflejó en la respiración basal (Infante y col., 2010a).

Carbono de la biomasa microbiana:

La biomasa microbiana del suelo comprende aquella porción viviente de la materia orgánica menor a $5 \times 10^{-3} \mu\text{m}^3$, excluyendo las raíces y organismos de mayor tamaño (Jenkinson y Ladd, 1981), y generalmente constituye un 2 % del total de la materia orgánica del mismo. La biomasa microbiana del suelo actúa como un agente de transformación de la materia orgánica, siendo a la vez fuente y sumidero del C, N, P y S contenidos en ésta, y es el centro de la mayoría de la actividad biológica del suelo. Es

necesario entonces, para entender apropiadamente la actividad biológica en el suelo, tener conocimiento de la biomasa microbiana de éste (Jenkinson y Ladd, 1981; Frankenberger y Dick, 1983). Asimismo, dada la sensibilidad de los microorganismos a los contaminantes, puede usarse también como un indicador del nivel de contaminación del suelo (Alef y Nannipieri, 1995).

El método de respiración inducida por sustrato (SIR, substrate induced respiration), fue escogido como medio para estimar este parámetro debido a las dificultades de disponer de ácido sulfúrico en las cantidades requeridas por el método de estimación directa de Vance y col. (1987), que es el más frecuentemente usado.

En la Figura 4 se observa la variación del carbono de la biomasa microbiana determinada para cada uno de los tres tratamientos. El suelo con el tratamiento TP mostró un incremento desde el inicio hasta los 60 días, con diferencias significativas hasta el período mencionado, estabilizándose luego hasta el final del ensayo; no encontrándose diferencias significativas al compararse los días 90, 120 y 180 con el día 60. El suelo mejorado sin plantas (tratamiento SP), también experimentó un incremento significativo y constante de la biomasa microbiana hasta el día 30; observándose un descenso al finalizar la bioestimulación y manteniéndose constante hasta el término del ensayo. La justificación a esta conducta es similar a la dada para la respiración basal, con un incremento inicial debido a la mayor disponibilidad de sustratos carbonados y luego decrece en la medida que la disponibilidad de estos se reduce, especialmente en la zona de la rizósfera (Mager y Hernández-Valencia, 2013). En el caso del tratamiento con fitorremediación, este descenso no se observa, posiblemente por la fuente alternativa de carbono que representan los exudados y otras mejoras (p.e. oxigenación) que procuran las raíces. Además, otra característica a resaltar en este ensayo es la utilización de plantas adultas con un sistema radical desarrollado, a diferencia de

ensayos en los cuales se sembraron semillas (Merkl y col., 2005a;Merkl y col., 2005b; Huang y col., 2005; Mager y Hernández-Valencia, 2013). Esta mayor biomasa radical produjo una mayor cantidad de exudados que llegaron a mayor profundidad, y esto probablemente haya influido en el mantenimiento de valores superiores de biomasa microbiana en TP con respecto a los otros tratamientos. Los valores superiores de SP con respecto a TC pueden explicarse por la presencia de la cáscara de arroz, el cual podría ser una fuente extra de nutrientes y microorganismos (Infante y col., 2010a), dado que inclusive los microorganismos degradadores de petróleo no pueden sobrevivir exclusivamente del contaminante (Huang y col., 2005).

El proceso de bioestimulación también permitió un incremento de la biomasa de carbono microbiano en el control, aunque el mismo fue mucho menor comparado con los otros dos tratamientos. Dado que el suelo control no se acondicionó con cáscara de arroz, ni se fertilizó con P y N, es muy probable que estas condiciones menos favorables influyeron en menor aprovechamiento del carbono proveniente del petróleo y la biomasa microbiana fue menor (Infante y col., 2012).

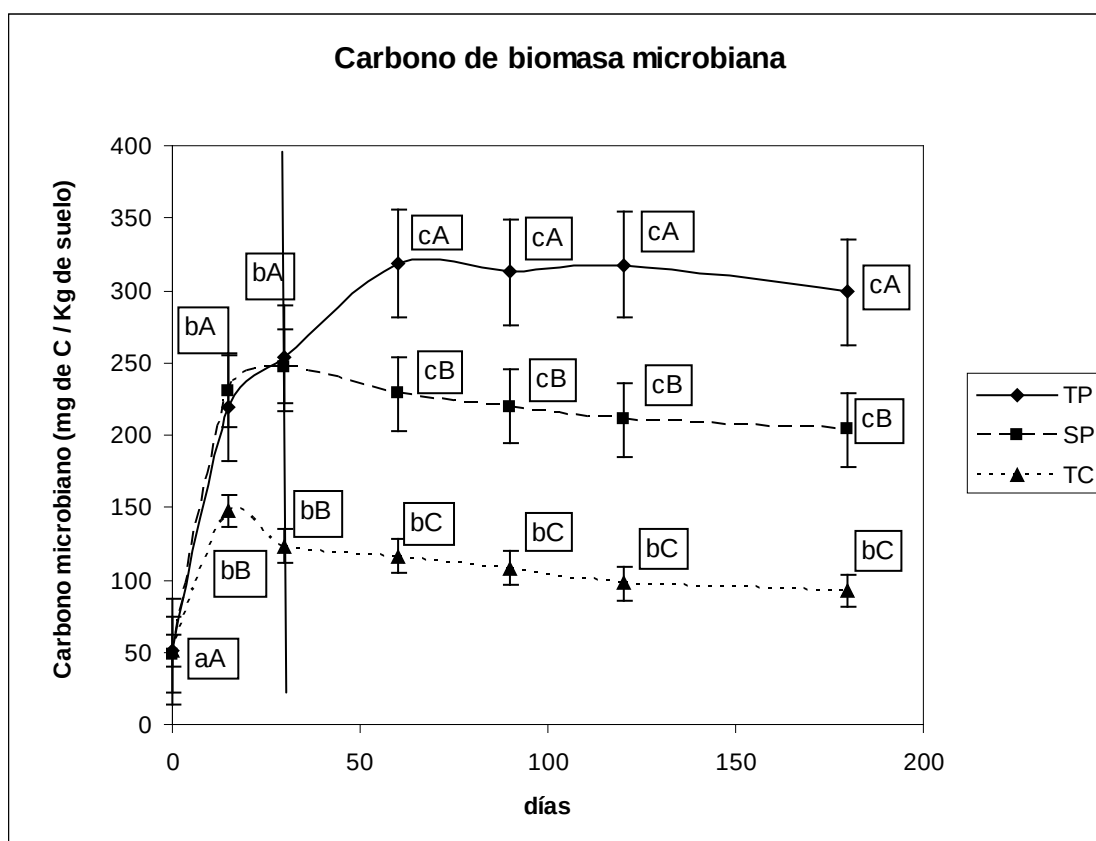


Figura 4: Variación del carbono de la biomasa microbiana en los diferentes tratamientos evaluados. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo. La línea vertical indica el inicio de la fitorremediación.

Navas (2012), obtuvo resultados similares con *M. maximus*, lo cual sugiere que al inicio de la contaminación sólo aquellos microorganismos capaces de tolerar el hidrocarburo y alimentarse de las fracciones del crudo, sobreviven y se multiplican. Posteriormente, gracias a las mejoras por la cáscara de arroz y macronutrientes (N, P y K) se observa una recuperación más rápida de la población, y una disminución de la contaminación después de la bioestimulación. La presencia de las plantas aumentó este efecto al permitir mayor aireación y penetración del agua, a través de las raíces, y por la presencia de los exudados. Esto tuvo un efecto de mejoramiento al compararlo con el suelo mejorado sin plantas y con el control. Esta mayor cantidad de biomasa microbiana

explica los valores superiores de respiración basal obtenidos en TP, con respecto a SP y TC.

El Anova de dos factores mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos ($p = 0,00081$), y entre los 30, y los 60, 90, 120 y 180 días para el tratamiento TP ($p = 0,003$; $p = 0,0065$; $p = 0,005$; $p = 0,0063$). También se hallaron diferencias significativas entre el inicio y los 15 y 30 días por la bioestimulación ($p = 0,02$ y $p = 0,04$), siendo estas iguales para TP y el suelo con tratamiento SP. Para el control las diferencias significativas se hallaron entre el inicio y los 15, y 30 días ($p = 0,0073$ y $p = 0,006$), debidas a la bioestimulación. No se detectaron diferencias entre los días a partir del día 30.

Al valorar ambos factores a la vez se hallaron diferencias significativas entre los 60, 90, 120 y 180 días ($p = 0,006$; $p = 0,007$; $p = 0,028$ y $p = 0,002$) para los tratamiento TP y SP. Tanto el tratamiento TP como el SP, mostraron diferencias significativas con respecto al control (TC) a partir del día 15 hasta el fin del ensayo ($p = 0,006$ y $p = 0,0007$ respectivamente)

Coefficiente metabólico:

El coeficiente metabólico (qCO_2) es la tasa de respiración de los microorganismos por unidad de biomasa de C microbiano, e indica la eficiencia con la cual estos asimilan el carbono orgánico y lo mineralizan (Anderson y Domsch, 1993; Insam y col., 1996). Un cambio en éste parámetro puede indicar: (1) cambios en los sustratos que una comunidad microbiana no alterada usa, (2) cambios en la composición de la comunidad, (3) cambios en los dos puntos mencionados anteriormente y (4) no hay cambios en los sustratos o la comunidad, pero si en el status fisiológico de la comunidad debido a una alteración en los requerimientos de ésta para su mantenimiento (Insam y col., 1996).

Al inicio del ensayo el valor obtenido para los tratamientos TP y SP, fue en promedio 764,22 mg de CO₂/ g CBM día, y de 160,39 mg de CO₂/ g CBM día para el control (Fig. 5). El coeficiente metabólico del tratamiento TP al inicio fue significativamente diferente con respecto a los 15 y 30 días ($p = 0,003$ y $p = 0,007$) durante la bioestimulación; luego con *M. maximus* a los 60, 90, 120 y 180 días ($p = 0,006$; $p = 0,005$; $p = 0,005$ y $p = 0,004$ respectivamente) mostrando un descenso en sus valores hasta el día 120; se encontraron diferencias significativas entre 15 y 30 ($p = 0,02$), 30 y 60 ($p = 0,007$), y 90 ($p = 0,04$) respectivamente. No se hallaron diferencias significativas entre los 90, 120 y 180 días para el mismo tratamiento.

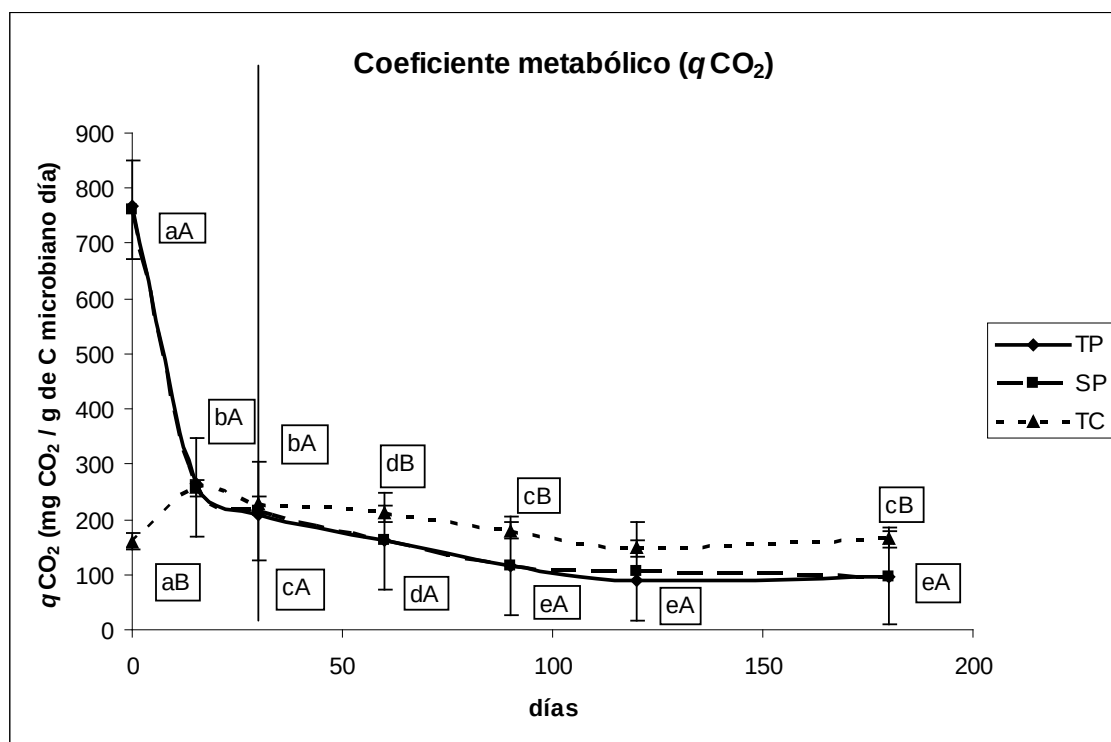


Figura 5: Variación del coeficiente metabólico en los diferentes tratamientos evaluados. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias entre los días para cada tratamiento. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo. La línea vertical indica el inicio del proceso de fitorremediación.

Para SP los resultados fueron muy similares a los de TP en cuanto a diferencias entre tiempos, siendo significativamente diferentes al inicio, todos los días restantes del

ensayo ($p_{15} = 0,002$; $p_{30} = 0,004$; $p_{60} = 0,0063$; $p_{90} = 0,0055$; $p_{120} = 0,036$; $p_{180} = 0,007$). Al comparar 15 y 30 ($p = 0,02$), 30 y 60 ($p = 0,0053$), 60 y 90 ($p = 0,006$), se encontraron diferencias significativas; estos resultados contrastan con los obtenidos entre 90, 120 y 180, que no presentan diferencias significativas entre ellos.

Los valores de qCO_2 de TC mostraron un aumento desde el inicio a los 15 días (Fig. 5) ($p = 0,008$) y fueron significativamente diferentes a los 15 ($p = 0,008$), 30 ($p = 0,03$), 60 ($p = 0,005$) y 90 días ($p = 0,009$). Los valores entre 60 y 90 días también fueron significativamente diferentes ($p = 0,004$); mientras que los valores de 90, 120 y 180 ($p = 0,3$; $p = 0,2$; $p = 0,5$) no fueron significativamente distintos entre sí.

Entre tratamientos, los resultados no fueron significativamente diferentes para TP y SP. Una posible explicación a este hecho es que si bien el tratamiento con *M. maximus* tenía una respiración basal superior al suelo mejorado sin plantas, éste también poseía una mayor biomasa microbiana; resultando esto en una relación o proporción muy similar a la del tratamiento SP (Mager y Hernández-Valencia, 2013). Los valores del control (TC), fueron estadísticamente diferentes con respecto a los otros dos tratamientos al inicio ($p = 0,007$), 60 ($p = 0,004$), 90 ($p = 0,003$), 120 ($p = 0,008$) y 180 días ($p = 0,002$); siendo a partir del día 60 superiores a TP y SP. Este mayor qCO_2 podría interpretarse como un ambiente mas hostil para los microorganismos con respecto al los tratamientos TP y SP, de coeficientes metabólicos menores (Anderson y Domsch, 1993; Anderson y Domsch, 2010). Así, los valores superiores de qCO_2 del TC con respecto a TP y SP, reflejan primero una mayor demanda de carbono para mantener el metabolismo de una menor biomasa microbiana, y segundo una menor eficiencia energética. Esto también indica que una mayor proporción del carbono se desvía para el mantenimiento metabólico en TC y no para sintetizar nueva biomasa microbiana, lo contrario de lo que sucede con TP y SP. Dado que este carbono, representado por

saturados y aromáticos, ha disminuido y el suelo no puede reponer el carbono perdido a través de la respiración, pues no hay exudados o cáscara de arroz como fuente alternativa de carbono (Infante y col., 2010a; Mager y Hernández-Valencia, 2013), la biomasa microbiana descenderá (Anderson y Domsch, 1993; Anderson, 2003; Anderson y Domsch, 2010).

Actividad de la enzima deshidrogenasa:

Las propiedades biológicas y bioquímicas del suelo son altamente sensibles a las perturbaciones ambientales, pudiendo ser usadas para determinar la calidad del mismo. Así, la inclusión de variables biológicas y bioquímicas reflejan los procesos que afectan la calidad del suelo (Trasar-Cepeda y col., 1997). Entre las variables bioquímicas a medir, la cuantificación de las actividades enzimáticas es un indicador de la actividad y del crecimiento microbiano en los suelos (Frankenberger y Dick, 1983).

La enzima deshidrogenasa es frecuentemente usada en la estimación de los procesos oxidativos de sustancias orgánicas bajo condiciones aeróbicas. Esta oxidación de sustancias orgánicas, esta ligada a una cadena de transferencia de electrones ubicada en la membrana celular de los microorganismos, con el oxígeno como aceptor final de esos electrones (Alef y Nannipieri, 1995). Esta actividad enzimática ocurre en el interior de la célula, por lo cual su determinación es una medida directa de la actividad microbiana (García y Hernández, 1997).

En la Figura 6 se pueden observar los cambios en la actividad de la enzima deshidrogenasa obtenidos en los tres tratamientos. El análisis de varianza de dos factores, mostró que durante el proceso de bioestimulación se observaron incrementos en la actividad enzimática desde el inicio hasta los 30 días, posteriormente cuando se colocó el suelo en envases, la actividad disminuyó hasta los 180 días, para todos los tratamientos. El descenso observado en la actividad de la enzima para todos los

tratamientos, puede explicarse por la disminución de las fuentes de carbono degradables; las fracciones de saturados y aromáticos, a medida que estas son consumidas por los microorganismos y las fracciones restantes más complejas no pudieron ser utilizadas por su condición recalcitrante (Margesin y Schinner, 1997; Merkl y col., 2005b). Los valores más altos, tanto para los suelos TP como para SP, se obtuvieron durante el proceso de bioestimulación. Recordando que durante la bioestimulación TP no tenía plantas de *M. maximus*, ello puede explicar porque los valores de TP y SP son muy similares los primeros 30 días debido a que ambos tratamientos consistían de petróleo, cáscara de arroz y fertilizante.

Durante el proceso de bioestimulación se obtuvieron diferencias significativas de TP con respecto al inicio en los días 15 ($p= 0,001$) y 30 ($p= 0,0006$), igualmente SP mostró diferencias significativas entre el inicio y los 15 y 30 días. Además también se observaron diferencias significativas de ambos tratamientos con respecto al ensayo TC, desde el inicio ($p= 0,0005$); así como para los días 15 ($p= 0,001$) y 30 ($p= 0,0001$).

A los 60 días el efecto de la planta puede notarse en las diferencias significativas obtenidas de el ensayo TP con respecto a SP ($p= 0,0009$) y TC ($p= 0,0005$). Esta mayor actividad de la enzima en el tratamiento TP puede explicarse por una mejor aireación y penetración más profunda del agua en el suelo por las raíces, y por presencia de exudados; factores que estimulan el metabolismo microbiano (Cunningham y col., 1996; Merkl y col., 2005a).

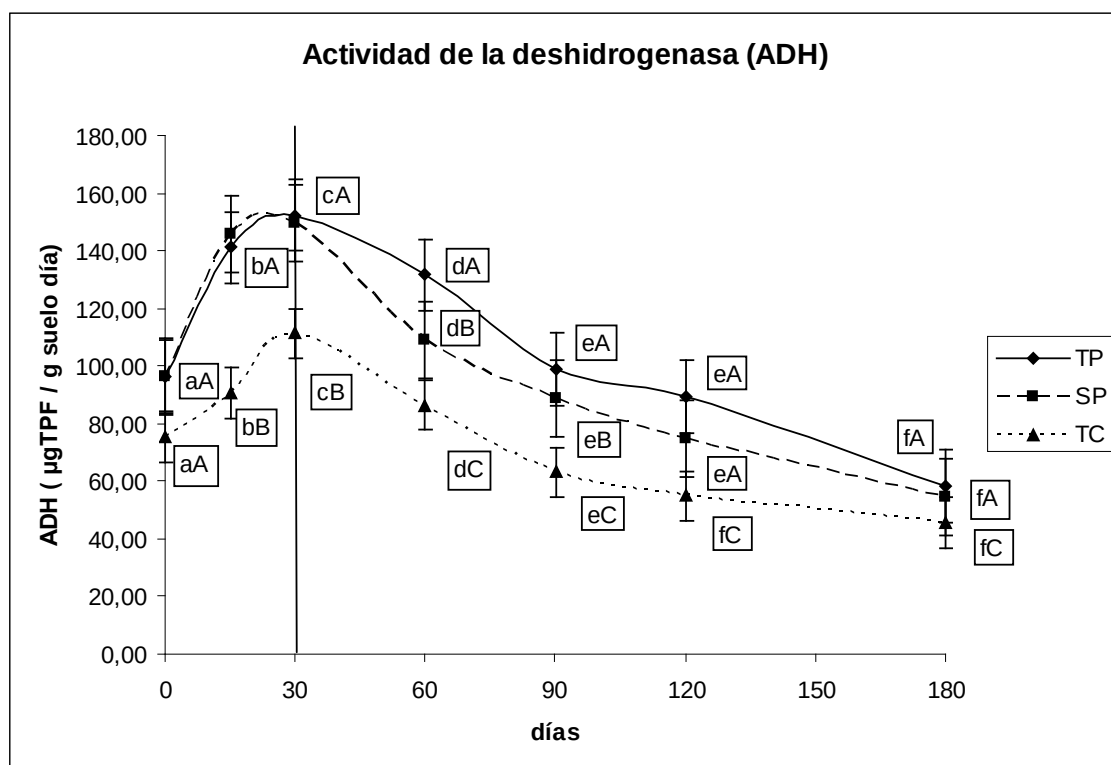


Figura 6: Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa en los diferentes tratamientos evaluados. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tratamiento con respecto al inicio del ensayo y al día anterior inmediato. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada día. La línea vertical indica el inicio del proceso de fitorremediación.

Para los días 90 y 120 no se encontraron diferencias significativas entre TP y SP, pero si entre TP y TC ($p = 0,003$ y $p = 0,0009$ respectivamente), y entre SP y TC ($p = 0,004$ y $0,002$). Al término del ensayo (180 días) no se obtuvieron diferencias significativas entre ninguno de los tres tratamientos.

Relaciones entre las variables de actividad microbiológica evaluadas.

Al realizar un análisis de correlación entre la biomasa microbiana, la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa, se obtuvo una relación lineal significativa entre C microbiano y respiración basal solamente para el tratamiento control (TC) (Cuadro 4). La ausencia de relaciones lineales en la mayoría de los casos

parece estar asociado a la alta variabilidad de las estimaciones microbiológicas, tal como lo han reportado Mager y Hernández-Valencia (2013).

Cuadro 4. Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el tratamiento TC. Los valores de correlación están dados en el triángulo inferior de la matriz. Las probabilidades de dos colas de que las columnas no están correlacionadas están dadas en el triángulo superior.

Variable	Respiración basal	Actividad deshidrogenasa	C biomasa microbiana
Respiración basal	1	0,11725	0,0011661
Actividad deshidrogenasa	0,64567	1	0,28963
C biomasa microbiana	0,94773	0,46795	1

De la misma forma, al realizar un análisis de correlación se encontró una relación lineal entre la actividad de la enzima deshidrogenasa y la respiración basal para el tratamiento TP y el tratamiento SP (Cuadros 5 y 6); pudiendo explicarse esta relación porque la conducta de ambos indicadores es muy similar, con una mayor actividad al inicio cuando hay sustratos carbonados biodegradables y posteriormente decaen en la medida que estos van disminuyendo su disponibilidad. Para que los microorganismos asimilen el carbono y luego él esté disponible, la enzima deshidrogenasa debe haber desprovisto a las cadenas carbonadas de los átomos de hidrógeno, rompiendo el enlace simple que los une. Es decir a mayor emisión de CO₂, mayor necesidad de átomos de carbono desprovistos de hidrógenos y en consecuencia mayor actividad de la enzima. Esta correlación lineal entre la actividad de la deshidrogenasa y la respiración basal concuerdan con los resultados de la literatura consultada (Casida y Santoro, 1963; Casida, 1977), en la cual un aumento en la actividad de esta enzima reflejaba un

aumento en la respiración asociada con la actividad metabólica y no necesariamente con el número de microorganismos.

Cuadro 5. Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el suelo con *Megathyrus maximus*. Los valores de correlación están dados en el triángulo inferior de la matriz. Las probabilidades de dos colas de que las columnas no están correlacionadas están dadas en el triángulo superior.

Variable	Respiración basal	Actividad deshidrogenasa	C biomasa microbiana
Respiración basal	1	0,0020215	0,72398
Actividad deshidrogenasa	0,93468	1	0,89371
C biomasa microbiana	- 0,16482	- 0,062736	1

Cuadro 6. Correlación entre las variables microbiológicas estimadas para el suelo con mejoras sin plantas. Los valores de correlación están dados en el triángulo inferior de la matriz. Las probabilidades de dos colas de que las columnas no están correlacionadas están dadas en el triángulo superior.

Variable	Respiración basal	Actividad deshidrogenasa	C biomasa microbiana
Respiración basal	1	0,00034141	0,71896
Actividad deshidrogenasa	0,96816	1	0,54763
C biomasa microbiana	0,1679	0,27697	1

CONSIDERACIONES FINALES

En vista de que Venezuela posee la mayoría de sus reservas en crudos pesados y extrapesados, las investigaciones sobre biorremediación de suelos contaminados con este tipo de crudos adquieren gran relevancia. Como parte de estos estudios, la selección de especies con potencial fitorremediador es esencial no solo por la capacidad de estas para descontaminar los suelos, sino también para protegerlos de la erosión y mejorar su actividad microbiológica, aspecto esencial que incide en otras funciones del suelo, como son la producción de materia orgánica y la degradación de contaminantes.

La especie *Megathyrsus maximus* ha demostrado en ensayos anteriores tener capacidad fitorremediadora, tanto en suelos contaminados con hidrocarburos livianos y extrapesados (Hernández-Valencia y Mager, 2003; Navas, 2012); no obstante, en este estudio las plantas no toleraron la concentración de 5% (p/p) de crudo pesado y se hizo necesario un proceso de bioestimulación previo, para disminuir la concentración de petróleo y evitar la muerte de los ejemplares trasplantados.

Una vez establecida la planta, la disminución en el contenido de aceites y grasas fue significativa respecto a los tratamientos sin planta y con adecuación del suelo (SP) y el control sin planta y sin adecuación del suelo (TC), aunque en el tiempo en la cual transcurrió el ensayo, no se pudo alcanzar el límite de limpieza establecido en la legislación venezolana (Decreto 2635). Ello confirma lo encontrado en estudios previos, sobre el hecho que la fitorremediación es un proceso de limpieza de suelos contaminados con petróleo mucho más lento que la biorremediación (Cunningham 1996).

El efecto de la planta sobre la actividad microbiana del suelo se hizo patente al evaluar la actividad de estos con indicadores tales como la respiración basal, el carbono de la biomasa microbiana y actividad de la enzima deshidrogenasa. Si bien los valores

más altos de estos parámetros se obtuvieron durante la fase inicial de bioestimulación para todos los tratamientos, en la fase de post bioestimulación, el tratamiento con plantas mostró la mayor actividad microbiológica, hecho que se correlaciona con la mayor disminución del contenido de aceites y grasas en el suelo (Navas, 2012; Mager y Hernández-Valencia, 2013). Evidentemente, estos son indicios de la importancia de los procesos microbiológicos en la degradación de los hidrocarburos del petróleo y especialmente del papel de la rizósfera para estimular esta actividad.

A la luz de los resultados obtenidos en este estudio, varias recomendaciones o ensayos pueden diseñarse para mejorar el protocolo aquí probado. La cercanía alcanzada en cuanto a la disminución del contenido de aceites y grasas, sugiere en primera instancia que es necesario la prolongación del período de estudio de los ensayos, de manera que permita al tratamiento de fitorremediación una concentración de aceites y grasas inferior al 1 % establecido por la ley. Adicionalmente, se pueden realizar aporques en los alrededores de las plantas y adicionar cal para disminuir la acidez del suelo, factores que incentivarían la actividad microbiana y la volatilización de componentes de compuestos carbonados lábiles. Por último, se recomienda la realización de ensayos de toxicidad en los suelos biotratados, pues existe la posibilidad que aunque se cumpla la meta de limpieza, el suelo tratado sea tóxico para plantas y animales (Infante y Morales García, 2012).

CONCLUSIONES

- La especie *Megathyrsus maximus* no toleró concentraciones de 5 % (p/p) de crudo pesado, en suelos de sabanas acondicionados con cáscara de arroz y con adición de N.P.K y urea. Es necesario biotratar previamente la mezcla suelo:desecho y disminuir la concentración de aceites y grasas a 2,87 % para poder incorporar la planta. Una vez incorporada la planta, el tratamiento con *Megathyrsus maximus* es más eficiente en la remoción de aceites y grasas con un 46 % de reducción en 150 días, seguido de un 37 % para el tratamiento SP y 28% para el tratamiento TC.
- Los análisis de fracciones mostraron que tanto el contenido de saturados y aromáticos disminuyeron al término del ensayo, pero no se encontraron diferencias entre tratamientos. Los porcentajes de reducción en el contenido de saturados fueron de 48, 42, y 34,8 % para TP, SP y TC respectivamente. Para los aromáticos la pérdida fue de un 70 % para TP, un 66 % para SP, y un 64 % para TC. La disminución en la concentración de resinas y asfaltenos en 150 días no fue significativa.
- La respiración basal, el carbono de la biomasa microbiana y la actividad de la enzima deshidrogenasa fue mayor siempre en el tratamiento TP, seguido de SP y TC. Esta mayor actividad microbiana en TP se asocia también con la mayor disminución del contenido de aceites y grasas. En general, la respiración basal, la biomasa de carbono microbiano y la actividad de la enzima deshidrogenasa mostraron un incremento en la fase inicial del biotratamiento, el cual se asocia a la mayor disponibilidad de sustratos carbonados. Posteriormente decae hasta el término del ensayo por la reducción en la disponibilidad de los mismos. Pese a eso, solo se encontró una correlación significativa entre la respiración basal y el

carbono microbiano para el tratamiento control y entre la actividad de la enzima deshidrogenasa y la respiración basal para el tratamiento TP y el tratamiento SP.

BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K. y Nannipieri, P. 1995. Methods in applied soil microbiology and biochemistry. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. Londres, Inglaterra.
- Anderson, J. P. E. y Domsch, K.H. 1978. A physiological method for the quantitative measurement of microbial biomass in soils. *Soil. Biol. Biochem.* **10**: 215 – 221.
- Anderson, T. H. y Domsch, K. H. 1993. The metabolic quotient for CO₂ (q_{CO_2}) as a specific activity parameter to asses the effects of environmental conditions, such as pH, on the microbial biomass of forest soils. *Soil. Biol. Biochem.* **25 (3)**: 393 – 395.
- Anderson, T. H. 2003. Microbial eco-physiological indicators to asses soil quality. *Agr. Ecosyst. Environ.* **98**: 285 – 293.
- Anderson, T. H. y Domsch, K. H. 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil. Biol. Biochem.* **42**: 2039 – 2043.
- Atlas, R. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* **45 (1)**: 180 – 209.
- Atlas, R. y Bartha, R. 1998. Microbial ecology: Fundamentals and applications. Benjamin Cummings Publishers Company. San Francisco, Estados Unidos. Pp 393 – 399.
- Bossert, I., Kachel, W. M. y Bartha, R. 1984. Fate of hydrocarbons during oily sludge disposal in soil. *Appl. Environ. Microb.* **47 (4)**: 763 - 767.
- Brady, N. y Weil, R. 2008. The nature and properties of soils. Pearson Prentice Hall. Décimo-cuarta Edición. Upper Saddle River, Nueva Jersey.

- Brandt, R., Merkl, N., Schultze-Kraft, R, Infante, C. y Broll, G. 2006. Potential of Vetiver (*Vetiveria zizanoides* (L.) Nash) for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. *Int. J. Phytoremediat.* **8**: 273 – 284.
- Burken, I. G. y Schnoor, J. L. 1996. Phytoremediation: plant uptake of atrazine and role of root exudates. *J. Environ. Eng.* **122**: 958 – 963.
- Casanova, E. O. 2005. Introducción a la ciencia del suelo. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela.
- Casida, L. E. Jr., Klein, D. A. y Santoro, T. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* **98**: 371 – 376.
- Casida, L. E. Jr. 1977. Microbial metabolic activity in soil measured by dehydrogenase determinations. *Appl. Environ. Microb.* **34** (6): 630 – 636.
- Cauwenberghe, L. y Roote, D.S. 1998. *In situ* bioremediation. Technology overview report. TO-98-01.
- Chaîneau, C. H., Morel, J.L. y Oudot, J. 2000. Bioremediation and biodegradation: biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *J. Environ. Qual.* **29**: 568 – 578.
- Cook, B., Pengelly, B., Brown, S., Donnelly, J., eagles, D., Franco, A., Hanson, J. y colaboradores. 2005. Tropical forages. An Interactive selection tool. [en línea].http://www.tropicalforages.info/key/Forages/Media/Html/Panicum_maximum.htm [Consulta: 23 septiembre 2013].
- Cunningham, S., Anderson, T., Schwab, P. y Hsu, F. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* **56**: 55 – 114.
- Daniel, W. 2005. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. Limusa Wiley. Cuarta Edición. México.

- Deuel, L.E. y Holliday, G.H. 1994. Soil remediation for the petroleum extraction industry. Penn Well Books. Segunda Edición. Tulsa, OK.
- Frankenberger, W.T. y Dick, W.A. 1983. Relationships between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **47(5)**: 945 – 951.
- Frick, C.M., Farrell, R.E. y Germida, J.J. 1999. Assessment of phytoremediation as an *in situ* technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance Canada. Calgary. Canadá.
- García, C. y Hernández, T. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Bio. Biochem.* **29(2)**: 171 – 177.
- García Izquierdo, C., Gil Sotres, F., Hernández Fernández, T., y Trasar Cepeda, C. (eds.). 2003. Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España.
- Gaskin, S. y Bentham, R. 2010. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Sci. Total Environ.* **408**: 3683 – 3688.
- Hedge, R.S. y Fletcher, J. S. 1996. Influence of plant root stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere* **32**: 2471 – 2479.
- Hernández-Valencia, I. y López-Hernández, D. 2002. Pérdida de nutrientes por la quema de la vegetación de una sabana de *Trachypogon*. *Rev. Biol. Trop.* **50** (3/4) 1013 – 1019.
- Hernández-Valencia, I. y Mager, D. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitoremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro.* **15(3)**: 149 – 153.

- Horvath, R.S. 1972. Microbial co-metabolism and the degradation of organic compounds in nature. *Bacteriol. Rev.* **36**: 146 – 155.
- Huang, X., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, B. y Greenberg, B.M. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchem. J.* **81**: 139 – 147.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K. y Schwab, A. P. 2001a. Bioremediation and Biodegradation. Phytoremediation of aged sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* **30**: 395 – 403.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K. y Schwab, A. P. 2001b. Bioremediation and Biodegradation. Phytoremediation of aged sludge: effect of irrigation techniques and scheduling. *J. Environ. Qual.* **30**: 1516 – 1522.
- Infante, C., Morales, F., Ehrmann, E.U., Hernández-Valencia, I. y Leon, N. 2010a. Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. Trends in Bioremediation and Phytoremediation. Grazyna Plaza. Primera Edición. Kerala, India.
- Infante, C., Ortega, C., Morales, F., Ehrmann, U., Hernández-Valencia, I. y Pérez, R. 2010b. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con crudo liviano. *Bioagro.* **22(2)**: 145 – 152.
- Infante, C., Morales, Hernández-Valencia, I., López, L. y Toro, M. 2012a. Phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils in Venezuela. Pp. 99 – 109 en: Anjum, N. A., Pereira, M. E., Ahmad, I., Duarte, A. C., Umar, S. y Khan, N. A. (eds.), *Phytotechnologies: Remediation of environmental contaminants*. CRC Press. Taylor & Francis Group. Primera Edición. Boca Ratón, Florida, E.U.A.

- Infante, C. y Morales García, F.A. 2012b. Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia*. **37(10)**: 782 – 788.
- Insam, H., Hutchinson, T.C. y Reber, H.H. 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Bio. Biochem.* **28 (4 – 5)**: 691 – 694.
- Jenkinson, D. S. y Ladd, J. N. 1981. Microbial biomass in soil: measurement and turnover. pp. 415 – 471 En E.A. Paul y J.N. Ladd (eds). *Soil Biochemistry*, Voume 5. Marcel Dekker, New York.
- Leahy, J.G., Colwell, R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* **54**: 305 – 315.
- Mager, D. y Hernández-Valencia, I. 2013. Actividad microbiana durante la biorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. **30**: 53 – 72.
- Malik, A. 2006. Bioremediation. *Environmental. Microbiology*. [en línea] <http://hdl.handle.net/123456789/659> [Consulta: 29 de abril 2013].
- Margesin, R. y Schinner, F. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated of cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **63(7)**: 2660 - 2664.
- Margesin, R. y Schinner, F. 2001. Biodegradation and Bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**: 650 – 663.
- Mc Gill, W.B. y Rowell, M.J. 1980. Determination of oil content of oil contaminated soil. *Sci. Total Environ.* **14(3)**: 245 – 253.

- Meagher, R. 2000. Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Plant Biol.* **3**: 153 – 162.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R. y Infante, C. 2004. Phytoremediation in the tropics- The effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal.* **8 (3 – 4)**: 177 – 184.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R. y Infante, C. 2005a. Phytoremediation in the tropics – influence on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Pollut.* **138**: 86 -91.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R. y Infante, C. 2005b. Assesment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* **165**: 195 – 209.
- Merkl, N. y Schultze-Kraft, R. 2006a. Influence of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on bacterial community structure in petroleum contaminated soils. *Intl. J. Soil Sci.* **1 (2)**: 108 – 117.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R. y Arias, M. 2006b. Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil. *Microbiol. Res.* **161**: 80 – 91.
- 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.
- Rivera-Cruz, M., Ferrera-Cerrato, R., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L. y Rodríguez-Vázquez, R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia.* **38**: 1 – 12.

- Sokal, R. y Rohlf, J. 1995. Biometry. The principles and practice of statistics in biological research. W. H. Freeman and Company. Tercera Edición. Nueva York, E.U.A.
- Stapleton, R. D., Savage, D. C., Sayler, G. S. y Stacey, G. 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in a extremely acidic environment. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: (11). 4180 – 4184.
- Susarla, S., Medina, V. F. y McCutcheon, S.C. 2002. Phytoremediation: an ecological solution to organic chemical contamination. *Ecol. Eng.* **18**: 647 – 658.
- Trasar-Cepeda, C., Leirós, C., Gil-Sotres, F. y Seoane, S. 1997. Towards a biochemical quality index for soils: an expression relating several biological and biochemical properties. *Biol. Fert. Soils.* **26**(2):100 – 106.
- Usberti, J. A y Jain, S. 1979. Ecotypic differentiation in guineagrass (*Panicum maximum* Jacq.). *Agro-Ecosystems.* **5**: 147 – 158.
- Vivaldi, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* **73**(7): 1163 – 1172.
- Wenzel, W. 2009. Rhizosphere processes and Management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil.* **321**: 385 – 408.
- White, P. M., Wolf, D. C., Thoma, G. J. y Reynolds, C. M. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water Air Soil Poll.* **169**: 207 – 220.