

FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO PESADO USANDO *Megathyrus maximus*

Ismael Hernández-Valencia y Guillermo Méndez*

Instituto de Zoología y Ecología Tropical. Facultad de Ciencias. Universidad Central de Venezuela. Ciudad Universitaria. Apdo Postal 20513. Caracas 1020-A. Venezuela. *ismael.hernandez@ciens.ucv.ve

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió la capacidad del pasto *Megathyrus maximus* para fitorremediar un suelo contaminado con petróleo pesado, a través de los cambios durante 180 días en el contenido de aceites y grasas y de indicadores de la actividad microbiológica en el suelo (actividad de la enzima deshidrogenasa, biomasa del carbono microbiano y respiración basal), los cuales fueron evaluados en dos tratamientos, uno en suelos contaminados al 5% con petróleo pesado (15°API), en donde se trasplantó *M. maximus* y otro en suelos contaminado sin la planta. Los resultados mostraron que en 180 días el contenido de hidrocarburos se redujo en un 46 %, en el tratamiento con *M. maximus* y en 37 % en el tratamiento sin plantas. Para ambos tratamientos las fracciones de los hidrocarburos que disminuyeron fueron las de aromáticos y saturados, mientras que las resinas y asfaltenos permanecieron sin variaciones. Los indicadores bioquímicos y microbiológicos evaluados, mostraron cambios en el tiempo para ambos tratamientos, siendo por lo general superiores en el tratamiento con el pasto, a excepción del coeficiente metabólico. La mayor actividad microbiana en el tratamiento con plantas, probablemente se deba a la presencia de una rizósfera que favorece esta actividad y consecuentemente la degradación del hidrocarburo.

Palabras clave: contaminación, biorremediación, pastos, petróleo, trópico.

Phytoremediation of a soil contaminated with heavy oil using *Megathyrus maximus*

ABSTRACT

In the present work, the ability of the grass *Megathyrus maximus* to phytoremediate a soil contaminated with heavy oil was studied, through the changes during 180 days in the content of oil and grease and indicators of microbiological activity in the soil (dehydrogenase activity, microbial carbon biomass and basal respiration), which were evaluated in two treatments, one in contaminated soils where *M. maximus* was transplanted in a soil with 5% of heavy oil (15°API) and another in contaminated soils without the plant. The results showed that in 180 days the hydrocarbon content was reduced by 46 % in the treatment with *M. maximus* and by 37 % in the treatment without plants. For both treatments, the hydrocarbon fractions that decreased were aromatic and saturated, while resins and asphaltene remained unchanged. The biochemical and microbiological indicators evaluated showed changes over time for both treatments, being generally higher in the treatment with grass, except for the metabolic coefficient. The greater microbial activity in the treatment with plants is probably due to the presence of a rhizosphere that favors this activity and consequently the degradation of the hydrocarbon.

Keywords: Pollution, bioremediation, pastures, petroleum, tropic.

INTRODUCCIÓN

La industria petrolera tiene el potencial de contaminar el entorno por accidentes o descargas controladas a través de sus diferentes procesos, como son la exploración, perforación, producción, refinación, almacenamiento, distribución y comercialización. Variadas técnicas bajo principios físicos, químicos y biológicos han sido desarrolladas para atender los problemas de contaminación de suelos, con ventajas y desventajas en cuanto a los requerimientos de recursos, eficiencia de la limpieza, costos asociados, requerimientos de mano de obra especializada e impactos ambientales en las áreas recuperadas, entre otros factores (Yavari *y col.*, 2015). Dentro de la variedad de técnicas biológicas de restauración de suelos contaminados, la fitorremediación se considera una técnica con el menor impacto ecológico, ya que es un proceso pasivo, estéticamente agradable, útil para degradar una gran variedad de contaminantes y que procura una mejora en la calidad del suelo con el aumento del contenido del carbono orgánico, la porosidad y la infiltración del agua, y reduce los riesgos de erosión (Frick *y col.*, 1999; Pivetz, 2001).

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) puede utilizar las plantas y microorganismos autóctonos, (f) sus costos son menores (Alkorta *y col.*, 2010; Khan *y col.*, 2013). 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) está limitada a la profundidad del suelo a la cual pueden penetrar las raíces, (c) su aplicación requiere de periodos 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 (Alkorta *y col.*, 2010; Khan *y col.*, 2013; Pilon-Smits, 2005, Infante *y col.* 2012).

Las plantas tienen diferentes mecanismos para la remoción, estabilización y/o degradación de hidrocarburos orgánicos, aunque sólo se producen unos pocos procesos de degradación directamente en los tejidos vegetales, la mayor parte de la degradación es el resultado de la compleja asociación de raíces y sus microorganismos asociados, que se denomina rizorremediación (Cai *y col.*, 2010; Khan *y col.*, 2013; Ndimele *y col.*, 2011). Las plantas promueven la actividad y el crecimiento microbiano en la rizósfera (efecto rizosférico) regulando o alterando positivamente el ambiente del suelo (por ejemplo liberación de exudados, modificación del pH, etc.) (Cunningham *y col.*, 1996). Así como los microorganismos se benefician de las plantas, también ciertas bacterias llamadas rizobacterias promotoras del crecimiento (plant growth

promoting rhizobacteria o PGPR en inglés), tienen un efecto benéfico, pues incrementan la tolerancia de las plantas a la contaminación con petróleo (Huang *y col.*, 2005). 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 su crecimiento en la rizósfera (Burken & Schnoor, 1996; Chaîneau *y col.*, 2000; Cunningham *y col.*, 1996; Hegde y Fletcher, 1996; Wenzel, 2009; White *y col.*, 2006). 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).

Para el desarrollo de un sistema efectivo de fitorremediación se deben cumplir criterios de factibilidad técnica, económica y social. En este sentido, las especies vegetales a ser seleccionadas para este propósito deben ser capaces de tolerar concentraciones del contaminante relativamente altas y procurar la descontaminación del suelo en los tiempos más cortos posibles, para que los efectos de la contaminación no se propaguen de manera intensa e irreversible en el ambiente.

Como contribución al estudio del potencial fitorremediador de plantas adaptadas al trópico, el presente trabajo evaluó la capacidad de *Megathyrus maximus* para remediar suelos con crudo pesado. Esta especie ya probó en estudios previos tener capacidad para remediar suelos contaminados con crudos livianos (Hernández-Valencia y Mager, 2003), y además posee otros características deseables de una buena planta fitorremediadora, como son: (a) tolerancia a niveles moderados de contaminación con petróleo, (b) su rápido crecimiento, (c) rizósfera fasciculada y extendida que favorece el desarrollo de una microbiota asociada con potencial para degradar crudo, (d) requerimientos agronómicos ampliamente conocidos y propágulos que se expenden fácilmente. Se parte del principio que la rizósfera de esta planta estimula la actividad microbiana y con ello la degradación del hidrocarburo, el cual se constituye en una fuente de carbono y energía para los microorganismos, reduciendo así la concentración del contaminante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental y preparación de muestras. Se utilizó para los ensayos un suelo obtenido del horizonte A de un Typic Haplustox, franco arenoso, fuertemente ácido y pobre en nutrientes (Hernández-Valencia y Mager, 2003), proveniente de la localidad de El Sombrero, estado Guárico, Venezuela. El petróleo utilizado presentó una gravedad específica de 15° API que lo identifica como petróleo pesado. Se utilizó *Megathyrsus maximus* (Jacq.) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs (gamelote), ya que estudios previos han demostrado su potencial fitorremediador en suelos contaminados con hidrocarburos livianos (Hernández-Valencia y Mager, 2003). Esta gramínea es proveniente de África, pero de amplia distribución en Venezuela por su uso en el establecimiento de pastizales mejorados. Se utilizaron plantas con alturas entre 25-30 cm, obtenidas a partir de la germinación de semillas certificadas en suelos no contaminados.

Se establecieron dos tratamientos en condiciones de invernadero: a) suelo contaminado con 50.0 mg/g de petróleo pesado y con el pasto (CP), y b) suelo contaminado con 50.0 mg/g de petróleo pesado sin el pasto (SP). El suelo contaminado fue una mezcla preparada con 85 % de suelo, 5 % de petróleo extra pesado y 10 % de cáscara de arroz (m/m). La cáscara de arroz funge como agente estructurante, permite una mayor capacidad de retención de agua, favoreciendo la actividad microbiana (Infante *y col.*, 2012). Una cantidad de 2.5 kg de las mezclas fue colocada en envases cilíndricos de policloruro de vinilo (PVC) de 30 cm de alto y 10 cm de diámetro. En el tratamiento con el pasto se sembró un individuo de *M. maximus* por envase. Las condiciones microclimáticas promedio del invernadero durante el ensayo fueron 23.2 °C de temperatura, 450 µE/s de radiación y 85 % de humedad relativa. Para cada tratamiento se establecieron 5 réplicas y la duración del experimento fue de 180 días.

Todos los tratamientos fueron fertilizados con N:P:K: (15:15:15) y sulfato de amonio, en una relación C:N:P de 100:2:0.2, similar a la utilizada por Hutchinson *y col.*, (2001). El fertilizante se incorporó un 50 % (1.772 g de N:P:K y 4.264 g de sulfato de amonio por envase) al inicio del ensayo, y el restante 50 % fue repartido equitativamente a los 30 y 60 días siguientes. Los envases fueron regados cada 5 d con agua del servicio doméstico, manteniendo el suelo a 50 % de su capacidad de campo. La capacidad de campo fue estimada por triplicado en una masa de suelo previamente contaminada con el petróleo extra pesado a la concentración de 50 mg/g, al cual se agregó agua hasta su saturación, luego el suelo fue cubierto con un manto plástico para reducir las pérdidas de agua por evaporación y posteriormente se dejó drenar el excedente de agua durante 72 h. El agua retenida o capacidad de campo se estimó como la diferencia de masa entre el suelo húmedo luego de 72 h y el suelo seco, después de ser secado por 48 h a 105 °C en una estufa (Anderson e Ingram, 1992).

Determinación de hidrocarburos del petróleo y sus fracciones. Se tomaron muestras de los suelos de ambos tratamientos a los 0, 15, 30, 60, 120 y 180 d de iniciado el ensayo para realizar determinaciones del contenido de aceites y grasas por el método EPA 3540C (USEPA, 1996), empleando como agente extractante diclorometano. Adicionalmente, a los extractos de hidrocarburos obtenidos al inicio y al final del ensayo de cada tratamiento se hizo un fraccionamiento para determinar las variaciones en el contenido de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), de acuerdo con el método 5520 (APHA, 1998), procedimiento que se basa en la separación de las diferentes fracciones del petróleo a través de técnicas de precipitación y adsorción, según la solubilidad y polaridad de dichas fracciones.

Determinación de indicadores de la actividad microbiológica en el suelo. En las muestras de suelos obtenidas en cada muestreo se determinó la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH), el carbono de la biomasa microbiana (Cmic) y la respiración basal (RB). La ADH se estimó de acuerdo al método de (Casida *y col.*, 1964), que se basa en la reducción del cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) por la acción de dicha enzima a trifetil formazan (TPF), lo que origina un pigmento de color rojo soluble en metanol. Para el análisis se emplearon 1.5 g suelo en peso fresco que se colocaron en tubos de ensayo con 0.25 mL de TTC al 3 %, 0.05 g de CaCO₃ y 2.5 mL de agua destilada. Las muestras se incubaron por 24 h a 37 °C y posteriormente se añadieron 2.5 mL de CH₃OH. Finalmente, la muestra se filtró y se midió la absorbancia a 485 nm. Los patrones fueron preparados a partir de una solución estándar de TPF de 1mg/L.

La determinación del C microbiano (Cmic) empleó el método de fumigación-extracción según (Vance *y col.*, 1987) que estima este indicador como el contenido de carbono soluble en una solución de K₂SO₄ 0.5 M. Se utilizaron 5 g de suelo a 50 % de su capacidad de campo. Cinco réplicas se fumigaron con cloroformo libre de etanol en una cámara de vacío por 24 h con el fin de provocar la muerte de las células microbianas, mientras que las cinco réplicas restantes no fueron fumigadas. El carbono de las muestras fumigadas y no fumigadas se extrajo con 40 ml de K₂SO₄ 0.5 M agitando durante 1 h. Luego se tomaron 8 mL del extracto y se añadieron 15 mL de una mezcla ácida (2/3 partes de H₂SO₄ y 1/3 de H₃PO₄), 2 mL de K₂Cr₂O₇ 66,7 mM y 70 mg de HgO. La mezcla se colocó a digestión durante 30 min a 150 °C, y luego se valoró con sulfato amónico ferroso 33 mM empleando como indicador 1,10 fenantrolina-ferrosa 25 mM. La cantidad de carbono de la biomasa microbiana se determinó mediante la fórmula:

$$C_{mic} = (C \text{ orgánico fumigado} - C \text{ orgánico no fumigado})/K_{ec}$$

Donde $K_{ec} = 0,38$, una constante de recuperación calculada a partir de la correlación de los resultados obtenidos en doce suelos diferentes en donde se utilizó este método (Vance *y col.*, 1987).

La respiración basal (RB) o CO₂ liberado por los microorganismos fue determinada por el método de Anderson e Ingram (1992). Para cada tiempo se utilizaron 25 g de suelo al 50% de capacidad de campo y se colocaron en envases de plástico con 50 mL de capacidad. En envases similares se colocaron 10 mL de NaOH 0.5 M como solución que absorbe el CO₂ emitido por los microorganismos. Ambos envases se colocaron dentro de un recipiente de vidrio de 1L herméticamente cerrado, e incubados en la oscuridad a 23 °C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación se añadió a cada envase con el álcali, 1 mL de BaCl₂ 0.5 M para precipitar como carbonato al CO₂ fijado y el NaOH remanente se valoró con HCl 0.5 M, utilizando como indicador fenoltaleína. Con los datos de respiración basal y Cmic se calculó el coeficiente metabólico ($qCO_2 = RB/Cmic$), que es una medida de la eficiencia con la cual los microorganismos utilizan el carbono disponible para la biosíntesis (Marín y col., 2005). Los resultados de los indicadores antes mencionados fueron expresados en base al peso seco, luego de secar triplicados de las muestras de suelo en una estufa a 105 °C por 48 h y pesadas en una balanza de 0,01 g de precisión.

Análisis estadísticos. Las medias de los tratamientos de los diferentes parámetros evaluados fueron comparadas a través de un análisis de varianza de dos vías y la prueba *a posteriori* Fisher Least Significant Difference (LSD) con un nivel de significancia del 0.05. Previamente se mostró la homocedasticidad de los datos con la prueba de Bartlett. También se realizaron pruebas de correlación lineal de las variaciones en el tiempo entre el contenido de hidrocarburos, respiración basal, C microbiano, coeficiente metabólico y actividad de la enzima deshidrogenasa. Para todas las pruebas estadísticas se usó el programa Statistica 8.0 (Statsoft, 2007).

RESULTADOS

Se debe mencionar que el método utilizado para estimar aceites y grasas permite determinar tanto los hidrocarburos de tipo mineral, como vegetal y animal, pero en vista que análisis previos mostraron que el contenido de aceites y grasas en suelos no contaminados fue inferior a 5 mg/g, se desestimó la contribución de la fracción vegetal y animal, por lo que en consecuencia nos referiremos indistintamente a los aceites y grasas extraídos en este estudio como a hidrocarburos del petróleo. Adicionalmente, es importante destacar que a pesar de preparar mezclas de suelos contaminado con una concentración del 5.0%, la estimación inicial de aceites y grasas por el método de extracción utilizado fue de 3.5%. Ello es usual, ya que dicha técnica no es completamente eficiente en la extracción de todo el hidrocarburo, además que parte de él se pierde por volatilización durante la preparación de la mezcla. Por esta razón tomaremos para el análisis de los resultados una concentración inicial de 3.5% obtenida en la extracción.

La Figura 1 muestra la variación en el contenido de aceites y grasas respecto al tiempo para los tratamientos evaluados. De una concentración inicial de aceites y grasas de 3,5%, al término del ensayo esta disminuyó a 1,89% en el suelo con el pasto (CP) y a 2,19% para el tratamiento sin pasto (SP), siendo los tratamientos estadísticamente diferentes entre sí al término del ensayo y con respecto al inicio del ensayo, confirmando la disminución de la contaminación del suelo en los tratamientos considerados. En términos porcentuales, CP redujo en un 46% la concentración de aceites y grasas y SP en un 37%. La disminución de la concentración de aceites y grasas en el tiempo fue progresiva, estableciéndose diferencias a partir de los 90 días entre los tratamientos CP y SP. Al inicio del ensayo se observan las mayores tasas de degradación de aceites y grasas que posteriormente se va reduciendo en el tiempo.

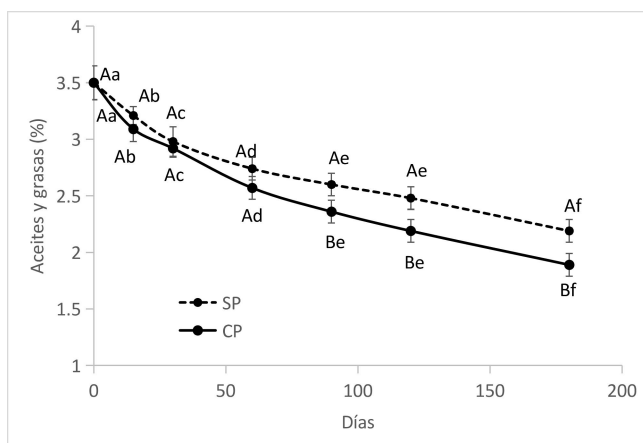


Figura 1. Variación en el tiempo del contenido de aceites y grasas. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias para un mismo tratamiento en diferentes tiempos. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo. Las barras corresponden a la desviación estándar ($n = 5$). CP: tratamiento con el pasto, SP: tratamiento sin el pasto.

Cuando se evalúan los cambios en las fracciones de hidrocarburos, se observa una disminución en la concentración de las fracciones de aromáticos y saturados (Figura 2), mientras que las fracciones de resinas y asfaltenos se mantienen similares. Pese a que se encontraron diferencias en la degradación de aceites y grasas entre tratamientos, la disminución en el contenido de saturados y aromáticos en CP y SP fueron de similar magnitud. El tratamiento CP mostró para los saturados una disminución del 48%, en tanto que el tratamiento SP un 42%. Para los aromáticos la pérdida fue de un 70% para el suelo CP, un 66% para SP.

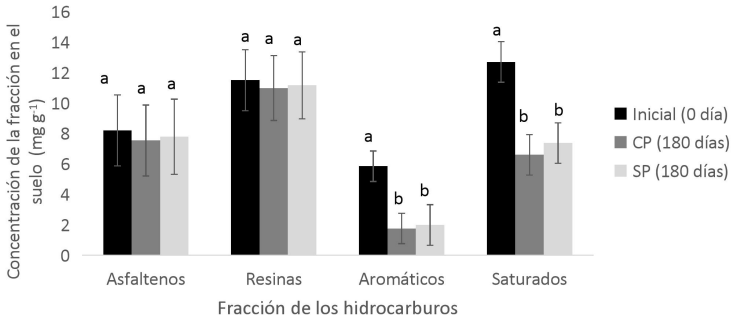


Figura 2. Variaciones en las fracciones de aromáticos, resinas, aromáticos y saturados al inicio y luego de 180 días del tratamiento. Letras similares indican que no existen diferencias significativas entre las fracciones. Barras indican el error estándar.

La respiración basal registró un pico a los 15 días para ambos tratamientos y luego presenta una disminución progresiva hasta el término del ensayo (Figura 3). El valor máximo fue de 59 y 58 mg CO₂ kg⁻¹ d⁻¹ a los 15 días, y disminuye al final del ensayo a 28 y 20 mg CO₂ kg⁻¹ d⁻¹ para CP y SP respectivamente. En líneas generales, la respiración basal es similar entre tratamientos a los 0, 15 y 30 días y luego se diferencian, siendo superior en el tratamiento CP respecto al SP. Por su parte, el C microbiano mostró para ambos tratamientos un incremento hasta el día 30 y posteriormente se mantiene estable hasta el término del ensayo, siendo mayor a partir del día 60 para CP (Figura 4). Los valores de C microbiano variaron entre 50 mg C kg⁻¹ al inicio de ambos tratamientos hasta un máximo el día 60 de 330 y 230 mg C kg⁻¹ para CP y SP, respectivamente.

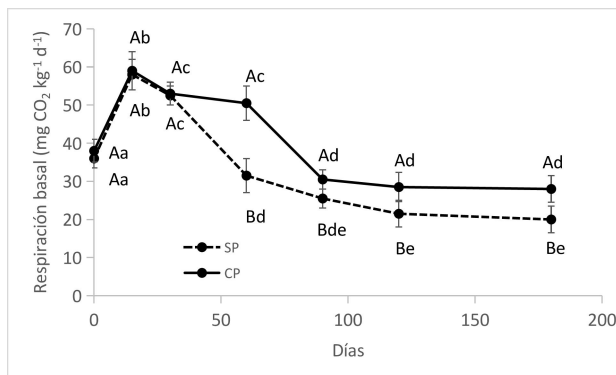


Figura 3. Variación en el tiempo de la respiración basal. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias para un mismo tratamiento en diferentes tiempos. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo. Las barras corresponden a la desviación estándar (n = 5). CP: tratamiento con el pasto, SP: tratamiento sin el pasto.

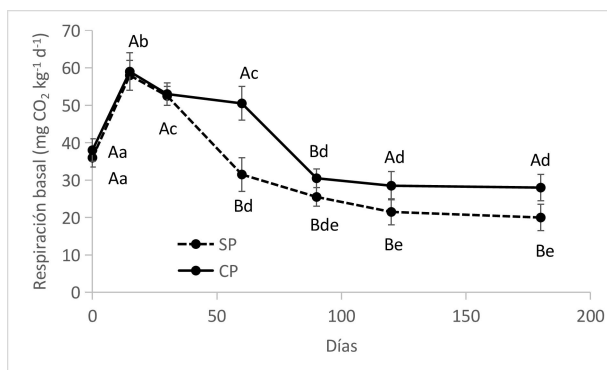


Figura 4. Variación en el tiempo del contenido de C microbiano. Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias para un mismo tratamiento en diferentes tiempos. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo. Las barras corresponden a la desviación estándar (n = 5). CP: tratamiento con el pasto, SP: tratamiento sin el pasto.

El coeficiente metabólico mostró una tendencia similar entre ambos tratamientos. Por una parte, el máximo valor del coeficiente se observó al inicio del ensayo (día 0), disminuyendo progresivamente al término del ensayo (Figura 5). Por otra parte, no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. Finalmente, la ADH mostró un comportamiento similar al de la respiración basal, con un incremento hasta el día 30 y luego una disminución progresiva al término del ensayo (Figura 6). De hecho, la única correlación estadísticamente significativa entre todas las variables estudiadas fue entre la ADH y la respiración basal ($r = 0.93$ para CP y $r = 0.97$ para SP, $n = 6$, $p \leq 0.05$).

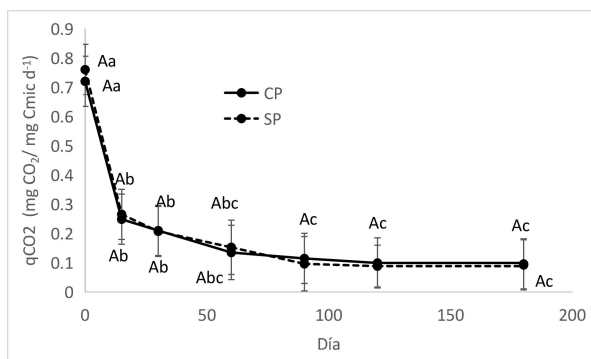


Figura 5. Variación en el tiempo del coeficiente metabólico (qCO_2). Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias para un mismo tratamiento en diferentes tiempos. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo. Las barras corresponden a la desviación estándar (n = 5). CP: tratamiento con el pasto, SP: tratamiento sin el pasto.

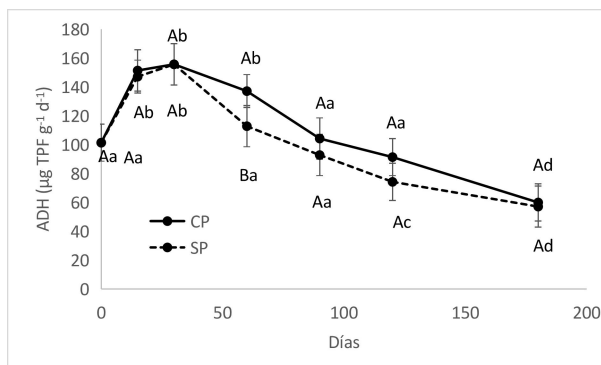


Figura 6. Variación en el tiempo de la actividad de la enzima deshidrogenasa (ADH). Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias para un mismo tratamiento en diferentes tiempos. Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para un mismo tiempo. Las barras corresponden a la desviación estándar (n = 5).

CP: tratamiento con el pasto, SP: tratamiento sin el pasto.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio y en ensayos anteriores con *M. maximus* (Hernández Valencia *y col.*, 2017; Mager y Hernández-Valencia, 2013), confirman la capacidad fitorremediadora de esta especie. En el trabajo de Mager y Hernández-Valencia (2013) el porcentaje de reducción fue superior; un 63%; sin embargo, los ensayos tuvieron una duración de 240 días, se utilizó un crudo liviano con una mayor proporción de fracciones biodegradables (aromáticos y saturados), y una concentración inicial de petróleo del 3%, que es menos tóxico para las plantas (Hernández-Valencia *y col.*, 2017). Adicionalmente, estos autores aplicaron cal al suelo para disminuir la acidez (aumentar el pH de 4,9 a 6,5) y mejorar el desarrollo de las plantas; algo que eventualmente también pudo favorecer la actividad microbiana. Se ha observado que a valores de pH más ácidos en el suelo benefician a las comunidades de hongos en detrimento de las comunidades de bacterias, mientras que a pH menores a 4.5 se inhibe fuertemente la actividad de ambos grupos. Este aspecto puede estar asociado a un efecto tóxico por la mayor solubilidad del aluminio en estas condiciones y/o una menor productividad de las plantas (Rousk *y col.*, 2009). En este sentido, se ha determinado que la presencia de bacterias y hongos formando los denominados “consorcios microbianos” acelera la degradación del petróleo respecto a ensayos en donde se ha inoculado exclusivamente uno de los dos grupos (Rivera-Cruz *y col.*, 2004).

La disminución del contenido de aceites y grasas hasta 1,89 % al final del ensayo en el tratamiento con *M. maximus*, no cumplió con el límite establecido por el Decreto 2635, pues excede el 1 % de aceites y grasas (República de Venezuela, 1998). La dinámica observada en la disminución

del contenido de aceites y grasas en el tiempo sugiere que en un periodo más largo hubiera podido alcanzarse dicho límite. Incluso una mayor frecuencia de aireación a través de aporques, así como el encalado hubieran podido reducir más significativamente la concentración de aceites y grasas (Infante *y col.*, 2010; Mager y Hernández-Valencia, 2013).

La mayor disminución del contenido de hidrocarburos al inicio del ensayo para ambos tratamientos se relaciona con la rápida degradación de los componentes más lábiles, como son los saturados y los aromáticos, las fracciones más biodegradables (Ehrmann *y col.*, 2009; Infante y Morales, 2012) y posiblemente en la medida que estas fracciones van disminuyendo, también lo hace la tasa de degradación del hidrocarburo, tal como se observa al final del ensayo. De hecho, las fracciones de aromáticos y saturados son las únicas que muestran una disminución significativa en este estudio. Ensayos de fitorremediación realizados con crudos pesados por (Merkl *y col.*, 2005a), 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. En suelos plantados con *Urochloa brizantha* obtuvieron una disminución del 50% para los saturados; mientras que los aromáticos mostraron una disminución del 15 %, disminución similar a la obtenida en este ensayo en donde los saturados disminuyeron en un 48%, aunque para los aromáticos la disminución fue mayor con un 70%. Esto revela importantes diferencias en la degradación de las fracciones del petróleo, lo cual podría estar asociado no sólo a la especie, sino al tipo de manejo agronómico recibido (p.e. fertilización, riego, encalado, etc).

Es posible que para lograr una disminución efectiva de las fracciones polares se requiere una biorremediación por fases con un periodo más largo de tratamiento, que incluya una combinación de técnicas de limpieza, que además de la fitorremediación, también se incorpore el landfarming y la inoculación de organismos promotores del crecimiento (PGPR) y degradadores de hidrocarburos. Resultados que concuerdan con esta propuesta fueron obtenidos por (Huang *y col.*, 2005), quienes lograron reducción del 90% de los hidrocarburos totales de petróleo en un sistema de remediación multiprocesos durante 240 días, en donde no solo se incorporaron plantas, sino también landfarming, PGPR y microorganismos degradadores de hidrocarburos.

Se puede hablar de un efecto de aclimatación inicial, tal como lo muestran los datos de respiración basal, biomasa de carbono microbiano y ADH. 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 (Zamora *y col.* 2012). Posteriormente, los microorganismos aptos para aprovechar esta fuente de carbono, aumentan su actividad y

comienzan a crecer. Cuando los sustratos carbonados biodisponibles comienzan a disminuir, la actividad microbiana también lo hace (Margesin y Schinner, 2001). La presencia de exudados en la rizósfera parece haber estimulado la actividad microbiana, lo cual se refleja en valores superiores de respiración basal de CP con respecto a SP (Mager y Hernández-Valencia, 2013). Otros factores a tomar en cuenta de los valores superiores de CP con respecto a SP, es que el tratamiento con *M. maximus*, puede contar con mejor aireación y mejor distribución del agua por las raíces, factores que también favorecen una mayor actividad microbiana.

En lo que respecta a la biomasa microbiana, el tratamiento CP mostró un incremento desde el inicio hasta los 60 días, con diferencias significativas hasta el periodo 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 tratamiento SP también experimentó un incremento significativo 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 tendencia 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 de CP este descenso no se observó, 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 raíces desarrolladas a diferencia de ensayos en los cuales se sembraron semillas (Huang y col., 2005; Merkl y col., 2005a, 2005b). Esta mayor biomasa de raíces 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 CP con respecto a SP.

En referencia al coeficiente metabólico, los resultados no fueron significativamente diferentes para CP y SP. Una posible explicación a este hecho, es que si bien el tratamiento con *M. maximus* tenía una respiración basal superior al suelo sin plantas, éste también poseía una mayor biomasa microbiana; resultando esto en una relación o proporción muy similar a la del tratamiento SP. Al inicio del ensayo, los valores de qCO_2 fueron más altos y después fueron disminuyendo progresivamente con el tiempo. Este mayor qCO_2 al inicio podría interpretarse como un ambiente más estresante que requiere una mayor demanda de carbono para mantener el metabolismo de una menor biomasa microbiana, y en consecuencia una menor eficiencia energética (Anderson y Domsch, 2010). En la medida que procede la biodegradación de hidrocarburos, especialmente las fracciones de aromáticos y saturados que son más

tóxicas, el ambiente se hace menos estresante para los microorganismos y qCO_2 disminuye, con menores requerimientos de carbono para el mantenimiento del metabolismo de los microorganismos (Dilly *y col.*, 2001).

La enzima deshidrogenasa es frecuentemente usada en la estimación de los procesos *oxidativos* de sustancias orgánicas bajo condiciones aeróbicas. Esta oxidación de sustancias orgánicas está 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 (Casida *y col.*, 1964). 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).

El comportamiento de la actividad de la enzima deshidrogenasa tiene una explicación similar a la de la respiración basal. Un incremento inicial en los primeros 30 días y posteriormente un descenso sostenido asociado a la disminución de las fuentes de carbono degradables, en la medida que estas son consumidas por los microorganismos y las fracciones restantes más resistentes no pudieron ser utilizadas por su condición recalcitrante (Margesin y Schinner, 1997; Merkl *y col.*, 2005a). A los 60 días el efecto de la planta puede notarse en las diferencias significativas obtenidas del ensayo CP con respecto a SP. Esta mayor actividad de la enzima en el tratamiento CP 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.*, 2005b).

En síntesis, los resultados ratifican la capacidad de *M. maximus* para descontaminar suelos con crudos pesados, lo cual está ligado a la estimulación de la actividad biológica que produce el sistema de raíces, con un consecuente valores más altos del carbono de la biomasa microbiana, la respiración basal y la actividad de la enzima deshidrogenasa, que en su conjunto favorecen a una tasa mayor de degradación del hidrocarburo. El máximo de actividad de estos indicadores biológicos se observa a los 15-60 días, lo cual indica un proceso de aclimatación inicial de los microorganismos degradadores, que posteriormente adaptados favorecen la degradación del hidrocarburo. Las fracciones de aromáticos y saturados, que son las más biodisponibles, son las que acusan las mayores disminuciones por la degradación.

LITERATURA CITADA

- Alkorta, I., J. Becerril y C. Garbisu. 2010. Recovery of soil health: The ultimate goal of soil remediation processes. En: G. Plaza (Ed.), *Trends in bioremediation and phytoremediation* (1st ed., Vol. 1, pp. 1-9). Research Signpost. .
- Anderson, J., y J. Ingram. 1992. *Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods*. (Vol. 1). C.A.B. International.

- Anderson, T.H. y K.H. Domsch. 2010. Soil microbial biomass: The eco-physiological approach. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(12), 2039–2043.
- APHA. 1998. *Standard methods for the examination of water and wastewater* (20th ed.). American Public Health Association.
- Burken, J.G. y J.L. Schnoor. 1996. Phytoremediation: Plant Uptake of Atrazine and Role of Root Exudates. *Journal of Environmental Engineering*, 122(11), 958–963.
- Cai, Z., Q. Zhou, S. Peng y K. Li. 2010. Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1–3), 731–737.
- Casida, L.E., D.A. Klein y T. Santoro. 1964. Soil dehydrogenase activity. *Soil Science*, 98(6), 371–376.
- Chaineau, C.H., J.L. Morel y J. Oudot. 2000. Biodegradation of Fuel Oil Hydrocarbons in the Rhizosphere of Maize. *Journal of Environmental Quality*, 29(2), 569–578.
- Cunningham, S.D., T.A. Anderson, A. Paul Schwab y F.C. Hsu. 1996. *Phytoremediation of Soils Contaminated with Organic Pollutants* (pp. 55–114).
- Dilly, O., K. Winter, A. Lang y J.C. Munch. 2001. Energetic eco-physiology of the soil microbiota in two landscapes of southern and northern Germany. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 164(4), 407.
- Ehrmann, U., C. Infante y H. Martinez. 2009. Correlation between physical chemical properties of different venezuelan crude oils and their biodegradability. *Memorias Del 24th International Conference on Solid Waste Technology and Management*, 1–9.
- Frick, C.M., R.E. Farrel y J.J. Germida. 1999. *Assessment of phytoremediation as an in situ technique for cleaning oil-contaminated sites*. Petroleum Technology Alliance of Canada.
- García, C. y T. Hernández. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology and Biochemistry*, 29(2), 171–177.
- Hegde, R.S. y J.S. Fletcher. 1996. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, 32(12), 2471–2479.
- Hernández-Valencia, I., L.M. Lárez y J. García. 2017. Evaluación de la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes tipos de crudos sobre la germinación de dos pastos tropicales. *Bioagro*, 29(2), 73–82.
- Hernández-Valencia, I. y D. Mager. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitoremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*, 15(3): 149–153.
- Hernández Valencia, I., G. Navas y C. Infante. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrsus maximus*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 33(3):495–503.
- Huang, X.D., Y. El-Alawi, J. Gurska, B.R. Glick y B.M. Greenberg. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*, 81(1):139–147.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A.P. Schwab. 2001. Phytoremediation of Aged Petroleum Sludge: Effect of Inorganic Fertilizer. *Journal of Environmental Quality*, 30(2), 395–403.
- Infante, C. y F. Morales. 2012. Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando semillas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia*, 37, 1–7.
- Infante, C., F. Morales, E.U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y N. León. 2010. Hydrocarbons bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. En: G. Plaza (Ed.), *Trends in bioremediation and phytoremediation* (pp. 429–451).

- Khan, S., M. Afzal, S. Iqbal y Q.M. Khan. 2013. Plant–bacteria partnerships for the remediation of hydrocarbon contaminated soils. *Chemosphere*, 90(4), 1317–1332.
- Mager, D. e I. Hernández-Valencia. 2013. Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Revista de La Facultad de Agronomía de La Universidad Del Zulia*, 30, 52–71.
- Margesin, R. y F. Schinner. 1997. Efficiency of indigenous and inoculated cold-adapted soil microorganisms for biodegradation of diesel oil in alpine soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(7), 2660–2664.
- Margesin, R. y F. Schinner. 2001. Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 56(5–6), 650–663.
- Marin, J.A., T. Hernandez y C. Garcia. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmental Research*, 98(2), 185–195.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante. 2005a. Assessment Of Tropical Grasses And Legumes For Phytoremediation Of Petroleum-Contaminated Soils. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165(1–4), 195–209.
- Merkel, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante. 2005b. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental Pollution*, 138(1), 86–91.
- Ndimele, P.E., C.A. Kumolu-Joh y M.A. Anetekhai. 2011. The Invasive Aquatic Macrophyte, Water Hyacinth (*Eichhornia crassipes* (Mart.) Solm-Laubach: Pontedericeae): Problems and Prospects. *Research Journal of Environmental Sciences*, 5(6), 509–520.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*, 56(1), 15–39.
- Pivetz, B. E. 2001. *Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites*. Ground Water Issue EPE/540/S-01/500. USEPA: Office of Solid Waste and Emergency Response.
- República de Venezuela. 1998. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos., Pub. L. No. Decreto 2635, Gaceta Oficial Extraordinaria No 5245 del 3 de agosto de 1998. 1 (1998).
- Rivera-Cruz, M., R. Ferrera-Cerrato, P. Sánchez-García,V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vázquez. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia*, 38, 1–12.
- Rousk, J., P.C. Brookes y E. Bååth. 2009. Contrasting Soil pH Effects on Fungal and Bacterial Growth Suggest Functional Redundancy in Carbon Mineralization. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(6), 1589–1596.
- Statsoft. 2007. *Statistica. for Window* (8.0). Statsoft.
- Susarla, S., V.F. Medina y S.C. McCutcheon. 2002. Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering*, 18(5), 647–658.
- USEPA. 1996. *Soxhlet extraction, v. I-B. Method 3540C*.
- Vance, E.D., P.C. Brookes y D.S. Jenkinson. 1987. An extraction method for measuring soil microbial biomass C. *Soil Biology and Biochemistry*, 19(6), 703–707.
- Wenzel, W.W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant and Soil*, 321(1–2), 385–408.

- White, P.M., D.C. Wolf, G.J. Thoma y C.M. Reynolds. 2006. Phytoremediation of Alkylated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in a Crude Oil-Contaminated Soil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 169(1–4), 207–220.
- Yavari, S., A. Malakahmad y N.B. Sapari. 2015. A Review on Phytoremediation of Crude Oil Spills. *Water, Air, y Soil Pollution*, 226(8), 279.