



**FACULTAD DE AGRONOMIA
COMISION DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS
POSTGRADO EN CIENCIAS DEL SUELO**



**"FACTIBILIDAD DE USO DE LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGOS
GLOMEROMYCOTA EN LA BIORESTAURACIÓN DE UN SUELO
CONTAMINADO CON HIDROCARBURO"**

Rita Elisita Gamarra Calcurian

MARACAY 2014

**FACULTAD DE AGRONOMIA
COMISION DE ESTUDIOS PARA GRADUADOS
POSTGRADO EN CIENCIAS DEL SUELO
MARACAY 2014**

***“FACTIBILIDAD DE USO DE LA ASOCIACIÓN PLANTA-HONGOS
GLOMEROMYCOTA EN LA BIORESTAURACIÓN DE UN SUELO
CONTAMINADO CON HIDROCARBURO”***

Rita Elisita Gamarra Calcurian

*Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de
Doctora en Ciencia del Suelo*

Comité Consejero

Tutora Dra. Marcia Toro

Asesora Dra. Carmen Infante

Asesor Dr. Juan Carlos Aciego

AGRADECIMIENTO

A Dios

A mi hermano que está en compañía de Dios

A mi hijo, por ser motor de mi vida

A la UCLA por darme otra oportunidad en mi formación
intelectual

A la Dra. Marcia Toro, por su gran orientación y apoyo académico
científico

A la Dra. Carmen Infante por su valiosa orientación y soporte académico
en el área de petróleo

A la Dra. Liliana López, por su apreciada instrucción y tiempo ofrecido en
el laboratorio de geoquímica de petróleo.

DEDICATORIA

A mi hijo

A mis padres

TABLA DE CONTENIDO

	Página
CAPITULO I	1
1.Introducción.....	1
1.2 Objetivos.....	4
1.4 Hipótesis	5
CAPITULO II	6
2. Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	6
2.1 Consecuencias ambientales de los derrames de hidrocarburos de petróleo.....	8
2.1.1 Suelo	9
2.1.2 Flora y fauna	12
2.1.3 Ecosistema acuático	13
CAPITULO III	15
3 Biorremediación	15
3.1 Estrategias de biorremediación	16
3.2 Fitorremediación	17
3.2.1 Procesos involucrados en la fitorremediación	18

3.2.1.1 Fitoextracción o fitoacumulación	18
3.2.1.2 Fitoestabilización	19
3.2.1.3 Fitodegradación	19
3.2.1.4 Fitovolatilización	19
3.2.1.5 Fitoestimulación o rizodegradación	19
3.3 Interacciones microorganismos - planta fitorremediadora contaminantes de hidrocarburos	21
3.4 Las plantas como componentes del proceso de fitorremediación.....	24
3.5 Los biomarcadores y su utilidad en la biodegradación del petróleo...	28
3.6. Aceites y grasas como parámetros de remediación.....	29
CAPITULO IV	31
4. Los microorganismos en el proceso de remediación de suelos.....	31
4.1 Estrategias microbianas involucradas en la transformación de hidrocarburos	37
4.1.1. Mineralización	37
4.1.2 Oxidación	39
4.1.3 Actividades enzimáticas	38
4.1.4 Producción de biosurfactantes extracelulares	39
4.1.5 Diversidad de vías metabólicas	40
CAPITULO V	41
5. Los hongos Glomeromycota en la remediación de suelos	41
5.1 Definición	41
5.2 Anatomía	42
5.3 Clasificación taxonómica	45
5.4 Distribución de los hongos Glomeromycota en reino vegetal	49
5.5 Fisiología de los hongos Gloeromycota	49
5.6 Ecología de los hongos Glomeromycota	54
5.7 Interacción de los hongos Glomeromycota con los componentes	

bióticos del suelo	56
5.8 Interacción de los hongos Glomeromycota con los microorganismos de la rizósfera	58
5.9 Interacción de los hongos Glomeromycota con microorganismos patógenos	60
5.10 Factores abióticos involucrados en la eficiencia de la micorrización.....	62
5.10.1 Captación y transferencia de carbono en la simbiosis MA	62
5.10.2 Contenido de nitrógeno en el suelo	63
5.10.3 Contenido de fósforo del suelo	66
5.10.4 Contenido de Sales	67
5.10.5 Metales pesados	70
5.10.5.1 Efecto de los metales pesados sobre los hongos Glomeromycota.....	71
5.10.5.2 Efecto de los metales pesados sobre las plantas micorrizadas..	72
5.10.6 Efecto de los hidrocarburos de petróleo sobre los hongos Glomeromycota	75
CAPÍTULO VI	79
6. MARCO METODOLÓGICO	79
6.1 Fase I. Trabajo de campo	79
6.1.1 Muestreos en campo	81
6.1.1.1 Muestreos de vegetación	81
6.1.1.2 Muestreos de suelo	83
6.1.1.2.1 Muestreo de suelo rizosférico	83
6.1.1.2.2 Muestreo de suelos no rizosférico	83
6.1.1.3 Muestreo del lodo petrolizado	84
6.2 Fase II. Ensayos preliminares	84
6.2.1 Estudios de vegetación	86

6.2.2 Selección de plantas con potencial fitorremediador	86
6.2.3 Aislamiento e Identificación de morfotipos de Glomeromycota	88
6.2.4 Obtención del inóculo de hongos Glomeromycota nativos	90
6.2.5 Análisis químico del lodo petrolizado	92
6.2.6 Análisis químico del suelo no rizosférico	95
6.3 Fase III. Ejecución y análisis	95
6.3.1 Localización de la investigación	97
6.3.2 Material biológico utilizado	97
6.3.3 Diseño experimental	98
6.3.4 Análisis estadísticos	99
6.3.5 Tratamientos aplicados	100
6.3.6 Manejo agronómico	104
6.3.7 Variables medidas	104
6.3.7.1 Altura de planta	104
6.3.7.2 Peso seco de planta	105
6.3.7.3 Porcentaje de colonización micorrízica	105
6.3.8 Análisis de las poblaciones microbianas	106
6.3.8.1 Aislamiento y estimación de las poblaciones de aerobios heterótrofos	107
6.3.8.2 Aislamiento de microorganismos con potencialidad biorremediador de lodo petrolizado	110
6.3.8.2 .1 Método de recuento en placa partiendo de suelo contaminado artificialmente con lodo petrolizado al 4%	111
6.3.8.2.2 Método de enriquecimiento hasta el 4%	112
6.3.9 Estimación del proceso de biodegradación	114
6.3.9.1 Porcentaje de degradación del lodo petrolizado	114
6.3.9.2 Tasa de degradación	115
6.3.10. Supervivencia de plantas al impacto del lodo petrolizado	116

CAPITULO VII	117
7. RESULTADOS Y DISCUSIONES	117
7.1 Fase preliminar	117
7.1.1 Estudios de vegetación	117
7.1.2 Selección de plantas con potencial fitorremediador	122
7.1.3 Identificación de esporas de hongos Glomeromycota	126
7.1.4 Obtención del inóculo nativo	150
7.1.5 Análisis químico del lodo petrolizado	151
7.1.6 Análisis químico del suelo no rizosférico	155
7.2 Fase de ejecución y análisis	156
7.2.1 Parámetros morfométricos de la planta	156
7.2.1.1 Altura	156
7.2.1.2 Peso seco	164
7.2.3 Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas	169
7.2.4 Contaje general de aerobios heterótrofos	174
7.2.5 Identificación de microorganismos heterótrofos	181
7.2.6 Aislamiento e identificación de microorganismos con potencialidad degradadora de petrolero por el método de dilución y siembra en placa, partiendo del suelo contaminado artificialmente con lodo petrolizado al 4%.	185
7.2.7 Aislamiento e identificación de microorganismos con potencialidad degradadora de petrolero por el método de enriquecimiento hasta el 4%	192
7.2.8 Sobrevivencia de plantas al impacto del lodo petrolizado	194
7.2.9 Contenido de grasas y aceites totales	197
7.2.3.10 Porcentaje de biodegradación del lodo petrolizado	198

CONCLUSIONES	203
RECOMENDACIONES	206
INDICE DE FIGURAS	xiii
INDICE DE TABLAS	xvii
FIGURAS ANEXAS	xix
TABLAS ANEXAS	xx
RESUMEN	xxi
ABSTRAC	xxii
SÍNTESIS CURRICULAR	xxiii

INDICE DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura química de los hidrocarburos de petróleo	7
2. Mecanismos de fitorremediación	20
3 Diversidad de organismos que interactúan entre sí y con la raíz, conformando la comunidad de la rizosfera.....	22
4 Consorcio microbiano. a, b, c, d,e (microfotografías de microscopía electrónica de barrido de bacterias), f (microscopía óptica detalle de hifas fúngicas en azul de metileno)	34
5 Arbúsculo en raíz de parchita (<i>Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener</i>) en su estado juvenil (40x)	42
6 Vesícula en raíz de parchita (<i>Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener</i>) en su estado juvenil. (40x)	42
7 Diferentes morfotipos de MA, aislados de la Gran Sabana- Venezuela.....	44
8 Clasificación filogénica basada en la secuencia LSU	48
9 Formación del apesorio en una raíz de parchita en una raíz de parchita (<i>Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener</i>) en su estado juvenil	53
10 Representación esquemática de las relaciones micorrizosféricas en los hogos Glomeromycota	57
11 Modelo de transporte y metabolismo del N ₂ , en el sistema simbiótico micorrizico arbuscular	65
12 Mecanismo de inmovilización de metales pesados por raíces micorrizadas	73
13 Observación en microscopio de luz, de elementos intracelulares en	

hifas de <i>G. intraradices</i> , creciendo en un medio con antraceno (x 100).(a) Campo brillante, (b) En Fluorescencia usando un filtro estándar, (c) Tinción con Azul de sudan	78
14 Actividades realizadas durante el trabajo de campo	80
15 Ubicación de la fosa la Caracola	81
16 Actividades realizadas durante la fase preliminar	85
17 Esquema de trabajo para la selección de plantas con potencial fitorremediador	87
18 Esquema de trabajo para la elaboración del inóculo nativo	91
19 Análisis SARA de la fosa la Caracola	94
20 Actividades desarrolladas durante la fase de ejecución y análisis...	96
21 Organización del microcosmo	101
22 Actividades implicadas en la aplicación de tratamientos	103
23 Morfotipo N°1	127
24 Morfotipo N°2	128
25 Morfotipo N°3	129
26 Morfotipo N°4	130
27 Morfotipo N°5	131
28 Morfotipo N°6	131
29 Morfotipo N° 7	132
30 Morfotipo N°8	133
31 Morfotipo N° 9	134
32 Morfotipo N° 10	134
33 Morfotipo N° 11	135
34 Morfotipo N° 12	136
35 Morfotipo N° 13	137
36 Morfotipo N° 14	137
37 Morfotipo N° 15	138

38 Morfotipo N° 16	139
39 Morfotipo N°17	140
40 Morfotipo N°18	141
41 Morfotipo N°19	141
42 Morfotipo N°20	142
43 Morfotipo N°21	143
44 Morfotipo N°22	143
45 Morfotipo N°23	144
46 Morfotipo N°24	145
47 Morfotipo N°25	146
48 Morfotipo N°26	146
49 Morfotipo N°27	147
50 Esporocarpo	148
51 Fragmentograma de los n- alcanos e Isoprenoide de la fosa la Caracola	153
52 Fragmentograma de los hopanos de la fosa La Caracola	154
53 Fragmentograma de los esteranos de la fosa la Caracola	155
54 Altura promedio de plantas de <i>B. brizantha</i> sometidas a los diferentes tratamientos durante 12 semanas de experimentación....	157
55 Altura promedio de plantas de <i>A. macracantha</i> sometidas a los diferentes tratamientos durante 12 semanas de experimentación ...	159
56 Planta de <i>A. macracantha</i> con hojas. (b). Planta de <i>A. macracantha</i> en proceso de defoliación durante 3 meses de tratamientos	162
57 Poblacionesde bacterias aerobias asociadas a la rizósfera de <i>B. brizantha</i>	175
58 Poblaciones de hongos asociados a la rizósfera de <i>B. brizantha</i>	176
59 Poblacionesde bacterias aerobias rizosféricas asociadas a la	

rizósfera de <i>A. macracantha</i>	177
60 Poblaciones hongos asociados a la rizósfera de <i>A. macracantha</i>	178
61 Poblaciones bacterianas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de <i>B. brizantha</i>	186
62 Poblaciones fúngicas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de <i>B. brizantha</i>	186
63 Poblaciones bacterianas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de <i>A. macracantha</i>	187
64 Poblaciones fúngicas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de <i>A. macracantha</i>	188
65 Aspecto general de las colonias de hongos aisladas de la fosa la Caracola en agar lodo petrolero al 4%	191
66 Tinción Gram del género <i>Erwinia</i> en agar lodo petrolero al 4% (100X)	192

INDICE DE TABLAS

Tabla	Página
1 Algunas especies de plantas sugeridas como posibles fitorremediadoras de hidrocarburos	27
2 Descripción de los tratamientos	100
3 Especies vegetales identificadas en la Fosa la Caracola	118
4 Frecuencia de aparición de especies de plantas en la fosa La Caracola.....	120
5 Estimación de las fracciones de hidrocarburo de la fosa La Caracola...	152
6 Altura promedio de <i>Brachiaria brizantha</i> al final de los 3 meses del experimento	158
7 Altura promedio de <i>Acacia macrantha</i> al final de los 3 meses de tratamiento	160
8 Producción de materia seca (g), del vástago, raíz, y relación vástago/raíz de <i>Brachiaria brizantha</i> a los 3 meses de tratamiento	165
9 Producción de materia (g), del vástago, raíz, y relación vástago/raíz de <i>Acacia macrantha</i> a los 3 meses de tratamiento	168
10 Porcentaje de colonización y número de esporas en plantas de <i>Brachiaria brizantha</i> luego 3 meses de tratamiento.....	170
11 Porcentaje de colonización y número de esporas en plantas de <i>Acacia macrantha</i> luego de 3 meses de tratamiento	173
12 Características culturales de las bacterias aisladas en la fosa la Caracola	181
13 Características culturales de los hongos aislados en la fosa la Caracola	182

14	Número promedio de plantas y sobrevivencia de <i>B. brizantha</i> a los 3 meses de experimentación	194
15	Número promedio de plantas y sobrevivencia de <i>A.</i> <i>macracantha</i> a los 3 meses de experimentación	196
16	Porcentaje inicial y final de grasas y aceites en los diferentes Tratamiento de <i>B. brizantha</i> y <i>A. macracantha</i>	197
17	Tasa de biodegradación de HTP en los diferentes tratamientos con plantas de <i>Brachiaria brizantha</i> durante un período de 3 meses....	198
18	Tasa de biodegradación de HTP en los diferentes tratamientos con plantas de <i>Acacia macracantha</i> durante un período de 3 meses....	199

FIGURAS ANEXAS

Figura	Página
i Puntos de muestreo del lodo petrolizado en la fosa la Caracola.....	209
ii Curva de retención de humedad a capacidad de campo del suelo de la fosa la Caracola.....	209
iii. Vista general y distribución de los tratamientos dentro del invernadero.....	210
iv. Aspecto general del fermentador diseñado.....	210
v. Rebrote de <i>B. brizantha</i>	211

TABLAS ANEXAS

Tabla	Página
i Composición de fórmula nutritiva aplicada solución Nutritiva Chritine Hepper y O'Shea (1984)	
ii Análisis químico de suelo no rizosférico de la Fosa la Caracola	

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar la factibilidad de uso de la asociación plantas-hongos Glomeromycota para la restauración de un suelo contaminado con hidrocarburo de una fosa petrolera del estado Anzoátegui-Venezuela, se realizó la presente investigación, partiendo de un levantamiento de vegetación del área afectada y de la toma de muestras de suelo para su análisis químico, físico y biológico. Durante un año y medio se cumplió la primera fase de estudio, en el Instituto de Zoología Tropical UCV-Caracas, para la identificación de esporas micorrízicas, obtención del inóculo nativo, y caracterización del lodo petrolizado procedente de la fosa, además de la identificación de especies vegetales con potencialidad fitorremediadoras (Herbario del Jardín Botánico de Caracas). Una segunda fase, con duración de tres meses en invernadero, se desarrolló en la Facultad de Agronomía UCV-Maracay, donde se instaló un ensayo para comprobar la capacidad restauradora de suelos contaminados con lodo petrolizado al 4%, combinando *Brachiaria brizantha* cv. Marandu y *Acacia macracantha* var. *glabrens* Eggers (especies vegetales seleccionadas con potencial fitorremediador), en asociación inducida con los inóculos a base de *Acaulospora mellea* (inóculo de colección), y el inóculo nativo. A tal fin se trabajó con un diseño completamente aleatorizado de 12 tratamientos y 8 repeticiones. Un total de 27 morfotipos de esporas de hongos Glomeromycota fueron descritas, de los cuales el 86,21% se ubicó dentro del género *Glomus*, 10,34% en el género *Acaulospora*, y un 3,45% en *Acaulospora*. Se identificaron 8 especies vegetales: *Croton spp*, *Fimbristylis cymosa*, *Calotropis gigantea*, *Acacia macracantha*, *Andropogon angustatus*, *Pappophorum mucronulatum*, *Aristida torta* y *Cyperus sp.* con potencialidad fitorremediadora. En términos de degradación del contenido de hidrocarburos de las muestras, la combinación *Brachiaria brizantha* con el inóculo nativo marcó una reducción del 79,75%, la asociación de *Acacia macracantha* con *Acaulospora mellea* provocó una reducción en el contenido de grasas y aceites de 74,94%. El proceso de fitorremediación que pudo prevalecer en este estudio fue la rizodegradación. Se ratificó el papel decisivo que pueden asumir los hongos MA en la eliminación de derivados de petróleo contaminantes del suelo, razón por la cual han de considerarse entre los planes de fitorremediación en Venezuela.

Palabras clave: *Acaulospora mellea*, fitorremediación, rizodegradación, suelo, hidrocarburo, fosa petrolera

ABSTRAC

In order to assess the feasibility of using the plant-fungal Glomeromycota association for the restoration of soil contaminated with oil from an oil tank state of Anzoategui, Venezuela, this research was conducted, based on a survey of vegetation affected area and taking soil samples for chemical, physical and biological analysis. For a year and a half the first phase study was performed at the Institute of Zoology Tropical UCV-Caracas, for the identification of mycorrhizal spores, native seed collection and characterization of petrolized sludge from the pit, besides identifying plant species with phytoremediation potential (Herbarium of the Botanical Garden of Caracas). A second phase, lasting three months in the greenhouse, developed at the Faculty of Agronomy UCV-Maracay, where a trial was installed to check the restorative capacity of soils contaminated with mud petrolized 4%, combining *Brachiaria brizantha* cv. Marandu and *Acacia macracantha* var. glabrens Eggers (selected plant species with phytoremediation potential), in partnership induced inocula based *Acaulospora mellea* (inoculum collection), and the native inoculum. To this end we worked with a completely randomized design with 12 treatments and 8 repetitions. A total of 27 fungal spore morphotypes Glomeromycota were described, of which 86.21% was within the genus *Glomus*, 10.34% *Acaulospora* gender, and 3.45% in *Acaulospora* .It identified 8 species vegetables: *Croton spp*, *Fimbristylis cymosa*, *Calotropis gigantea*, *Acacia macracantha*, *Andropogon angustatus*, *Pappophorum mucronulatum*, *Aristida torta* and *Cyperus sp.* with fitorremediadora potential. In terms of degradation of the oil content of the samples, the combination *Brachiaria brizantha* with native inoculum marked a reduction of 74,94%, *Acacia macracantha* association with *Acaulospora mellea* caused a reduction in the content of fats and oils 74,94%. The process of phytoremediation could prevail in this study was the rizodegradación. The decisive role they can assume AMF in removing contaminants derived from oil from the ground, was ratified reason why they have to be considered among plans phytoremediation in Venezuela.

Keywords: *Acaulospora mellea*, phytoremediation, rizodegradation soil, hydrocarbon, oil tank

SINTESIS CURRICULAR

DATOS PERSONALES

Nombre y Apellido	Rita Elisita Gamarra Calcurian
Cédula de Identidad	7. 383.782
Nacionalidad	Venezolana
Fecha de nacimiento	31-08-1964
Edad	49
Lugar de nacimiento	Caracas
Estado civil	Soltera
Teléfono	Habitación.0251-2620703 cel. 0212- 5162857
Correo electrónico	rgmarra@ucla.edu.ve
Dirección	Urb. Araguañey Casan N° 70. Cabudare-Edo Lara

EDUCACIÓN

1994	Ingeniero Agrónomo	Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado- Decanato de Agronomía
1996	Manejo instrumental del idioma inglés	Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado- Decanato de Agronomía
1996	Nivel básico y avanzado del idioma inglés	Instituto Meyer. Barquisimeto- Estado Lara.
2004	Maestría en Microbiología. (Trabajo de Grado Mención Publicación)	Universidad del Zulia-Facultad de Ciencias
2012	Francés	UCLA. Decanato Experimental de Humanidades y Artes

EXPERIENCIA LABORAL

1994	Ayudante de laboratorio de Microbiología Agrícola. UCLA. Decanato de Agronomía
1995	Pasantía en el laboratorio de Microbiología Agrícola. UCLA. Decanato de Agronomía

1995	Personal docente y de Investigación en la Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado. UCLA. Decanato de Agronomía. (Cargo actualmente desempeñando).
------	---

CAPITULO I

1. INTRODUCCIÓN

La contaminación del ambiente con petróleo o sus derivados constituye uno de principales problemas que afectan al mundo por sus evidentes efectos deletéreos a la humanidad, su fauna y su flora. Particularmente en Venezuela, esta problemática se viene presentando desde mediados del siglo XX, cuando dieron inicio las primeras actividades exploratorias de perforación petrolera (Delón, 2001a).

Hoy por hoy, con una actividad intensiva de extracción y transporte de petróleo, se han incrementado las posibilidades de accidentes y contratiempos laborales, que acarrearán derrames, y liberación al ambiente de grandes cantidades de tóxicos.

Según reportes de diferentes agencias noticiosas venezolanas, 2012 fue un año excepcional, por cuanto ocurrieron 10 derrames de petróleo en diferentes áreas del país, que afectaron 1 millón de m²; de los cuales 647.704m² abarcaron terrenos de la faja petrolífera del Orinoco, 234.519 m² del oriente y 129.208 m² del occidente del país.

De acuerdo al ministerio del ambiente en el 2001, se estimaba en Venezuela un total de 17.000 “fosas petroleras”, de las cuales 12 mil no han recibido un tratamiento adecuado que pudieran evitar daños mayores al ambiente y a la salud de los habitantes circunvecinos; razón por la cual se han

convertido en pasivos ambientales para la industria petrolera y para la nación (Rojas 2006).

Una fosa no es más que una excavación de terreno, con una capacidad aproximada entre 100-100.000 m³, construida para recibir los productos de desecho del proceso de perforación, fluidos con lodos bentoníticos, hidrocarburos, agua, ripios y productos químicos (Madrid y Cataldi, 2002). No obstante, la creciente sensibilización a nivel mundial, respecto al impacto al medio ambiente y a la salud pública, ha motivado el desarrollo y la utilización de diferentes métodos y tecnologías con la finalidad de reducir estos efectos letales, por lo cual, desde el punto de vista sostenible, es imprescindible sugerir posibles mecanismos de limpieza como la biorremediación, que constituye una técnica biológica viable y atractiva para restaurar suelos contaminados con hidrocarburos.

La fitorremediación, es un tipo de biorremediación, basada en el empleo de una planta o combinación de plantas con microorganismos asociados a la rizósfera, para remover, degradar o inmovilizar contaminantes localizados en suelos, sedimentos, aguas superficiales (Pérez *et al.*, 2002). Un caso muy interesante de asociación o combinación de plantas con microorganismos del suelo son las micorrizas y entre ellas las del tipo arbuscular (MA), la cual constituyen asociaciones simbióticas mutualísticas establecidas entre las raíces de la mayoría de las plantas superiores y un grupo de hongos del Phylum Glomeromycota (Alarcón y Ferrera, 2000).

En Venezuela, Hernandez y Mager (2003) y Merkl *et al.*,(2004), han seleccionado varias especies de plantas con potencialidad fitorremediadora en suelos impactados con hidrocarburos, sin embargo el conocimiento y empleo de microorganismos autóctonos como los hongos micorrizicos para este fin, es prácticamente inexistente.

El empleo de MA con propósitos de fitorremediación, es una tarea novedosa, la cual no ha sido formal, ni rigurosamente investigada, razón por la cual el fundamento de esta tesis, es demostrar si es factible o no, la implementación y utilización de recursos biológicos autóctonos, como los hongos Glomeromycota en alianza con plantas fitoremediadoras, para sanear ambientes contaminados , de manera que esta experiencia pueda ser difundida, y adoptada a posteriori como práctica agronómica, capaz de competir con los métodos vigentes en nuestro país, en términos de economía, eficiencia, y riesgos ambientales.

En base a los argumentos antes señalados, resulta obligante investigar y evaluar esta técnica de fitorremediación en Venezuela, dada la condición de país productor- exportador y hoy en día hasta importador de petróleo, cuyos beneficios e impacto sobre el ambiente, podrían ser muy convenientes y oportunos.

1.2 OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la factibilidad de uso de la micorrización con hongos Glomeromycota en la biorestauración de suelos contaminados con hidrocarburo.

1.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la presencia de hongos Glomeromycota en el suelo contaminado con hidrocarburo de la fosa petrolera la Caracola en el estado Anzóategui, Venezuela.
2. Identificar morfológicamente los hongos Glomeromycota detectados en el suelo alterado por hidrocarburos de la zona bajo estudio.
3. Identificar las plantas con potencialidad fitorremediadora colectadas en el área del suelo de la fosa investigada.
4. Determinar la presencia de microorganismos con potencialidad biorremediadora en el suelo de la fosa la Caracola.
6. Evaluar bajo condiciones de invernadero la labor biorestauradora de la combinación hongos Glomeromycota- plantas seleccionadas.

1.4 HIPÓTESIS:

“Siendo la República Bolivariana de Venezuela un país producto-exportador de hidrocarburos con un inmenso pasivo ambiental, y eventuales derrames de petróleo, motivados a diversos accidentes y/o por la aplicación de prácticas inadecuadas, el establecimiento de la combinación de hongos Glomeromycota, con plantas fitorremediadoras y su microflora asociada, podría ser una opción para la restauración de sus suelos contaminados con hidrocarburos”.

CAPITULO II

2. HIDROCARBUROS TOTALES DE PETRÓLEO (HTP).

De acuerdo a Délon (2001), el término hidrocarburos totales de petróleo se usa para describir una gran familia de cientos de compuestos químicos (grupos de hidrocarburos) originados de petróleo crudo; existiendo tres grupos mayoritarios en los hidrocarburos del petróleo: alcanos (parafinas), alquenos (olefinas) e hidrocarburos aromáticos (Figura 1).

Explica Soto (2001), que las parafinas son uno de los principales constituyentes del crudo y se encuentran en los diferentes productos refinados del petróleo: gasolina, queroseno, aceites combustibles etc., caracterizándose porque su composición es de un 70%-80% de hidrocarburos parafínicos, saturados de cadena lineal o ramificada, pero nunca cíclica. Los hidrocarburos parafínicos con cuatro o menos átomos de carbono son gaseosos a la temperatura ordinaria, si poseen entre cinco y quince átomos de C, son líquidos y, cuando el número de átomos de carbono está por encima de dieciséis, son sólidos de aspecto céreo y constituyen el componente principal de las llamadas parafinas sólidas de petróleo.

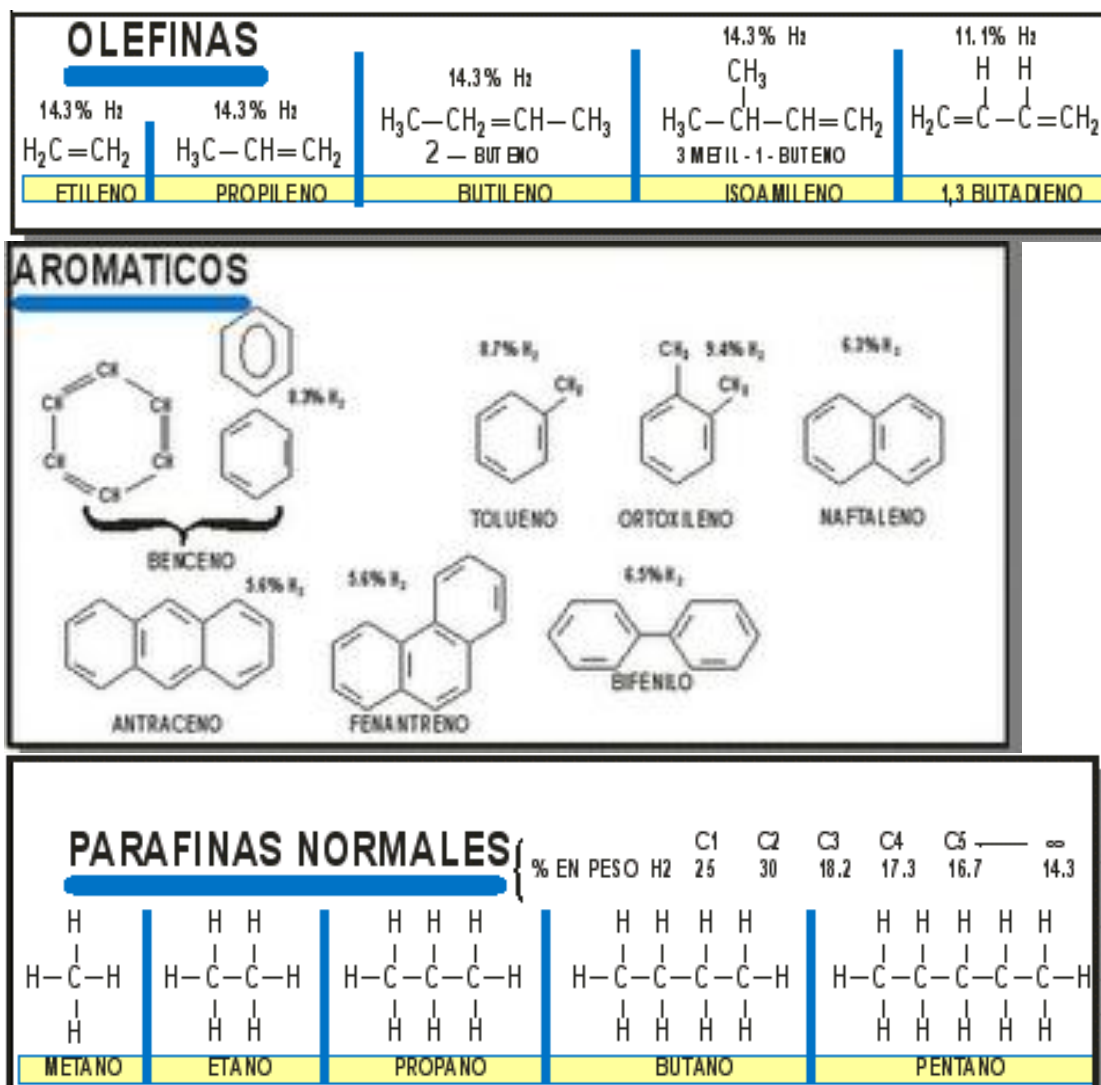


Figura 1. Estructura química de los hidrocarburos de petróleo

Fuente: (Delon, 2001).

Según Délon (2001), la serie parafínica se caracteriza por su gran estabilidad, encontrándose en ella compuestos como el metano, etano, hexano y hexadecano e incluyendo alcanos lineales, alcanos ramificados y naftenos. En este último caso, los átomos de carbono están dispuestos en uno o más

anillos. Las olefinas se forman durante el proceso de refinación del crudo, los cuales se caracterizan por tener dobles enlaces en su estructura.

Soto (2001), afirma que los hidrocarburos aromáticos pueden ser de un solo anillo: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX) o contener varios anillos aromáticos como en el caso de naftaleno, antraceno, pireno y otros por sus propiedades semivolátiles, tienen una gran movilidad y presentan una baja solubilidad en agua, siendo la mayor parte de ellos lipofílicos. Éste autor explica también, que los diferentes productos obtenidos por refinación y destilación del crudo: gasolina, diesel y asfaltos, son combinaciones de múltiples hidrocarburos individuales, cada uno de los cuales tiene diferente temperatura de ebullición. Por ejemplo, la gasolina es la combinación de muchos componentes de bajo rango de ebullición, incluyendo alcanos de C_4 a C_{12} , alquenos de C_4 a C_7 y aromáticos tipo BTEX. Los compuestos de rango intermedio de ebullición se utilizan en diferentes proporciones para conseguir productos como queroseno, diesel y aceites combustibles. Estos productos contienen preferentemente alcanos de C_{10} a C_{24} y policíclicos aromáticos con bajo o ningún contenido en olefinas.

2.1 Consecuencias ambientales de los derrames de hidrocarburos de petróleo

Como fue señalado en el punto anterior, la complejidad, las propiedades químicas, peso molecular e hidrofobicidad de los hidrocarburos de petróleo,

son condiciones clave, para que muchos de estos compuestos puedan permanecer en el ambiente durante largo tiempo y generar efectos negativos sobre suelo, fauna y flora, aguas, y por ende a la humanidad.

A continuación se presenta un resumen de los efectos o consecuencias de derrames de hidrocarburo sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos y su acción letal sobre la fauna.

2.1.1 Suelo

El suelo es un sistema abierto constituido por una mezcla de materiales sólidos, líquidos (agua) y gaseosos (aire), donde una adecuada relación entre estos componentes determina tanto la capacidad de crecimiento, como la disponibilidad de suficientes nutrimentos para las plantas (Pérez *et al.*, 2002).

Las propiedades físicas de los suelos, tales como textura, estructura, estabilidad, porosidad, densidad aparente, infiltración, y conductividad eléctrica, pueden verse afectadas por la presencia de hidrocarburos, ya que inician una serie de procesos físico-químicos que dependiendo del tipo de contaminante, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida pueden ocasionar una mayor o menor toxicidad (Siva *et al.*, 2004). Adicionalmente, por ser estos contaminantes de naturaleza hidrófoba, crean una película que cubre la superficie de las partículas del suelo, y las aglutinan generando estructuras más gruesas que taponan el espacio poroso,

reduciendo así la capacidad de retención de agua e intercambio gaseoso con la atmósfera (Pérez *et al.*, 2002).

En relación a la toxicidad de un hidrocarburo, esta se define como resultado de una interacción compleja y variable entre las características propias del crudo y del suelo (Tarache, 2011). Generalmente, los crudos más ligeros y más volátiles son altamente fluidos, penetran en los substratos porosos pero no tienden a adherirse a las superficies duras y resultan altamente tóxicos, por otro lado, los crudos más pesados y menos volátiles poseen una gama de velocidades de evaporación, son inflamables, no penetran con facilidad y tienen una toxicidad relativa.

En general, suelos y desechos con hidrocarburos livianos presentan mayor toxicidad en comparación con crudos pesados y extrapesados o meteorizados (Dorn y Salanitro, 2000). En este sentido, en Venezuela, Infante y Morales (2012), al evaluar la toxicidad de ripios de perforación con crudo extrapesado (10°API) y suelos contaminados a nivel de laboratorio, con un crudo mediano (27°API) y uno liviano (32°API), no encontraron toxicidad en las muestras impregnadas con crudo extrapesado, mientras que las muestras con crudo liviano y mediano si presentaron toxicidad. De acuerdo a Infante *et al.*, (2010), aunque la toxicidad de los crudos pesados y extrapesados o meteorizados, puede ser menor, tiene un efecto físico sobre las propiedades físicas del suelo.

Por otro lado, las propiedades biológicas de los suelos están determinadas principalmente por los microorganismos y su actividad. Ante la presencia de hidrocarburos, los microorganismos tienden a reducir el número y diversidad de algunas especies, por la acción destructiva de los niveles salinos del crudo sobre los componentes protéicos microbianos (López *et al.*, 2006; Severeyn, *et al.*, 2003), y por la ausencia de nutrimentos como el nitrógeno, fósforo, y hierro, necesarios para el crecimiento de los microorganismos (Madigan *et al.*, 2004). Sin embargo diversos estudios han revelado que ciertas especies de microorganismos pueden sobrevivir en suelos contaminados con petróleo, y son capaces de utilizar los hidrocarburos como fuente de carbono y energía, provocando en ese ambiente una biodegradación natural (Pucci *et al.*, 2010).

En relación a la conductividad eléctrica, capacidad de intercambio, catiónico y pH del suelo, Martínez y López (2001), indican, que no existe una tendencia definida en cuanto al comportamiento de estos parámetros en el suelo, ya que se pueden observar valores aumentados o disminuidos de manera irregular con las diferentes concentraciones de hidrocarburos.

Ya sea por actividad de extracción de petróleo y de gas, o por explotaciones petrolíferas, un suelo se altera químicamente ante la presencia de hidrocarburos totales, hidrocarburos aromáticos monocíclicos (Ej. Benceno, Tolueno, Etilbenceno y Xileno) antraceno, fenol, fenantreno, ácidos (Ej.

Sulfúrico), álcalis, metales (Ej. Plomo, Zinc, Cobre, Níquel, Cromo, Cadmio, Bario, Arsénico, Mercurio), Cianuros y Compuestos de azufreorgánico (Gallego *et al.*, 2001).

2.1.2 Fauna y Flora

De acuerdo a López *et al.*, (2006), la toxicidad del petróleo aumenta con la concentración, lo cual puede entorpecer las funciones ecológicas normales de los seres vivos, al causar mortalidad inmediata sobre la flora o la fauna, por sofocación, suciedad (cobertura) y asfixia, o envenenamiento por contacto directo con petróleo (especialmente petróleo fresco), siendo las formas vivientes larvales o juveniles, las más sensibles. De igual manera, la mortalidad aumenta indirectamente debido a la extinción de recursos alimenticios o a la destrucción o eliminación del hábitat, y se incorporación sustancias potencialmente cancerígenas o mutagénicas en la cadena alimenticia.

La contaminación por hidrocarburos también perjudica la germinación y crecimiento de ciertas especies vegetales, por recubrimiento de las raíces de las plantas bloqueando la absorción de agua y nutrimentos. Si el hidrocarburo logra pasar al interior de los tejidos vegetales, sus moléculas pueden dañar las membranas celulares causando un derrame de los contenidos celulares hacia los espacios intercelulares, reduciendo así la movilidad de metabolitos y la

tasa de respiración. En los casos de toxicidad aguda, se inhibe la germinación, el rebrote de meristemas, la elongación radicular y disminuye el contenido de clorofila afectando la fotosíntesis, (Xu y Johnson, 1995).

2.1.3 Ecosistema acuático

El derrame producido en ríos, a diferencia de tierra firme, se desplaza rápidamente aguas abajo afectando orillas debido a que la película superficial del hidrocarburo es “apoyada” por aguas más lentas (producidas en contracorriente) en los bordes del canal del río. Esta película se deposita sobre el suelo, ramas, hojas y raíces de las plantas ribereñas produciendo daños inmediatos y mediatos.

En el mar, éstas partículas, al emerger por diferencia de densidad, dificultan el intercambio gaseoso e impiden la penetración de la luz imposibilitando la fotosíntesis de algas marinas (Fátima *et al.*, 2003).

Particularmente en la Cuenca del Guarapiche – Río San Juan, localizada en el estado Monagas al Noreste de Venezuela, los derrames han producido cambios importantes en el equilibrio químico del agua. En estas áreas los morichales poseen muy poca capacidad amortiguadora y son frágiles ante cualquier tipo de alteración de su equilibrio. Por estas razones la fauna y flora acuática y en particular su ictiofauna seguramente resultarían afectadas y posiblemente eliminadas en todas las áreas bajo el efecto del derrame. Los

peces y otros organismos acuáticos con respiración branquial o cutánea serán afectados porque los residuos de hidrocarburos, además de formar una película de aceite sobre estas estructuras, también tienen un efecto irritante formando como respuestas edemas que impiden el intercambio gaseoso a ese nivel (Machado, 2012).

Por otro lado, en caso de dosis subletales, es posible una bioacumulación de hidrocarburos en toda la microfauna y microflora que en corto o mediano plazo afectarían componentes de la trama trófica (alimento) de los peces, crustáceos y otros animales acuáticos (Balseiro *et al.*, 2005).

CAPITULO III

3. BIORREMEDIACIÓN

La biorremediación como técnica de descontaminación de suelos y aguas, nace a raíz del derrame de petróleo del buque denominado Exxon Valdez, en las costas de Prince William Alaska, 1990. Debido al desastre ecológico dejado por la gran cantidad de crudo vertido, los científicos de la época preocupados por el problema, buscaron formas alternativas de luchar con esta situación (Fontúrbel e Ibañez, 2004). Esta técnica se basa en un proceso netamente biológico, mediante el cual organismos como, microorganismos, plantas o ambos inclusive, convierten los componentes orgánicos degradables de un crudo a elementos más simples como el CO₂, H₂O, biomasa microbiana, de manera tal, que con esta transformación, ayudan a descontaminar el suelo impactado (Infante, 2007).

Las tecnologías de remediación implican cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas (biorremediación), de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001).

3. 1 Estrategias de biorremediación

Las primeras experiencias en biorremediación, se basaron en la premisa de que todo microorganismo de cualquier ecosistema natural, tiene la capacidad de metabolizar compuestos tóxicos (Fontúrbel e Ibañez, 2004), razón por la cual, a partir de ello, comenzaron a surgir una gran variedad de técnicas para remediar suelos. Son dos las estrategias que se emplean para conducir un proceso de biorremediación: la bioestimulación y la bioaumentación. Se habla de bioestimulación cuando la degradación es llevada a cabo por microorganismos autóctonos, en este caso, la intervención humana va encaminada a favorecer el crecimiento y la actividad metabólica de dichos organismos, mediante la adición de determinados nutrientes que escasean en el medio, fundamentalmente nitrógeno y fósforo e incrementar la cantidad de oxígeno disuelta por mecanización.

La bioaumentación consiste en la adición de microorganismos alóctonos, autóctonos o exógenos, cuya eficiencia en la degradación del contaminante esté probada; estos microorganismos pueden ser naturales o modificados genéticamente, aunque estos últimos no han sido autorizados a nivel mundial (Infante, 2007).

De acuerdo a su aplicación el proceso de biodegradación puede ser: “in situ” y “ex situ”, “in situ” corresponde a tratamientos que no requieren

excavación del suelo contaminado ya que el tratamiento se realiza es en el mismo sitio donde esta el contaminante; “ex situ” es un método donde se excava el suelo o el material a tratar, y se transporta a otro espacio para un manejo especializado controlado (Bongkeun *et al.*, 2000). En términos comparativos, las técnicas de biorremediación “in situ” ofrecen mayor ventaja sobre las “ex situ”, debido a su menor costo y menor cantidad de residuos dejados en superficie (Daane *et al.*, 2001).

Según Infante (2007), existen otras modalidades de biodegradación: el uso de reactores, tratamientos por landfarming, composting, biopilas, y la fitorremediación, modalidad esta, centro esencial de esta investigación

3.2 Fitorremediación

La fitorremediación es una técnica emergente, que involucra el empleo de plantas y su microbiota asociada, la aplicación de enmiendas, materia orgánica y/o fertilizantes, que en conjunto, remueven, toman o inmovilizan los contaminantes del ecosistema (Hou *et al.* 2001). Como práctica agronómica, puede resultar económica, especialmente en áreas donde la contaminación no es muy severa (García *et al.*, 2000).

Entre las ventajas que implica su uso se señalan (Merkl *et al.*, 2005; Infante, 2007):

- ✓ Comparativamente económica

- ✓ El suelo contaminado no requiere ser excavado, reduciendo así los costos de aplicación
- ✓ El suelo puede ser reutilizado después del tratamiento
- ✓ De gran aceptación ambientalista y público en general
- ✓ De uso en la recuperación de suelos y aguas subterráneas en un mismo ecosistema.
- ✓ Aplicable a gasolina, explosivos, solventes, metales pesados

De acuerdo a Cunningham *et al.*, (1997), esta técnica puede presentar ciertos obstáculos al momento de su aplicación, tales como la ubicación del contaminante más allá de la profundidad radical de la planta empleada, y/o cuando ejerce efectos fitotxicológicos a la planta. Otro aspecto limitante a considerar, es lo relativo a la imprecisión del tiempo que dura el proceso, por lo tanto, y en función de superar esas limitaciones, se hace necesario estudiar y comprender los procesos y las fases involucradas, e interacciones con los microorganismos.

3.2.1 Procesos involucrados en la fitorremediación.

3.2.1.1 Fitoextracción o fitoacumulación: consiste en la absorción de contaminantes por las raíces; implica la capacidad de algunas plantas para acumular contaminantes en sus raíces, tallos o follaje. Este mecanismo ha sido ampliamente estudiado en plantas que acumulan metales (Banks *et al.*, 2000), y con materiales radioactivos (Dushenkov, 2003). Cuando la planta

extrae el metal por varios períodos de un sitio en particular, la misma es cosechada con la finalidad de disponerla en un sitio para su incineración o entierro (Infante, 2007).

3.2.1.2 Fitoestabilización: es un mecanismo que utiliza la planta para desarrollar un sistema denso de raíces, el cual le permite reducir la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes, evitando así el transporte a capas subterráneas o a la atmósfera (Joner y Leyval, 2003).

3.2.1.3 Fitodegradación: consiste en la transformación de los contaminantes orgánicos en moléculas más simples. En determinadas ocasiones, los productos de la degradación le sirven a la planta para acelerar su crecimiento, en otros casos los contaminantes son transformados (Pilon, 2005).

3.2.1.4 Fitovolatilización se produce a medida que las plantas en crecimiento absorben agua junto con los contaminantes orgánicos solubles. Algunos de los contaminantes pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatilizarse a la atmósfera (López *et al.*, 2005).

3.2.1.5 Fitoestimulación o rizodegradación. Como parte principal de la fitorremediación, el sistema radical de las plantas tiene un papel preponderante en la capacidad de adaptación, supervivencia, absorción de nutrientes y agua en suelos contaminados. De manera particular, la rizósfera tiene especial importancia en la degradación de compuestos

orgánicos de origen natural y xenobióticos. El sistema radical además de liberar enzimas que inician la oxidación de los contaminantes orgánicos, también contribuye significativamente a la estimulación de la actividad de grupos microbianos responsables de la oxidación, degradación y completa mineralización de los contaminantes en el suelo (Joner y Leyval, 2003). A todo este efecto del sistema radical en la degradación de compuestos orgánicos vía estimulación de la actividad microbiana en la rizósfera, se le ha denominado rizodegradación (Siciliano *et al.*, 2001). En la figura 2, se ilustran los mecanismos involucrados en la fitorremediación explicados anteriormente.

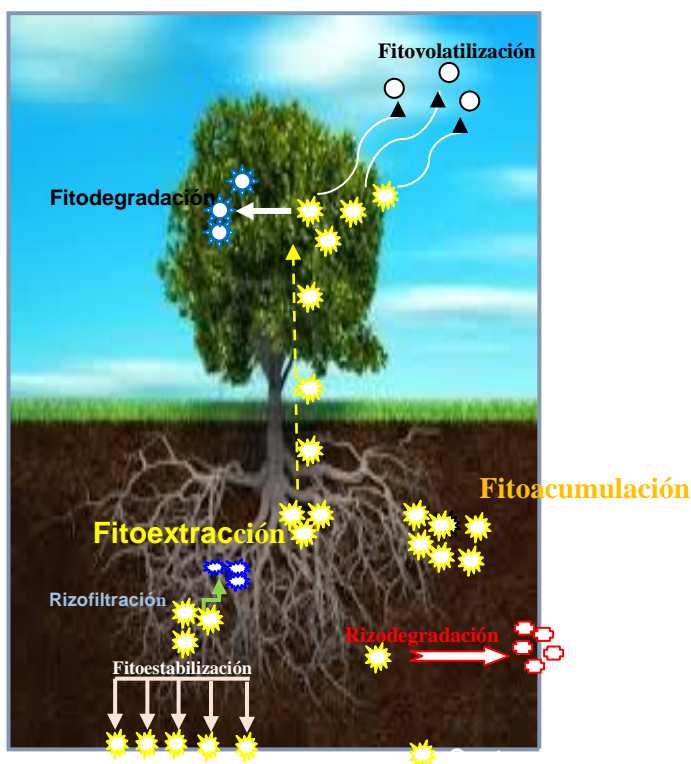


Figura 2. Mecanismos de fitorremediación. Fuente: Elaboración propia.

Además de estudiar y comprender los mecanismos de fitorremediación, para aplicar esta técnica, es importante considerar las interacciones de los diferentes componentes del suelo con el contaminante y los microorganismos aplicados para la acción remediadora (Telysheva *et al.*, 2002).

3.3 Interacciones microorganismos - planta fitorremediadora - contaminantes de hidrocarburos.

El interés por el uso de microorganismos que aportan beneficios a las plantas cultivadas y al suelo donde estas coexisten, cobra mayor auge en términos del contexto de sostenibilidad de los agroecosistemas, es por ello, que resulta importante profundizar en el conocimiento de las interacciones plantas - microorganismos que cohabitan en torno a sus raíces para desarrollar nuevos esquemas en materia de fertilidad suelos y producción de los cultivos (Johansson *et al.*, 2004).

En los ecosistemas no intervenidos por el hombre, generalmente las poblaciones de microorganismos en el volumen radical de la planta, se encuentran en una condición de equilibrio estable, en una zona denominada rizósfera (Figura 3), la cual no es una región bien definida y homogénea, sino que existe un gradiente de estimulación de microorganismos, desde la propia superficie de la raíz, hasta 1-2mm donde ya la interacción es mínima (Strong y Phillips, 2001).

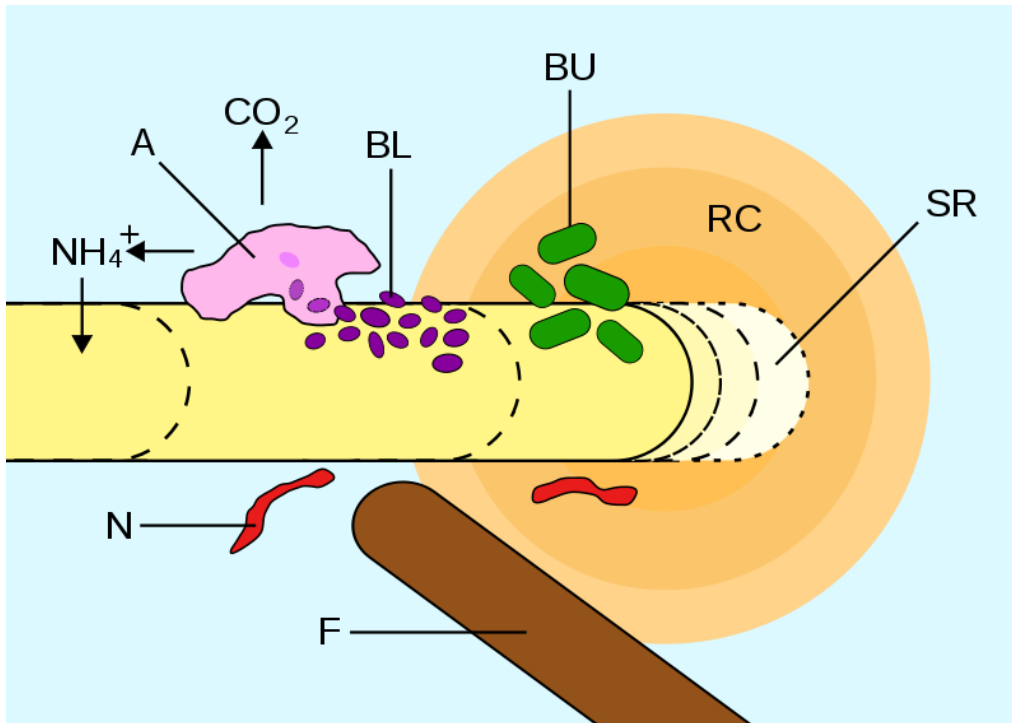


Figura 3. Diversidad de organismos que interactúan entre sí y con la raíz, conformando la comunidad de la rizósfera. A= ameba que ingiere bacterias, BL=Bacterias limitadas por energía, BU=Bacterias no limitadas por energía, RC=Carbohidratos derivados de la raíz SR=Células descamadas de pelos radiculares, F=Hifas de hongos, N=Nematodo.

Fuente: Strong y Phillips (2001).

En la rizósfera existe una alta densidad poblacional de microorganismos, y el máximo valor se encuentra en el rizoplano (superficie de la raíz) en consorcios llamados microcolonias o biofilms, y desciende al alejarse de la superficie radical (Johansson *et al.*, 2004), ya que las propiedades físicas, químicas y biológicas en la rizósfera son distintas del suelo no rizosférico.

Debido a que la eficiencia de la fitorremediación de suelos, frecuentemente está vinculada con la actividad de los microorganismos en la rizósfera (Muratova *et al.* 2003), al romperse este equilibrio en la zona rizosférica, por la incorporación de agentes contaminantes al suelo, se puede desencadenar una serie de interacciones microorganismo-planta, que en consecuencia favorecen o desfavorecen el proceso de fitorremediación. En este sentido Pérez *et al.*, (2002), señalan que a niveles tóxicos del contaminante, se crean efectos adversos, sin embargo a bajas concentraciones, los hidrocarburos pueden estimular el crecimiento de ciertas especies vegetales, debido a que el sistema rizosférico proporciona condiciones nutricionales y de aeración favorables para el aumento de las poblaciones y la diversidad de la flora microbiana.

Muratova *et al.*, (2003), señalaron que ante la presencia de hidrocarburos en la rizósfera, el número de microorganismos degradadores del mismo se ve incrementado, este hecho es conocido como “Efecto rizosférico” y constituye la esencia de la fitorremediación.

Por otro lado, un exceso de hidrocarburos en el suelo puede afectar a los microorganismos ya que se produce una baja tasa de difusión de oxígeno en el agua, lo que puede implicar que la población de microorganismos heterótrofos aerobios pueden acabar con el oxígeno y generar en

consecuencia un micro hábitat anóxico, perjudicial para la mayoría de los microorganismos (Martin *et al.*, 2004).

3.4 Las plantas como componentes del proceso de fitorremediación

Son numerosas las especies de plantas que han sido estudiadas con la finalidad de uso como fitorremediadora de metales pesados e hidrocarburos del petróleo. Muchas de ellas tienen la capacidad de metabolizar o inmovilizar hidrocarburos del petróleo por medio de numerosos procesos (Pérez *et al.*, 2002), a la vez que estimulan las poblaciones de microorganismos en el sistema rizosférico.

Diversos estudios han comprobado la capacidad de un número considerable de especies vegetales para remediar suelos levemente contaminados. Por ejemplo, Liste y Alexander (2000), estudiaron el poder fitorremediador de nueve especies diferentes con un suelo contaminado con 78.4 ppm. de pireno, obteniendo una remoción del 74% en ocho semanas. Otros autores han realizado estudios con concentraciones más altas en hidrocarburos; es el caso de Huang *et al.*, (2005), los cuales alcanzaron una remoción del 50% con *Festuca arundinacea* en un suelo contaminado con 50.000 ppm. de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

Muchas plantas se caracterizan por tener la capacidad de crecer y desarrollarse en suelos contaminados con compuestos xenobióticos, ejemplos

ellas, son: *Amaranthus tricolor* Linn., *Brassica Parachinensis* Bailey, *Raphnus sativus* L., *Ipomoea aquatica* Forsk, *Glycine max* Merr., *Phaseolus vulgaris* L., *Brassica chinensis* L., *Brassica oleracea* L., *Spinacea oleracea* L., *Solanum melongena* L. y *Lolium multiflorum* Lam, las cuales han sido capaces de remediar hasta un 0,01% de fenantreno y 0,24% de Pireno del suelo contaminado (Gao y Zhu, 2004).

Una especie vegetal que se ha sido probada con propósitos de fitorremediación, es *Cucurbita pepo* L., la cual según Mattina y Dykas (2000), tiene la facultad particular de remover, y acumular un amplio rango de contaminantes persistentes, de origen orgánico, incluyendo clorados como el diclorodifenil tricloroetano (DDT) en sus raíces y parte aérea (White *et al*, 2003), ciertos policlorinados bifeniles (PCBs), y algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). No obstante el contenido del contaminante acumulado es muy variable, y la capacidad fitorremediadora dependen del cultivar (White *et al*, 2000).

Otra especie propuesta por Escalante *et al.*, (2005), como planta modelo de fitorremediación para condiciones de suelos inundados del trópico, es *Cyperus laxus*, en base a que lograron una remoción del 90% después de seis meses, con respecto a un suelo modelo contaminado artificialmente con 5000 ppm. de (HTP).

Por otro lado Siciliano *et al.*, (2003), señalaron a *Festuca arundinacea* (Cañuela), como muy buena candidata degradadora de hidrocarburos de petróleo, tanto en ambientes muy inundados, como secos, ya que ha manifestado una tasa máxima de degradación hasta de 38 mg. de hidrocarburos/kg.mes; siendo este resultado, el doble de lo que se encontró con en el testigo o suelo sin planta, bajo tales condiciones.

Particularmente en Venezuela, se han llevado a cabo algunos experimentos con objetivo de evaluar plantas con fines de fitorremediación. En este sentido Merkl *et al.*, (2004), preseleccionaron cincuenta y siete especies nativas de sitios contaminados con petróleo, entre las cuales se identificaron 18 Fabáceas, 19 gramíneas, 17 herbáceas, lo cual según ellos, representan una importante base para el estudio sobre fitorremediación el trópico.

Más reciente, Brandt *et al.*, (2006), evaluaron la potencialidad de la planta de vetiver (*Vetiveria zizanioides* L.), como planta tolerante a la presencia de crudo pesado. Basados en la comparación del crecimiento de las plantas y los parámetros del suelo con los diferentes tratamientos, revelaron que la misma es capaz de reproducirse ante la presencia del contaminante, y reducir los niveles del mismo en el suelo, razón por la cual sugieren la posibilidad del cultivo del vetiver en áreas contaminadas con hidrocarburos.

Seguidamente se muestra la tabla 1 que recopila especies de plantas con capacidad fitorremediadora, probadas en diferentes ambientes contaminados con hidrocarburos.

Tabla 1. Algunas especies de plantas sugeridas como posibles fitorremediadoras de hidrocarburos

Planta	Tipo de contaminante	Eficiencia	Localidad	Investigadores
<i>Salix babylonica</i>	Mezcla de gasolina y etanol	Supervivencia de planta a niveles de 2000 mg l ⁻¹	Brasil	Moreno y Corseuli (1999)
<i>Amaranthus tricolor</i> Linn. <i>Brassica Parachinensis</i> Bailey radish <i>Raphnus sativus</i> L. <i>Ipomoea aquatica</i> Forsk <i>Glycine max</i> Merr <i>Phaseolus vulgaris</i> L. <i>Brassica chinensis</i> L. <i>Brassica oleracea</i> L. <i>Spinacea oleracea</i> L <i>Capsicum annum</i> L. <i>Solanium melongena</i> L. <i>Lolium multiflorum</i> Lam	Mezcla de pireno y fenantreno	< 0.01% pireno a < 0.24% fenantreno	China	Gao y Zhu. (2004)
<i>Festuca arundinacea</i>	Hidrocarburos totales	50%	China	Huang <i>et. al.</i> , 2005
<i>Panicum maximum</i> y <i>Brachiaria brizantha</i>	Hidrocarburo de petróleo liviano	55-63% < aceites y grasas	Venezuela	Hernández y Mager (2003)
<i>Calopogonium mucunoides</i> <i>Centrosema. brasilianum</i> <i>Desmodium glabrum</i> <i>Stylosanthes. capitata</i> <i>Muscari. macrocarpum</i> <i>Mimisa. Orthocarpa</i> <i>Atriplex canescens var canescens</i> <i>Anthurium pittieri var. fogdenii</i> <i>Brachiaria brizantha cv. Marandú</i> <i>Cyperus. aggregatus</i> <i>Panicum maximun</i> <i>Papophorum pappiferum</i>	Crudo de petróleo	ND	Venezuela	Merkl <i>et al.</i> , (2004)

<i>Cyperus laxus</i>	Hidrocarburos totales de petróleo (HTP)	0.51mg HTP g ⁻¹ planta	México	Escalante <i>et al.</i> , 2005
----------------------	---	--------------------------------------	--------	-----------------------------------

ND: no determinado.

Fuente: Recopilación propia

3.5 Biomarcadores y su utilidad en la biodegradación del petróleo.

Los biomarcadores o marcadores biológicos son moléculas fósiles complejas derivadas de lípidos de organismos, que pueden ligarse de forma inequívoca con sus precursores biológicos, y cuyo esqueleto carbonado se preserva de tal forma que es reconocible a pesar de la diagénesis (formación de una roca sedimentaria a partir de sedimentos), y de gran parte de la catagénesis (generación de petróleo a partir de materia orgánica insoluble (Peters *et al.*, 2005).

Su importancia radica en que pueden proporcionar información acerca de las fuentes biológicas de materia orgánica sedimentaria, medios deposicionales, madurez de la misma, edad geológica, y lo más importante es que se ha demostrado su gran utilidad en la evaluación de la efectividad de la remediación de vertidos de petróleo (Infante *et al.*, 2012).

El principal método para evaluar los biomarcadores es por cromatografía y espectrometría de masas, su identificación y distribución es obtenida de cromatogramas de masas o fragmentogramas de masas en una relación específica de masas de iones / carga específica.

Indicadores de biodegradación, tales como variaciones en la composición SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), n-alcanos, isoprenoides, terpano, y la distribución esterano, y las variaciones en la intensidad de las señales obtenidas por GCMS (n-alcanos, isoprenoides, esteranos y terpanos), pueden establecer el orden de alteración en el hidrocarburo saturado. Éstos últimos se utilizan para calcular los coeficientes, como pristano/n-C17, Fitano/n-C18, C23-3/C30-hopano, con la finalidad de verificar el progreso de la biorremediación (Córdova *et al*, 2011).

3.6. Aceites y grasas como parámetros de remediación.

De acuerdo a Fardón (2008), el término "grasa", hace referencia a compuestos orgánicos constituidos principalmente por ácidos grasos de origen animal y vegetal, así como los hidrocarburos del petróleo. Algunas de sus características más representativas son baja densidad, poca solubilidad en agua, baja o nula biodegradabilidad. El término "aceite" representa una amplia variedad de hidrocarburos de bajo a elevado peso molecular, de origen mineral, que abarca desde gasolina hasta combustibles y aceites lubricantes. Además, incluye todos los glicéridos de origen animal y vegetal que son líquidos a la temperatura ordinaria.

Con la determinación de grasas y aceites no se mide la cantidad absoluta de una sustancia específica, sino de un grupo de sustancias con

características físicas similares, sobre la base de su solubilidad común. Por otro lado, cuando se habla de grasas y aceites, se incluyen los hidrocarburos tal como reglamenta el Decreto 2635 en el Art. 51 y la Regla 29B de Louisiana, USA.

CAPITULO IV

4. LOS MICROORGANISMOS EN EL PROCESO DE REMEDIACION DE SUELOS

La presencia de una población microbiana degradadora potencialmente activa es de vital importancia para la transformación de una mezcla de hidrocarburos presente en un suelo contaminado, aunque este proceso dependa también de otros factores como son: la estructura molecular del contaminante, su concentración, biodegradabilidad, el pH, temperatura y humedad del suelo, presencia de aceptores de electrones libres y, la existencia de nutrientes inorgánicos aprovechables (fuente de N y P).

Los microorganismos constituyen uno de los componentes más importantes del suelo. Forman la parte viva, responsable de la dinámica de transformación y generación de nutrimentos, cumplen funciones determinantes en la conversión de los componentes orgánicos e inorgánicos hasta elementos que pueden ser asimilados por las raíces (Madigan y Martinko, 2006), y convierten sustancias de carácter tóxico a inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Suárez y Reyes, 2002).

De acuerdo a Madigan *et al.*, 2006, las actividades más importantes que cumplen son:

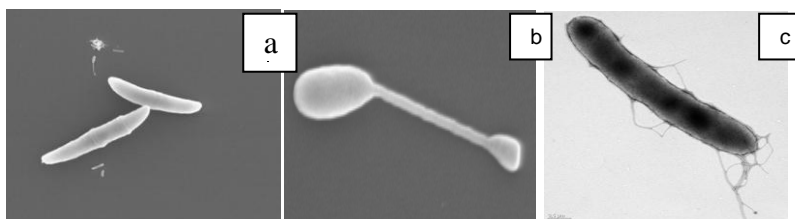
- Suministro directo de nutrientes
- Transformación de compuestos orgánicos que la planta no puede tomar a formas inorgánicas, que si pueden ser asimiladas
- Solubilización de compuestos inorgánicos para facilitar la absorción por las plantas, tal como la conversión de fosfato tricálcico a fosfato monocálcico.
- Cambios químicos en compuestos inorgánicos debido a procesos de oxidación y reducción, como lo es la oxidación del azufre mineral a sulfato y la oxidación del nitrógeno amoniacal a nitrato.
- Aumento del desarrollo radicular en la planta que mejora la asimilación de nutrientes, la capacidad de campo y el desarrollo.
- Reacciones antagónicas, parasitismo y control de fitopatógenos.
- Mejoramiento de las propiedades físicas del suelo.
- Detoxificación de los suelos

La gran diversidad microbiana presente en ambientes contaminados con xenobióticos, ha sido verificada por aproximaciones basadas en el análisis

del RNA ribosómico, mediante la construcción de librerías genéticas, hibridación in situ o en electroforesis con geles de gradiente desnaturizante a partir de rDNA amplificado mediante PCR. Estos análisis han revelado una enorme complejidad microbiológica en los ambientes naturales (Goddard *et al.*, 2010), permitiendo detectar numerosas bacterias no cultivables, algunas de las cuales constituyen poblaciones dominantes que pueden proporcionar información sobre la función de las poblaciones microbianas, y proveer medidas para y reforzar las prácticas de biorremediación basadas en la microbiota autóctona (White *et al.*, 2003).

Toda esta evidencia, pone en manifiesto que el suelo a través de su microbiota, ofrece un recurso infinito de para el saneamiento del mismo.

Diferentes microorganismos (Figura 4), degradan muchos tipos de compuestos y sobreviven en diferentes condiciones impactadas por crudo. Aunque uno de los grupos más importantes empleados en el proceso de biorremediación son las bacterias, también se han utilizado otros microorganismos como hongos, algas, cianobacterias y actinomicetes (Atlas, 2002).



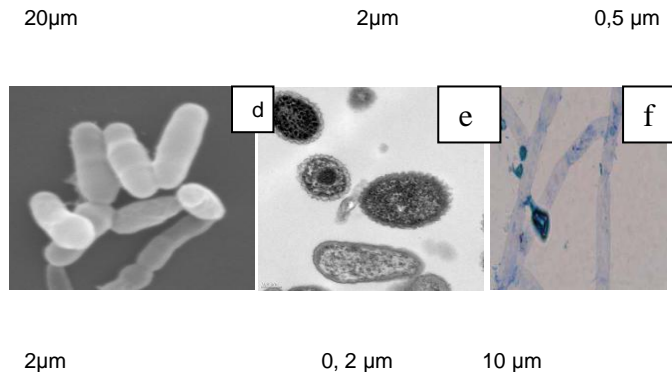


Figura 4. Consorcio microbiano. a, b, c, d,e,f (Microfotografías de bacterias en microscopía electrónica de barrido), f (Microscopía óptica detalle de hifas fúngicas en azul de metileno)

Fuente: Viñas, 2005.

Un género bacteriano muy estudiado es el *Pseudomonas*, en el cual se han identificado (en varias de sus especies), plásmidos que codifican enzimas capaces de degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados (Pérez *et al.*, 2002).

Alcalígenes, *Micobacterium* y *Bacteroides*, también han sido reportados como degradadores de hidrocarburos de petróleo, y propuestos como miembros para el tratamiento de terrenos contaminados con HTP. Sin embargo su poca abundancia en estos ambientes, constituye una desventaja para su aplicación (De Boer *et al.*, 2003).

Hasta 33 especies distintas de microorganismos con potencialidad para la degradación de hidrocarburos se han llegado a coleccionar en Indonesia; las

cuales incluyen ocho especies de bacterias, todas identificadas por técnicas moleculares y por características fenotípicas, pertenecientes a los géneros *Gordonia*, *Brevibacterium*, *Aeromicrobium*, *Dietzia*, *Burkholderia* y *Mycobacterium* (Chen *et al.*, 2006).

Resulta sorprendente interpretar, la versatilidad metabólica de algunas bacterias como *Azotobacter nigricans* y *Derxia gummosa*, especies fijadoras libres de nitrógeno, las cuales son capaces de permanecer en suelos con niveles de hasta 5000 ppm de queroseno, y sostener una fijación de nitrógeno atmosférico en gramíneas (Pérez *et al.*, 2002). Igualmente, en ambientes tan inhóspitos como la Antártida, pueden cohabitar bacterias y hongos psicrotolerantes, metabolizando hidrocarburos alifáticos en suelos contaminados (Hughes *et al.*, 2007).

Otro grupo de microorganismos importantes en el proceso de remediación de suelos y aguas, son los hongos. Así, Chen *et al.*, (2006), señalan a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Amorphoteca*, *Neosartorya*, *Paecilomyces*, *Talaromyces* y *Graphium*, y las levaduras *Candida*, *Pichia* y *Yarrowia* creciendo en suelos impactados con petróleo. Igualmente Mancera *et al.*,(2008), identificaron especies nativas de *Rhizopus sp.*, *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus sydowii*, los cuales fueron capaces de crecer fuera de su habitat, en una mezcla de hidrocarburos constituida por

hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos policíclicos aromáticos y otros hidrocarburos de alto peso molecular.

Un tipo muy particular de hongos, objeto de este estudio, son los pertenecientes al Phylum Glomeromycota, que forman las micorrizas arbusculares (MA). Estos constituyen parte de la microbiota asociada a la rizósfera de la mayoría de las plantas, cuya funcionalidad en la solución de problemas ambientales derivados de la extracción de petróleo, localmente ha sido poco estudiada.

Existen numerosas evidencias que apuntan hacia la posibilidad de uso de los hongos Glomeromycota en la recuperación de suelos contaminados con petróleo, en este sentido, Joner y Leyval (2003), señalan que hasta en un lapso de 13 semanas, estos hongos pueden contribuir con la disipación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA). Igualmente, Volante *et al* (2005), lograron una eliminación del 40% del total, del benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), en plantas contaminadas artificialmente e inoculadas con MA.

Verdin *et al.*, (2006) y White *et al.*, (2006), reportaron la presencia de estos hongos en ambientes perturbados, y demostraron la potencialidad de uso de ellos, reafirmando la idea de que ciertas especies de MA, pueden ser capaces de acumular en sus hifas hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), y almacenar intracelularmente el contaminante, a la vez que incrementan el crecimiento radical de la planta. Como ya se dijo anteriormente,

este grupo de hongos son sujetos de estudio de la presente investigación, razón por la cual se detallarán mas adelante.

4.1. Estrategias microbianas involucradas en la transformación de hidrocarburos.

4.1.1 Mineralización

La mineralización es la conversión del carbono orgánico, en este caso hidrocarburo, en CO₂, es decir de carbono orgánico a carbono inorgánico. Es un mecanismo microbiano natural que se produce debido a la capacidad que tienen ciertos organismos de transformar moléculas orgánicas, en sustancias más pequeñas que resultan menos tóxicas. En esta condición, Jacques *et al.*, (2007), identificaron un consorcio de microorganismos, conformado por bacterias como: *Mycobacterium fortuitum*, *Bacillus cereus*, *Microbacterium sp.*, *Gordonia polyisoprenivorans*, y un hongo reconocido como *Fusarium oxysporum*, todos aislados de un landfarming contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos a diferentes concentraciones. Este consorcio microbiano fue capaz de degradar un promedio de 99% de la concentración de antraceno, fenantreno y pireno de un suelo en 70 días.

4.1.2 Oxidación

Los hidrocarburos aromáticos, pueden ser oxidados, debido a la producción de metabolitos por parte de los microorganismos. De acuerdo a Cerniglia y Sutherland (2001), un género de hongo con tal capacidad es *Cylothrium sp*, el cual oxida compuestos aromáticos de diferentes pesos moleculares, debido a que están dotados genéticamente para tal facultad.

4.1.3 Actividades enzimáticas

Se considera que la actividad enzimática es una de las numerosas formas de medir la calidad del suelo, y esta asociada a condiciones que inician la síntesis de enzimas microbianas, estabilización y preservación de enzimas extracelulares. Por preceder a la acumulación de materia orgánica, la actividad enzimática, tiende a ser un sensible y efectivo indicador de los cambios en calidad del suelo. Al estimarla bajo condiciones óptimas “in vitro”, es considerada como una medida potencial, ya que la información que ofrece permite aportar conocimientos sobre los procesos bioquímicos que se dan en el suelo (Cerón y Melgarejo, 2005), además puede ser útil para entender el efecto cambios en los sistemas de manejo y la aplicación de pesticidas, enmiendas orgánicas y otros compuestos sobre la calidad de los suelos (Margesin *et al.*, 2000).

Ciertos microorganismos aislados en suelos contaminados con hidrocarburos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, lo cual ha permitido la oxidación de algunas fracciones del petróleo (Rich, *et al*, 2000). Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos haciéndolos susceptibles los ataques secundarios facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua (Torres, 2003; Van *et al*, 2003).

4.1.4 Producción de biosurfactantes extracelulares

En general, muchos microorganismos pueden producir emulsificantes, es decir crear sustancias que ayudan a que un compuesto no polar como las grasas y uno polar como el agua formen una mezcla estable llamada emulsión, al estar en contacto con los hidrocarburos (Pérez *et al.*, 2002). Especies de microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, pueden solubilizar y facilitar la penetración de los hidrocarburos a través de la pared celular hidrofílica, ya que contienen enzimas degradadoras de hidrocarburos en la membrana citoplasmática.

Se ha sugerido que ciertos microorganismos involucrados en la degradación de hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), exhiben propiedades fisiológicas que mejoran la disponibilidad de compuestos hidrofóbicos. En este sentido Coppotelli *et al.*, (2007), estudiaron cultivos de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA en medio mineral líquido

suplementado con cristales de fenantreno. El examen con microscopía electrónica de barrido reveló, que el contacto entre la célula y la superficie del sustrato se realiza mediante una sustancia polimérica extracelular, concluyendo así, que la cepa poseía mecanismos que ayudan a la solubilización, de suelos contaminados con HPA.

4.1.5 Diversidad de vías metabólicas

La energía metabólica de los microorganismos constituye una fuente prácticamente inagotable, ya que éstos, por medio de su amplia diversidad metabólica, son capaces de utilizar cualquier sustrato como fuente de energía, lo cual conlleva a la posibilidad de uso de estos microorganismos en proceso de la recuperación de suelos (Fontúrbel e Ibáñez, 2004). En tal sentido, el género bacteriano *Rhododoccus*, presenta una gran variabilidad bioquímica para degradar y modificar compuestos aromáticos, incluyendo las actividades de di-oxigenasa y mono-oxigenasa sobre anillos, la actividad de ruptura de catecol, y algunas cepas presentan también la vía del 3-oxoadipato (Sánchez *et al.*, 2004).

CAPITULO V

5. LOS HONGOS GLOMEROMYCOTA EN LA REMEDIACION DE SUELOS

Varias formas de simbiosis micorrizica son reconocidas. Siguiendo diversos criterios, las micorrizas se han clasificado en siete tipos: Ectomicorrizas, Endomicorrizas o Micorrizas Arbusculares (MA), Ectendomicorrizas, Arbutoides, Monotropoides, Ericoides y Orquidioides. Entre todas ellas, las micorrizas arbusculares son las de mayor importancia, ya que se encuentran en condiciones naturales en la mayoría de los cultivos tropicales y subtropicales de interés agronómico (Sierverding, 1991).

5.1 Definición

El término micorriza es considerado como la unión simbiótica, mutualística y multifuncional, en la cual los organismos participantes (hongo y planta), se benefician no solo desde el punto de vista nutricional, sino que la relación se extiende más allá de un sin número de aspectos entre los que se destacan un mejor crecimiento de las plantas en suelos pobres en nutrimentos, un aumento en la capacidad de absorción de elementos de limitada movilidad en el suelo, mejor aprovechamiento del agua del suelo, detoxificación de metales pesados, protección contra patógenos, estabilización de los

agregados del suelo, y tolerancia en las plantas a condiciones particularmente de estrés (García *et al.*, 2000, Jeffries *et al.*, 2003).

Esta asociación induce importantes cambios fisiológicos que conducen a beneficios recíprocos, resultado de transformaciones específicas en la expresión de los genes de ambos socios (Balestrini y Lanfranco, 2006).

5.2 Anatomía

Los hongos Glomeromycota son simbioses obligados de la mayoría de las raíces de plantas angiospermas y gimnospermas. Smith y Read (2008), señalan que la designación correcta es “Arbuscular”, debido a que la característica común en todos estos es la presencia de arbuscúlos (figura 5).

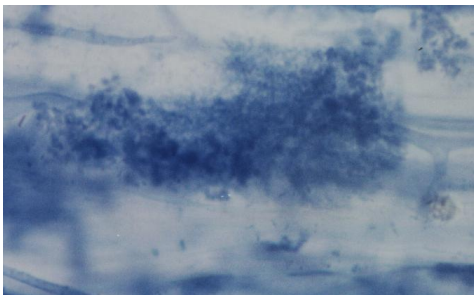


Figura 5. Arbúsculo en raíz de parchita (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) en su estado juvenil (40x)

Fuente: Gamarra R., (1999).

Morfológicamente se caracterizan por desarrollar un micelio interno cenocítico intercelular e intracelularmente, que penetra entre las células

corticales de la raíz. Intrarradicalmente forman los arbuscúlos, los cuales constituyen ramificaciones dicotómicas de hifas, las cuales poseen un corto período de duración, y están asociados al transporte de sustancias a través de la membrana (Brundrett, 2002).

Luego de la aparición de los arbuscúlos, el micelio interno comienza acumular reservas alimenticias, transformándose en unos ensanchamientos terminales de hifa llamados vesículas (Figura 6), sin embargo existen algunos géneros como *Gigaspora* y *Scutellospora* que no producen estas últimas, pero en su defecto producen estructuras extrarradicales, consideradas análogas a las vesículas llamadas células auxiliares (Hernández *et al.*, 2003).

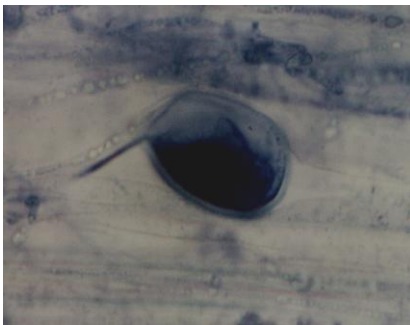


Figura 6. Vesícula en raíz de parchita (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) en su estado juvenil. (40x)

Fuente: Gamarra R. (1999).

En el interior de la raíz forman un micelio interno y exteriormente, originan otro micelio ramificado en forma de (Y), el cual se caracteriza por ser

mas fino que el interno, y al madurar el hongo genera las esporas asexuales de gran tamaño entre 50 –600 micras (Hernández *et al.*, 2003).

Se cree que la reproducción de los hongos MA es asexual, ya que son muy parecidos, siendo las esporas las únicas estructuras a través de las cuales se pueden diferenciar (Hernández *et al.*, 2003) (Figura 7).

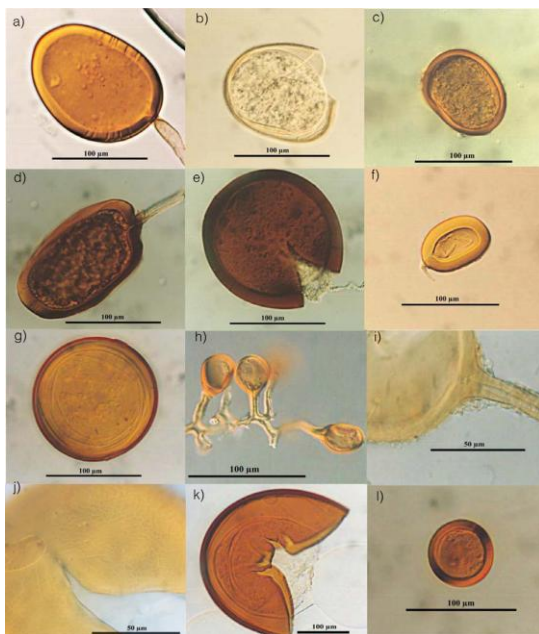


Figura 7. Diferentes morfotipos de MA, aislados de la Gran Sabana- Venezuela
Fuente: Lovera y Cuenca (2007)

Anatómicamente estos hongos difieren del resto de los hongos en sus paredes celulares, ya que presentan la pared de la espora normalmente es helicoidal así como peldaños de escalera, sin embargo la estructura puede variar en los distintos estadios de desarrollo (Hernández *et al.*, 2003).

5.3 Clasificación taxonómica

La clasificación taxonómica de los hongos MA, inicialmente se basó en las diferencias morfológicas de las esporas, su comportamiento fisiológico, como son la capacidad de formar vesículas y arbusculos, germinación de la espora, la estructura de la pared celular, la ornamentación de las células auxiliares y el orden de las esporas en el esporocarpio. Aunque hoy día, la determinación a nivel de género puede ser llevada a cabo por personas no especialistas con el uso de claves, para ser más preciso, la determinación a nivel de especie requiere de estudios moleculares, la aplicación de técnicas de amplificación del ADN por PCR, uso de marcadores moleculares, anticuerpos monoclonales, y un mayor juicio de especialistas (Gabor *et al.*, 2007).

No obstante, la tendencia en el estudio taxonómico de estos hongos, además del uso de técnicas moleculares, es el uso otras pruebas como las determinaciones de perfiles de ácidos grasos, reacciones inmunológicas ante determinados anticuerpos monoclonales específicos, las cuales son complementadas con la caracterización morfológica de la espora y hábitos de colonización (Alarcón, 2001).

Por lo tanto, ante el uso de nuevas técnicas de identificación más sofisticadas, la taxonomía estos organismos es sujeto de constante

modificación, razón por la cual no existen acuerdos de una clasificación única por parte de los taxónomos.

De acuerdo a la revisión realizada por Morton y Benny (1991), los hongos Glomeromycota arbusculares (HMA), pertenecían a la División Eumycota, Clase Zigomicetes (hongos con micelio cenocítico y sin septo), y eran ubicados dentro del Phylum Zygomycota, Clase Zygomycetes, donde solo se conocían seis géneros de hongos endomicorrízicos; *Glomus*, *Sclerocystis*, *Gigaspora*, *Scutellospora*, *Acaulospora* y *Entrophospora*.

Con el transcurso del tiempo, nuevas rectificaciones han surgido respecto a la taxonomía de éstos hongos, elevándolos a la categoría de Phylum monofilético nuevo; el Glomeromycota, basado en el análisis de pequeñas secuencias de la subunidad ADNr (Schüßler *et al.*, 2001).

Sin embargo, ante la inminente necesidad de aclarar dudas respecto a la filogenia de este grupo de hongos, Morton y Redecker (2001), realizaron aportes significativos a la taxonomía de los hongos MA, al describir nuevas familias, cuyos miembros presentaban características atípicas, por ejemplo, dentro de la familia *Archeosporaceae*, con un único género, el *Archeospora*, se incluyen 3 especies nuevas; *A. trappei*, *A. leptoticha* y *A. gerdemanii*; por otro lado dentro de la familia *Paraglomaceae*, con el género *Paraglomus*, se derivan 2 especies; *P. occultum*, y *P. brasilianum*.

Afortunadamente con el avance en la tecnología cibernética, ha permitido la alianza de información a nivel mundial, dando como resultado bases de datos disponibles, como la clasificación de Schüßler y Walker (2010), donde ratifica el reino Glomeromycota, una clase, 4 órdenes, 9 familias, 27 géneros y 251 especies. Sin embargo, a pesar de que los Glomeromycota como phylum se han mantenido, la dinámica de los análisis filogenéticos, ha permitido detectar variaciones génicas dentro de los individuos, lo cual implica el nacimiento de nuevas familias, nuevos géneros o nuevas especies (Krüger *et al.*, 2009; Morton y Msiska, 2010; Schüßler y Walker, 2010), que son reportados e incluidos en nuevas clasificaciones, y posteriormente rechazados, y/o mantenidos con el transcurso del tiempo. No obstante, es obvio que ante la dinámica por esclarecer la filogenia de éstos hongos, recientemente Redecker *et al.*, 2013, establecieron un consenso que se basa en las regiones que abarcan los genes de ARN ribosomal 18S: (SSU), ITS1-5.8S-ITS2 (ITS), y / o 28S (LSU), en la cual se muestran las partes del árbol en que están de acuerdo (figura 8).

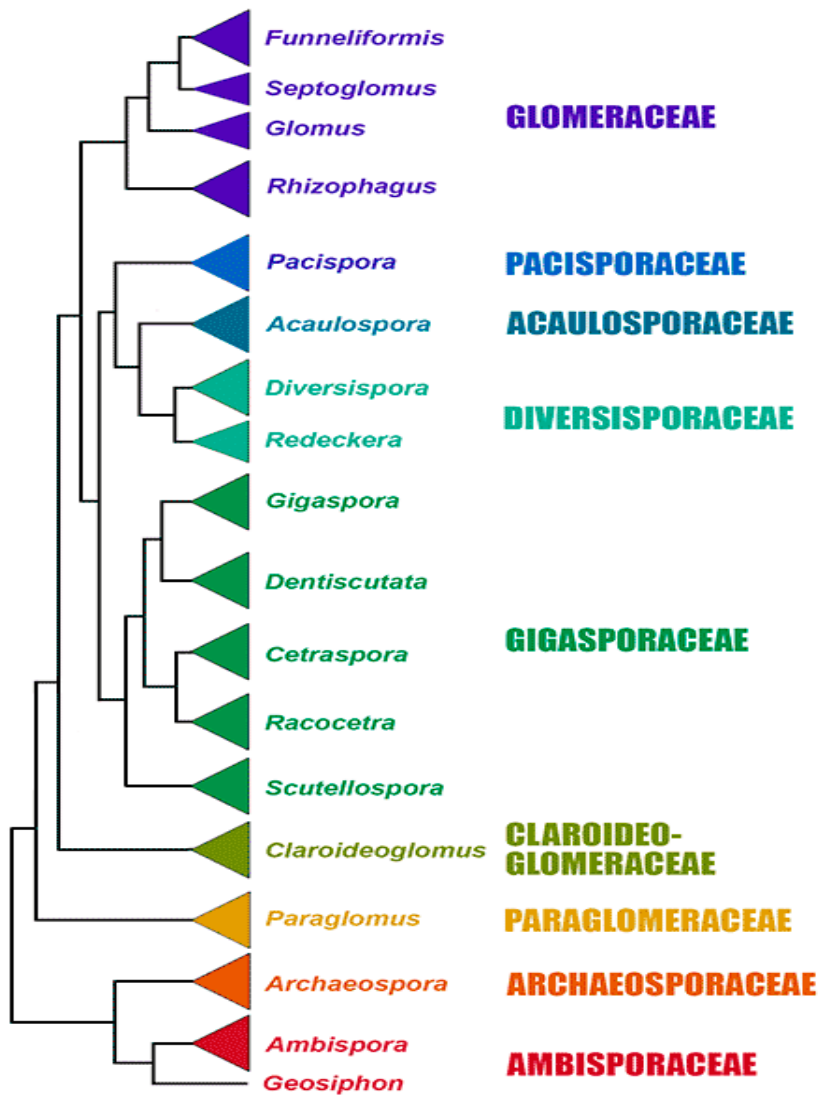


Figura 8. Clasificación filogénica basada en la secuencia LSU

Fuente: Redecker *et al.*, 2013

Esa publicación hace referencia al resultado de una reunión de los sistemáticos comprometidos para tratar de lograr una clasificación de consenso sobre la base de criterios claramente definidos para que sirvan de base para avanzar en la misma.

5.4 Distribución de los hongos Glomeromycota en reino vegetal.

Más de un 95% de las raíces de especies vegetales están asociadas con hongos MA, desde Briofitas, Pteridofitas, Gimnospermas y angiospermas, siendo pocas las familias de plantas que no forman este tipo de asociación, como por ejemplo las familia Commelinaceae, Juncaceae del grupo de las monocotiledóneas. La familia Cyperaceae era considerada no micorrízica, hasta que Muthukumar *et al.*, (2004) revelaron, que miembros de la misma son capaces de establecer asociación simbiótica con hongos micorrízicos arbusculares, pero bajo la influencia de condiciones ambientales extremas. Dentro del grupo de las dicotiledóneas excentas de formar unión micorrízicas se citan las familia *Brassicaceae*, *Fumariaceae* y *Urticaceae* (Pérez *et al.*, 2011).

5.5 Fisiología de los hongos Glomeromycota

Según Hernández *et al.*, (2003), para que se inicie el proceso de colonización micorrízica, necesariamente en el suelo debe existir por lo menos alguno de los tres tipos de propágulos de los hongos MA. Las estructuras

mediante las cuales los hongo arbusculares que pueden iniciar ese proceso son: las esporas de resistencia, los fragmentos de raíces micorrizadas y las hifas del hongo.

Las esporas de resistencia, contienen de 1500-2000 núcleos, se caracterizan por permanecer en reposo largos periodos, germinan independientemente de la presencia de la raíz, y los factores que desencadenan el proceso para su germinación aún son desconocidos. Los fragmentos de raíces micorrizadas son más rápidos en la infección que las esporas, y su viabilidad depende de la capacidad metabólica del fragmento de raíz, así como de la presencia de vesículas intrarradicales. Las hifas del hongo son otro tipo de propágulo importante, cuya poder infectivo está determinado por la capacidad colonizadora del hongo.

Todas estas estructuras permiten iniciar el proceso de colonización y contribuyen a que el hongo pueda perpetuarse en el espacio y en el tiempo.

El establecimiento de asociaciones mutualistas implica un reconocimiento mutuo y un alto grado de coordinación sobre la base de un diálogo molecular continuo entre ambos simbioses (Harrison, 2005).

En las asociaciones micorrizas, el proceso de colonización está regido por mecanismos celulares, inherentes tanto a la planta como al hongo. Respecto a esto, Buée *et al.*, (2000), señalaron, dos importantes descubrimientos que

demonstraron la existencia de una interacción temprana entre la raíz de la planta y el hongo, la cual implica una mutua liberación de moléculas señalizadoras difusibles, liberadas a partir de las raíces de las plantas, llamadas "factores de ramificación" (BFS), las cuales inducen respuestas morfológicas y citológicas en las hifas fúngicas.

Por su parte, las hifas del hongo, en respuesta sufren un marcado cambio morfológico, atribuible al reconocimiento hongo-planta, a la vez que producen "factores myc" que conducen a la inducción transcripcional de genes de la simbiosis en la raíz hospedadora (Kosuta *et al.*, 2003). Estos eventos de reconocimiento pre-simbióticos son pre-requisito para la formación de los apresorios de los hongos sobre la superficie de la raíz, la penetración, la colonización de hifas de los hongos dentro de la corteza de la raíz, y finalmente, la formación de arbusculos, dentro de las células de plantas.

Más reciente, Besserer *et al.*, (2006), llegaron a la conclusión que los llamados "factores de ramificación" que participan en las interacciones planta-suelo organismo, que estimulan el crecimiento pre - simbiótico de hongos MA, son las estrigolactonas. Las estrigolactonas, no son más que fitohormonas implicadas en la inhibición de los brotes de las plantas, derivan a partir de los compuestos carotenoides, y activan la germinación de las semillas en las plantas parásitas, pero particularmente, también estimulan la simbiosis con micorrizas (Akiyama y Hayashi, 2006). Soto *et al.*, (2010), señalan que son

las estrigolactonas, las que desempeñan un papel crucial en la interacción entre las plantas y los hongos micorrícicos arbusculares.

Las estrigolactonas, han sido aisladas de raíces de un gran número de plantas, a pesar de los bajos niveles en que se encuentran y de la inestabilidad del compuesto encontrándose mayor concentración en plantas capaces de establecer simbiosis y en concentraciones bajas de fósforo inorgánico. Aparentemente, el estímulo producido por la estrigolactona en el hongo es necesario para que este produzca los factores Myc y active la expresión de genes ENDO11 (Akiyama y Hayashi, 2006).

A continuación se resumen los eventos llevados a cabo durante el proceso de colonización, para el establecimiento de la simbiosis, que de acuerdo a Peterson *et al.*, (2004) son: pre infección, colonización intrarradical, desarrollo del micelio externo, esporulación del hongo y reinfección.

La pre infección: también llamada fase pre simbiótica, implica el acercamiento, adhesión y penetración de los propágulos (hifas o micelios, esporas) a la superficie del tejido cortical de la raíz. Aunque los mecanismos prescindibles para la germinación de la espora aún no han sido aclarados, se considera que en muchos casos la producción de exudados por parte de la

raíz constituye el estímulo necesario para que ocurra el acercamiento del hongo, y posterior contacto con la raíz.

Ante la ausencia de una raíz hospedadora, la espora de un hongo formador de MA, puede germinar y formar un tubo germinativo de corta duración (20-30 días), si en este lapso no se establece contacto con la raíz, el contenido del tubo se retrae. Si la espora germina, y se encuentra con pelos radicales de la planta, ésta selecciona como nicho el tejido parenquimático de la corteza, e inicia uno o varios puntos de entrada, a través de la formación de hifas especializadas llamadas aspersorios (Figura 9)

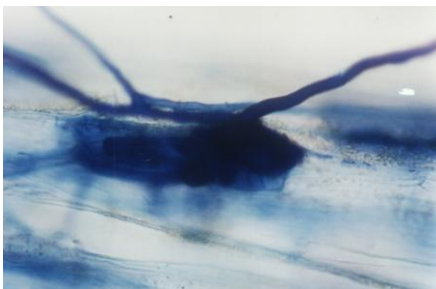


Figura 9. Formación del aspersorio en una raíz de parchita en una raíz de parchita (*Passiflora edulis Sims f. flavicarpa Degener*) en su estado juvenil (40x)

Fuente: Gamarra (1999).

Un proceso enzimático, mecánico o la combinación de ambos, es el mecanismo que conduce a la dispersión de las hifas internas o colonización intrarradical (Bago *et al.*, 2000), los cuales se prolongan por el parénquima cortical, pero no penetra la endodermis ni los tejidos vasculares y

meristemáticos (Peterson *et al.*, 2004). A los pocos días de la penetración de las unidades infectivas, se origina el arbúsculo, y se delimita la zona interfase hongo-planta, el plasmalema de la célula hospedadora no es perforado, sino que hifa penetra y todas las ramificaciones quedan rodeadas por él, esta situación provoca una amplia superficie de contacto entre las células de ambos organismos, garantizando de esta forma el intercambio de nutrientes entre el hongo y la planta (Peterson *et al.*, 2004).

Cuando la infección interna está bien establecida, un micelio externo se dispersa desde la superficie de la raíz hacia el suelo, para explorar el volumen de suelo circundante, el cual generalmente es inaccesible para la raíz (Peterson *et al.*, 2004), esta dispersión va a depender del tipo de suelo, de la planta hospedadora y del hongo (Cardoso y Noguera, 2003). A partir del micelio externo ocurre la esporulación, y los eventos de infección y reinfección se repiten con la misma raíz y con otras raíces (Peterson *et al.*, 2004).

5.6 Ecología de los Hongos Glomeromycota

Entre los múltiples factores bióticos y abióticos que afectan la composición de las comunidades de HMA se encuentran:

a) Los compuestos que permiten el reconocimiento planta-hongo y estimulan la germinación de esporas y crecimiento y ramificación de las hifas, como por

ejemplo los flavonoides (Vierheilig y Piché, 2002), las estrigolactonas (Akiyama y Hayashi, 2006), y las auxinas (Podila *et al.*, 2002).

b) La edad de las plantas es determinante para la conformación y funcionalidad de las comunidades micorrízicas, principalmente en grupos perennes o semiperennes, donde se ha encontrado, que una misma especie de plantas de diferentes edades en un mismo sitio, presentaban diferentes comunidades de hongos MA asociadas a ellas (Husband *et al.*, 2002).

c) Otros factores que pueden influenciar la estructura y diversidad de comunidades de HMA, son las prácticas agrícolas como la tala de bosques, fuego, fertilización y labranza (Jansa *et al.*, 2003) y en forma indirecta el microclima y la topografía que afectan a las comunidades de plantas y por tanto afectan a las comunidades de MA (Kernaghan, 2005).

Desde el punto de vista fisiológico, aún no está evidenciada la preferencia de las especies de hongos arbusculares por cierta clase o especie de planta, por lo que se asume que cualquier género, está capacitado para infectar cualquier planta. Sin embargo, bajo condiciones controladas de invernadero, se ha reportado, que cierto número de hospedadores posee una indudable afinidad por alguna especie de hongo MA, lo cual hace suponer la existencia de una “especificidad ecológica” (Helgason *et al.*, 2002; Vandenkoornhuysen *et al.*, 2002).

5.7 Interacción de los hongos Glomeromycota con los componentes bióticos del suelo

Como parte de la biota del suelo, los propágulos de los hongos Glomeromycota, pueden ubicarse lejos de la raíz, o formar parte integral de la micorrizósfera, término aplicado por primera vez por Sylvia (1999), el cual hace alusión a la zona del suelo afectada por la asociación micorrízica, donde las poblaciones microbianas pueden cambiar dinámicamente con el tiempo. La micorrizosfera presenta dos componentes; la capa de suelo alrededor de las raíces micorrizadas, y el suelo más cercano a las hifas del hongo micorrízico o micelo externo que componen la hifósfera o micósfera.

Mientras que en la rizósfera y el suelo contiguo las raíces, son influenciados por los exudados radicales, la micorrizosféra y el suelo adyacente a la misma, están afectados tanto por los exudados de la raíz, como del hongo, lo cual parece incrementar poblaciones de microorganismos específicas (Bending *et al.*, 2006).

Los hongos Glomeromycota, pueden interaccionar con los microorganismos rizosféricos y con los microorganismos fuera de la raíz, estimulando, inhibiendo y/o seleccionando grupos de microorganismos específicos, a la vez que pueden promover o contrarrestar el desarrollo de la micorriza. (Azcón *et al.*, 2002). Para un mayor entendimiento de las relaciones

que se establecen a nivel micorrizosférico, Johansson *et al.*, (2004), propone el esquema presentado en la Figura 10, donde destacan las posibles interacciones que se establecen durante una simbiosis micorrízica, tanto en los ecosistemas naturales como en un ecosistema artificial.

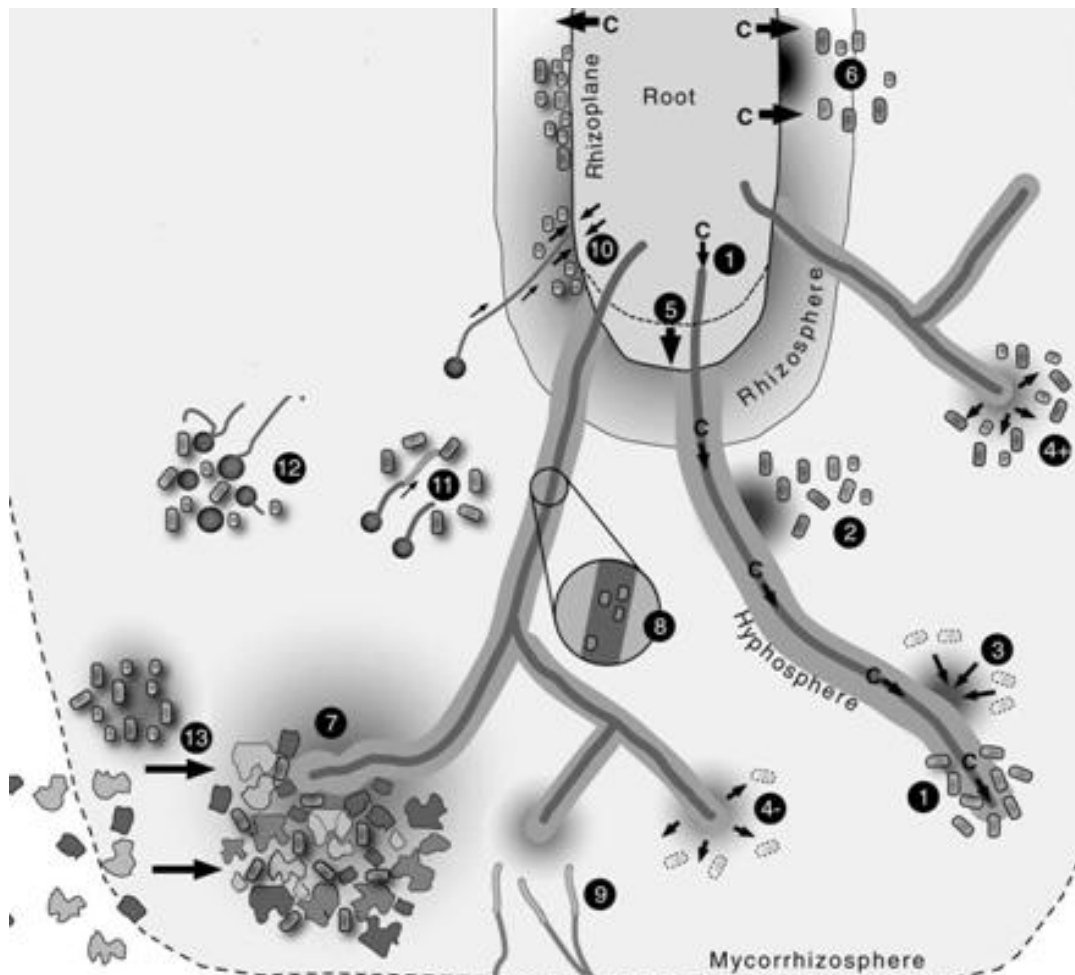


Figura 10. Representación esquemática de las relaciones micorrizosféricas

Fuente: Johansson *et al.*, (2004).

Esta serie de efectos confirman que la comunidad biótica del suelo logra ejercer un alto impacto en el establecimiento de las micorrizas, ya que pueden

controlar la dinámica de su población, la colonización de las raíces, así como el desarrollo tanto interno como externo de las hifas (Bending *et al.*, 2006).

5.8 Interacción de los hongos Glomeromycota con los microorganismos de la rizosfera

Los hongos MA, interactúan a nivel rizosférico con una gran variedad de poblaciones microbianas. Por ejemplo, los identificados como PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacterias, por sus siglas en inglés), los cuales además de producir compuestos elevadores de la tasa de exudación radical (Barea *et al.*, 2005), incrementan la colonización de las raíces, promoviendo el funcionamiento de la simbiosis con la planta hospedera, a la vez que estimulan el crecimiento de los hongos formadores de MA (Camelo *et al.*, (2011).

Otro grupo de microorganismos que promueve el desarrollo de la simbiosis micorrízica son las “Mycorrhization Helper Bacteria” (MHB), las cuales pueden aumentar su población ante la presencia del hongo. Este hecho fue demostrado por Frey *et al.*, (2007), con la cepa *Pseudomonas fluorescens* BBc6R18, lo cual sugiere que la bacteria depende más de la presencia del hongo que de la raíz micorrizada.

Un ejemplo importante de interacción, lo constituye la bacteria *Paenibacillus validus*, la cual apoya el crecimiento y la esporulación de *Glomus*

intraradices independientemente de la presencia de la planta (Bonfante y Anca, 2009).

Otro grupo de microorganismos, que actúan sinérgicamente con los hongos formadores de MA en los niveles de colonización, nutrición mineral y crecimiento de las planta, a través de ciertos mecanismos, son los microorganismos fijadores de nitrógeno (Melo *et al.*, 2008). Los mecanismos de ayuda incluyen la estimulación del desarrollo radicular, una mayor susceptibilidad de la raíz a la colonización de hongos micorrízicos, y la mejora del proceso de reconocimiento entre la raíz y los hongos (Bonfante y Anca 2009).

Por otro lado, Spagnoletta *et al.*, (2013), especifican que las interacciones MA con las bacterias fijadoras de N₂, pueden tener lugar en el estadio de precolonización, cuando los dos microorganismos interactúan como habitantes rizosféricos, o durante el desarrollo de la simbiosis tripartita; donde el genotipo del hospedante también influye en esta interacción. Estas Evidencias surgieron, al experimentar con *Glomus intraradices* y *Sinorhizobium meliloti* sobre alfalfa, revelando un alto porcentaje de colonización micorrízica, con una presencia importante de vesículas y apresorios.

5.9 Interacción de los hongos Glomeromycota con microorganismos patógenos.

La influencia de estos hongos en el crecimiento de las plantas afecta también su interacción con otros microorganismos tanto beneficios como patógenos. En general, los hongos MA, pueden compartir sustratos similares, con otros microorganismos de la micorrizosfera, y competir por sitios de colonización y por productos carbonados, generándose con esto, una forma de control biológico frente a diversos patógenos radicales (Whipps, 2004).

Para entender estas relaciones, Wehner *et al.*, (2010), han propuesto un mecanismo de “Interacción Competitiva”, el cual explica las posibles interacciones que establecen los hongos MA con los patógenos del suelo. Según los investigadores, la interacción competitiva puede ser de tipo directa (vía competencia por interferencia, incluyendo sustancias químicas), e indirecta (vía competencia por aprovechamiento). Estas interacciones han sido sugeridas como el mecanismo a través del cual, los hongos MA pueden ejercer su efecto protector contra patógenos de la raíces de las plantas.

Pozo y Azcón, (2007), sugieren que el efecto protector a la planta contra patógenos del suelo, además de ser ejercidos por el mejoramiento de la nutrición de la planta, la “indemnización” por daños, la competencia por sitios de colonización o por fotosintatos, los cambios en el sistema radical, el

cambios en la población microbiana de la rizósfera y la activación de los mecanismos de defensa de la planta, esté articulado a través de una intersección de señales entre el ácido salicílico y la hormona jasmonato, la cual conduce a un acondicionamiento de los tejidos ante el potencial impacto de patógenos.

Un ejemplo del efecto de las MA sobre el estrés biótico, fue evaluado por Scheffknecht *et al.*, (2006), en plantas de tomate colonizadas por *Glomus mosseae* e infectadas con el patógeno *Fusarium oxysporum*. En respuesta, las plantas con mayor colonización por MA, evidenciaron cambios en el patrón de exudación y la germinación de microconidios del patógeno fue reducida.

Recientemente Lioussanne (2010), en una revisión acerca del papel de los Hongos MA, sobre el control de patógenos, llegó a la conclusión de que dicho control está basado en la capacidad de estos hongos en estimular el establecimiento de rizobacterias en la micorrizósfera, las cuales adversa con el desarrollo del patógeno.

En resumen, la diversidad de organismos del suelo, así como sus interacciones son muy complejas y aún en la actualidad su conocimiento es poco profundizado. Los hongos formadores de MA, se relacionan con un alto número de organismos entre los que encuentran los solubilizadores de fósforo, los de vida libre, los simbióticos fijadores de nitrógeno, los productores de antibióticos, los sideróforos, los productores de hormonas de crecimiento para

las plantas, los saprófitos, los patógenos de plantas, los predadores y los parásitos, dando como resultado interacciones positivas, negativas o neutras tanto para el hongo, como para las plantas.

5.10 Factores abióticos involucrados en la eficiencia de la micorrización con hongos Glomeromycota

Actualmente el interés por el uso de microorganismos aportadores de beneficios a las plantas cultivadas, cobra mayor auge en términos del contexto de sostenibilidad de los agroecosistemas. En la agricultura sustentable o de bajos insumos, el papel de los microorganismos en mantener la fertilidad de los suelos y en el biocontrol de patógenos, parecen ser más importantes, que en la agricultura convencional, donde su significado ha sido solapado por las altas cargas de agroquímicos. Por tales razones, es importante además de profundizar en el conocimiento de las interacciones planta-microorganismos que cohabitan en el entorno las raíces, es también necesario investigar los factores abióticos del suelo en interacción con esos microorganismos, para desarrollar nuevos esquemas en materia de saneamiento y fertilidad suelos y, la producción de los cultivos (Johansson *et al.*, 2004).

5.10.1 Captación y transferencia de carbono en la simbiosis MA

La simbiosis de plantas con hongos MA, representa un alto costo para ella, por cuanto entre el 4 y el 20% del carbono fijado a través de la fotosíntesis

es consumido por el hongo (Parniske, 2008). Sin embargo, las hifas del hongo son mucho más finas que las raíces y para la planta podría ser desgastante producir más raíces que establecer una simbiosis que le aporte beneficios nutricionales (Helgason y Fitter, 2009).

El carbono tomado de la planta, es usado para la producción de estructuras básicas como esporas e hifas. El Carbono en forma de hexosas, es absorbido por los arbusculos intraradicales y son convertidos a lípidos y glicógeno que luego son exportados al micelio externo el cual no tiene la capacidad de absorber carbono del suelo (Smith y Read, 2008).

En las plantas el C es traslocado como sacarosa; para su paso a hexosa, forma como es absorbido por el hongo se requiere de un proceso de inversión química. El mecanismo por el cual la hexosa se libera al espacio interfacial y luego tomada por los arbusculo es desconocido. Hay poca evidencia de la existencia de proteínas exportadoras de hexosas. Una vez en las hifas la mayoría del C es convertido a lípidos (triglicéridos) reserva sustancias para su proceso de respiración.

5.10.2 Contenido de nitrógeno en el suelo

La proporción nutricional del suelo es un factor determinante para el establecimiento de una relación simbiótica exitosa entre la planta hospedadora y el hongo MA, particularmente la del nitrógeno (N), nutrimento que en mayor

grado promueve el crecimiento de los cultivos. La relación entre el contenido de nitrógeno en un suelo y la actividad de las micorrizas ha sido estudiada extensamente, comprobándose que, como resultado de una eficiente micorrización, las plantas aumentan la concentración interna de N, inclusive se ha determinado que bajo ciertas condiciones hay especies de hongos MA más eficientes en la absorción de N que otras (González *et al.*, 2012).

El mejoramiento de la nutrición nitrogenada de las plantas bajo micorrización puede atribuirse por una parte, a la estimulación de la fijación simbiótica, en el caso de las asociación con Fabáceas y por otra, al incremento del poder de absorción del N del suelo mediante las hifas externas del hongo, en cuyas células son localizados los genes primarios responsables de la señal de captación de N inorgánico desde el suelo; y de este micelio externo son transferidos a como aminoácido al micelio interno (Govindarajulu *et al* 2005).

Por otro lado, el hecho de que la extensión y proyección de las raíces por el micelio del hongo, posibilite la entrada de otros nutrimentos, que como el caso del fósforo, garantiza la energía en forma de ATP requerida para el incremento de la fijación biológica de nitrógeno y producción sucesiva de raíces, es otra razón de peso para considerar a las micorrizas como favorecedoras del buen estado del N en la planta (Jansa *et al* 2008).

Consecuentemente, las plantas a través del micelio externo del hongo pueden hábilmente proveerse de N aún en suelos pobres, en forma de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-). En el interior de las hifas extramatriciales (Jin *et al*, 2005), este nitrógeno es transformado en arginina y asimilado a través de los sistemas enzimáticos Glutamina Sintetasa (GS) y Glutamato sintetasa (GOGAT); en esta forma es traslocado hacia el micelio interno, donde la arginina es descompuesta en urea y ornitina, pasando la primera a urea (NH_4^+) y transferido a través del apoplasto a la células de las raíces micorrizadas (Figura 11).

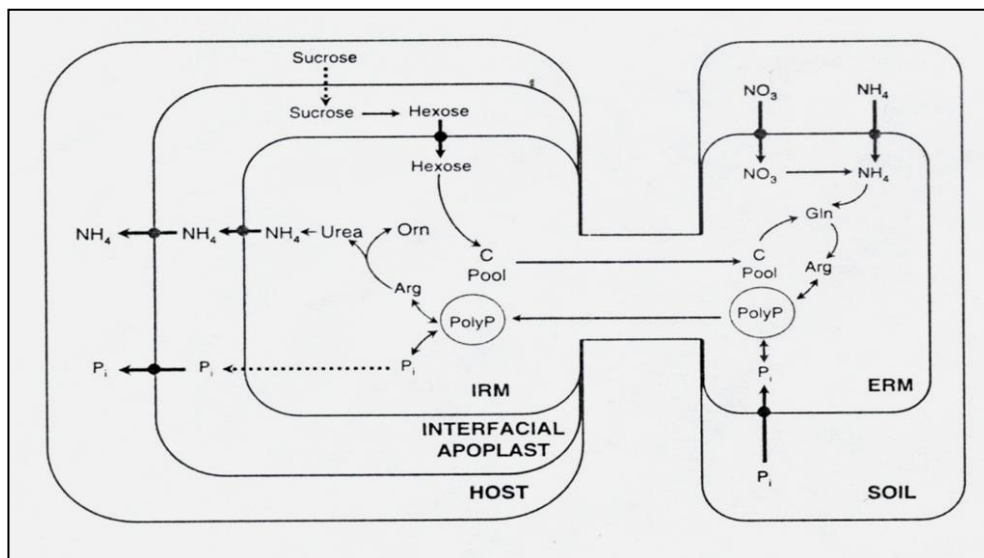


Figura 11. Modelo de transporte y metabolismo del N_2 , en el sistema simbiótico micorrizico arbuscular.

Fuente: Jin *et al*, 2005

Como se señaló anteriormente, la presencia de bacterias fijadoras de nitrógeno, ejerce un efecto sinérgico a la planta, al incorporar nitrógeno a estas últimas. En este sentido, Giri y Mukerji (2004), reportaron que la

inoculación de plantas de Fabáceas del género *Sesbania* con hongos de la especie *Glomus macrocarpum*, tuvo un fuerte efecto benéfico sobre la formación de nódulos en sus raíces, cuya cantidad fue significativamente mayor que en plantas no micorrizadas; lo mismo sucedió con la concentración de N en sus tejidos.

Paradójicamente, una alta disponibilidad de nitrógeno en el suelo, debido comúnmente a la aplicación de fertilizantes, produce un efecto inhibitorio de la actividad micorrízica en lo que se refiere a los niveles de colonización como a densidad de esporulación, debido según Olsson *et. al* (2005), a una posible inmovilización del C de la planta hacia el hongo. Al respecto Cordiki *et al* (2002), señalan que la aplicación excesiva de nitrógeno altera el balance entre los costos y beneficios de la simbiosis micorrízica, produciendo en consecuencia comunidades de hongos poco favorecedores a las plantas.

5.10. 3 Contenido de fósforo

El fósforo es un elemento esencial para la vida de las plantas, como constituyente clave de los ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas, y lo necesitan para crecer y desarrollar su potencial genético. Lamentablemente, el fósforo no es abundante en el suelo, y lo que es peor, mucho del fósforo presente en el suelo no está en formas disponibles para la planta. La disponibilidad de este elemento depende del tipo de suelo, lo cual condiciona

que una pequeña o gran parte del fósforo total pueda estar “fijado” (no disponible) en los minerales del suelo lo cual significa que la planta no puede absorberlo (Bravo, 2000). Por ello la cantidad de fósforo que entra en la planta está en función principalmente de la capacidad exploratoria de sus raíces.

En general, el ión fosfato tiende a ser retenido por los componentes del suelo lo que implica poca disponibilidad del mismo y desplazamiento muy restringido; como el ritmo de absorción por las raíces es mayor que su difusión a través del suelo se produce una zona de deficiencia en la rizósfera, pero el micelio externo del hongo micorrizico tiene la capacidad de desarrollarse mas allá de la zona de agotamiento absorbiendo mas fosfato, a mayor velocidad y aún en aquellos suelos con alto poder de fijación del ión (Brundrett, 2002).

5.10.4 Contenido de Sales

La concentración de sales al igual que las de hidrocarburos debida a causas naturales o resultado de acciones antrópicas, le confiere al suelo propiedades muy particulares provocando efectos nocivos en los cultivos. Los problemas de salinidad se presentan cada día con mayor intensidad en las regiones donde se lleva a cabo una agricultura intensiva y en expansión, sobre todo cuando se trata de condiciones áridas y semiáridas, y suelos impactados por petróleo. Las situaciones mas comunes de disturbios de sales en el suelo, son la salinidad y la sodicidad, las cuales disminuyen la capacidad de

utilización de agua y deterioran las características físicas del suelo, produciendo en consecuencia un retraso del crecimiento de las plantas, pérdida del rendimiento y finalmente la desvalorización de la tierra (Bravo, 2000).

Los efectos de la salinidad del suelo sobre las plantas envuelven dos situaciones deletéreas: primero, una reducción del potencial hídrico de la solución del suelo, lo cual limita la disponibilidad de agua y segundo, una toxicidad directa por la excesiva cantidad de iones Na^+ y Cl^- alrededor de la membrana plasmática (Fen *et al.*, 2002).

La toxicidad puede estar relacionada a una acumulación de Na^+ en las células de las hojas adultas (cloroplastos), que por su poca movilidad difícilmente es removido, lo que conduce a una reducción de la fotosíntesis, menos producción de carbohidratos y escasa traslocación a hojas nuevas, raíces, limitando su desarrollo normal. El Na^+ parece interferir en el metabolismo del carbono y la fotofosforilación (Azcón y Talón, 2000).

La micorrización constituye una posibilidad para la recuperación y utilización de muchas áreas afectadas por salinidad tomando, en cuenta que en el planeta más del 7% de los suelos padecen problemas de altas concentraciones de sales (Aliasgharzadet *et al.*, 2001).

La abundante diversidad de hongos MA que se encuentran habitando en ambientes con distintos grados de salinidad es un hecho que pone de relieve el uso de la micorrización con fines de aprovechamiento de los mismos

con propósitos agrícolas. Landwehr *et al.*, (2002), determinaron múltiples grados, de colonización y variados porcentajes de estructuras de hongos MA en las raíces de varias especies de plantas adaptadas a suelos salinos sódicos y sódicos (*Artemisia maritima*, *Aster tripolium*, *Plantago maritima*, etc) en 9 localidades de Ungría y Alemania, donde las sales mas comunes eran el Na_2CO_3 , Na_2SO_4 , Na Cl y CaSO_4 .

Wang *et al* (2004), encontraron al menos 24 especies del género *Glomus*, 7 del género *Acaulospora* y 2 del género *Archeospora* en 4 regiones del delta del río Amarillo en China, cohabitando en las raíces de 5 especies de plantas silvestres más comunes (*Tamarix chinensis*, *Phragmites communis*, *Suaeda gauca*, *Aeloropus littoralis* y *Cirsium setosum*) en condiciones de suelo salino.

En localidades de Iran, donde los suelos presentaron altos niveles de salinidad por Na, Cl, Mg y SO_4 , Aliasgarzadet *et al.*, (2001), localizaron numerosas esporas de *Glomus intraradices*, *Glomus mossae* y *Glomus etunicatum* en niveles de salinidad mayor de 40ds/m, asociados a cultivos de cebolla (*Allium cepa* L.), alfalfa (*Medicago sativa* L), trigo (*Triticum aestivum*) y cebada (*Hordeum vulgare* L), La colonización según estos investigadores, decreció en la medida que aumentaba la salinidad.

A criterio de Giri y Mukerji (2004), la reducción en la absorción del Na y los concomitantes incrementos en la absorción de P, N, Mg y elevado contenido de clorofila en plantas micorrizadas parecen ser importantes

mecanismos para mitigar los efectos de sales en las plantas que crecen en los suelos salinos. Los autores también sugieren un mantenimiento integral de la membrana vacuolar que se hace selectiva a los iones de Na.

Por otro lado Tapia (2010), al evaluar el comportamiento de un consorcio de hongos MA aislados y propagados de suelos salinos e inoculados en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*), bajo condiciones normales, encontraron que los mismos pueden conservar su capacidad infectiva, ya que la colonización micorrízica alcanzó el 80%, sin embargo no lograron manifestar efectividad, para las variables morfológicas evaluadas (volumen radical, área foliar y peso seco del follaje).

5.10.5 Metales pesados

El término de metal pesado se refiere a aquellos elementos cuya densidad es igual o superior a 5 gr m^{-3} o cuyo peso atómico es mayor a 20 (excluyendo a los metales alcalinos y alcalino-térreos), y de gran toxicidad a bajas concentraciones (Bravo, 2000), razones por las cuales, son considerados contaminantes.

El papel regulador de los efectos fitotóxico de los metales pesados en el suelo se ha puesto de manifiesto desde hace algunos años, pero en la actualidad ha tomado mayor énfasis sobre todo lo relacionado a los mecanismos de protección que desarrollan las micorrizas contra el estrés metálico.

Entre los metales pesados hay algunos que no cumplen una función biológica definida y su presencia en los organismos vivos aún en mínima proporción puede causar graves alteraciones orgánicas, son altamente tóxicos y se acumulan en seres vivos. Este es el caso de Cd, Hg, Pb, Ni, Sb y Bi. Otros son requeridos en pequeñas cantidades para cumplir diversas funciones nutricionales, estructurales pero que sobrepasar cierto límite se vuelven tóxicos, ejemplo de ellos son el Cl, Bo, Fe, Zn, Mn, Cu, Mo, Co y Se (Bravo, 2000), motivos por los cuales deben ser tomados en cuenta.

5.10.5.1 Efecto de los metales pesados sobre los hongos Glomeromycota.

Klauberg *et al.*, (2002), demostraron que los hongos micorrízicos pueden progresar en suelos contaminados con metales pesados. Ellos detectaron, la presencia de 7 especies de hongos MA del género *Acaulospora*, 6 de *Scutellospora*, 5 *Glomus*, 2 de *Gigaspora* y 1 de *Entrophospora*, asociadas a raíces de gramíneas (*Andropogon sp*, *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria mutica*), demostrando que los metales pesados y grado de contaminación, ejercen un efecto diferencial sobre las comunidades de estos hongos.

Por otro lado, Pawlowska y Charvat (2004), examinando in vitro los patrones de crecimiento y desarrollo de hongos Glomeromycota del género *Glomus*, en las diferentes etapas del ciclo de su vida, bajo la acción de

elevadas concentraciones de Pb, Cd y Zn, determinaron diferencias en la sensibilidad de *Glomus etunicatum* y *Glomus intraradices* a éstos elementos. Este último resultó menos afectado por el estrés metálico por cuanto presentó mayor germinación de esporas, mayor extensión de las hifas presimbióticas, mayor expansión del micelio extra radical y mayor esporulación.

De acá se desprende que las diferentes especies de hongos aún dentro del mismo género difieren en su tolerancia al estrés metálico, indicando que la supervivencia de algunos hongos MA contaminados con metales pesados es una propiedad innata del organismo relacionado con mecanismos metabólicos alternativos, más que una adaptación específica ambiental.

Sin embargo, Ferrol *et al*, (2009), concluyen, que para poder sobrevivir en ambientes contaminado con Cu, los hongos formadores de MA, presentan una serie de estrategias, tales como:

- a). La compartimentalización, donde el exceso de metal es traslocado a vacuolas, sitio en el cual podría causar menos daño.
- b). Acumulación del metal en las esporas extraradicales y vesículas
- c). Evasión, para restringir los niveles tóxicos de en su citoplasma
- d). Complejación intracelular del metal en el citosol, es decir, unión del metal.

5.10.5.2 Efecto de los metales pesados sobre las plantas micorrizadas

Azcón y Talón (2000), consideran que los mecanismos de tolerancia a metales pesados se basan en limitar su entrada a la raíz mediante la formación de complejos orgánicos liberados al suelo o, una vez dentro pueden fijarse a la pared celular o restringir su movilización a través de la membrana plasmática, y si logran penetrar al citoplasma, los metales se unen a fitoquelatinas y son almacenados en la vacuola, donde no son perjudiciales (Figura 12).

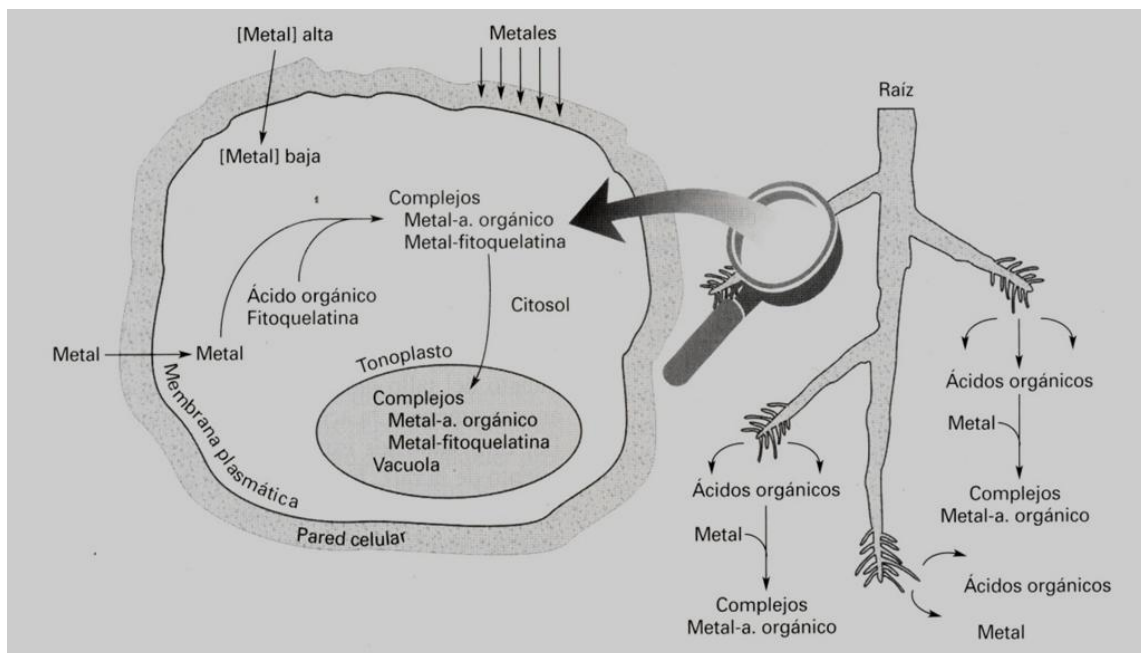


Figura 12. Mecanismo de inmovilización de metales pesados por raíces micorrizadas.

Fuente: Azcón y Talón, 2000

Yi *et al* (2005), por otra parte, evidenciaron que con la micorrización es posible proteger a las plantas de la fitotoxicidad provocada por elevadas

concentraciones de Cu, Zn y Pb por un mecanismo de transformación de formas bioasimilables de estos metales a formas no bioasimilables en la rizósfera de las plantas micorrizadas. Los mismos autores también determinaron que la protección contra la fitotoxicidad por Cu y Zn se efectúa por un bloqueo en la absorción en plantas micorrizadas con *Glomus mosseae* y por estimulación a la formación de quelatos de compuestos orgánicos que fijan el Cu y el Zn en el suelo haciéndolo poco absorbible.

Igualmente, la producción de formas de oxígeno activos observados por Fester y Hause (2005), en las estructuras de los hongos micorrízicos de plantas de maíz (*Zea mays*) y tabaco (*Nicotiana tabacum*) bajo condiciones de estrés, sugieren que las micorrizas pueden aliviar el estrés metálico de estas plantas a través de la producción de oxidantes no enzimáticos como el glucatón, ascorbato y α -tocoferol y de enzimas antioxidantes como la superóxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la glutathione reductasa entre otras, como lo señalan Azcón y Talón (2000).

Finalmente Cornejo *et al.*, (2008), concluyen que tanto la planta como el hongo poseen mecanismos similares para evadir o tolerar los metales pesados, los cuales se citan a continuación:

a) Inmovilización en el suelo por la secreción de sustancias quelantes (reduce la toma o incrementa el flujo, formación de complejos fuera de las células, liberación de ácidos orgánicos, etc.).

- b) Enlace del metal pesado (MP), a los biopolímeros de la pared celular (quitina, celulosa).
- c) Inmovilización sobre la superficie de la membrana plasmática una vez atravesada la pared celular.
- d) Transportadores de membrana que ingresan MP desde el suelo al citosol.
- e) Quelación intracelular por síntesis de ligandos como metalotioneínas, ácidos orgánicos, polifosfatos, aminoácidos, etc.
- f) Exportación de MP desde el citosol mediante transportadores de membrana.
- g) Confinamiento de MP en vacuolas.
- h) Absorción biológica vía glomalina.

5.10.6 Efecto de los hidrocarburos de petróleo sobre los hongos Glomeromycota.

No solo los hongos formadores de MA, pueden de alguna manera participar en los procesos de remediación de suelos contaminados con petróleo, ya que existen evidencias de participación de asociaciones ectomicorrizas. En tal sentido, Genney *et al.*, (2004), demostraron la capacidad degradativa de Hidrocarburos policíclicos aromáticos, al menos en cultivo puro de los hongos *Thelephora terrestris* and *Laccaria laccata*, por oro

lado, Joner *et al.*, (2006), detectaron que el hongo ectomicorrizico *Suillus bovinus* forma sustancias hidrofóbicas en el micelio, el cual entra en contacto con el Hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), y promueve su degradación.

Son considerablemente pocas, las investigaciones orientadas a dilucidar el papel de las plantas micorrizadas y su interacción con hidrocarburos de petróleo en ambientes perturbados. Hernández *et al.*, (2000), por ejemplo sugieren que a pesar de que la simbiosis MA puede ser afectada negativamente por la presencia de hidrocarburos en las etapas iniciales de colonización, por disminuir el número de especies del hongo en el suelo, los parámetros morfométricos de la planta, tienden a mejorar al final de su ciclo biológico, lo cual podría interpretarse como una conducta de adaptación por parte del hongo a tales condiciones.

Una posible ventaja, atribuible a la presencia de MA en suelos contaminados con hidrocarburos, es que la planta micorrizada puede subsistir mejor bajo estrés hídrico (Joner y Leyval, 2001), ya que las hifas externas del hongo pueden captar agua más allá de la zona de deficiencia hídrica, que normalmente rodea a las raíces en condiciones de sequía.

Por otro lado Joner y Leyval (2001), sugieren que el establecimiento de asociaciones de MA, conjuntamente con asociaciones simbióticas fijadoras de N atmosférico, en suelos contaminados con hidrocarburos, puede ayudar a

atenuar el efecto contaminante del hidrocarburo, ya que estas asociaciones, aumentan la absorción de nutrimentos minerales del suelo, lo que se expresa en un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas. Sobre todo aquellos minerales de lenta difusión en el suelo (P, Cu y Zn). La adquisición de fosfato es de vital importancia para la planta, por su papel clave en los sistemas biológicos, es sabido que las plantas micorrizadas captan fosfato más eficientemente que las raíces solas. Gracias al mejoramiento de la nutrición fosforada, aumenta también la adquisición de elementos nitrogenados por parte del vegetal.

Una de las primeras evidencias promisorias, atribuibles a la presencia de hongos MA, en suelos contaminados con hidrocarburos, fue la dada a conocer por Volante *et al.*, (2005), al evaluar el efecto de las MA, sobre la persistencia del benceno, tolueno, Etilbenzeno, y Xileno (BTEX), ellos, no solamente lograron comprobar fuertes reducciones en la concentración de BTEX en el suelo, sino que además evidenciaron, que estas reducciones, pueden variar con las especies fúngicas AM y la naturaleza de los BTEX.

Verdín *et al.*, (2006), con la finalidad de determinar la posible potencialidad de éstos hongos al proceso de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, llevaron a cabo estudios *in vitro*, para evaluar el efecto del antraceno sobre el desarrollo de la simbiosis, y su contribución en la transformación del contaminante. Ellos encontraron una evidente disminución del micelio intra radical del hongo, de su esporulación, y

del porcentaje de colonización, pero la presencia de la simbiosis fue evidentemente positiva, debido a que además de presentarse disminución en la concentración del contaminante, detectaron trazas del mismo tanto en las células radicales de la planta, como en las hifas del micelio intra radical del hongo (Figura 13).

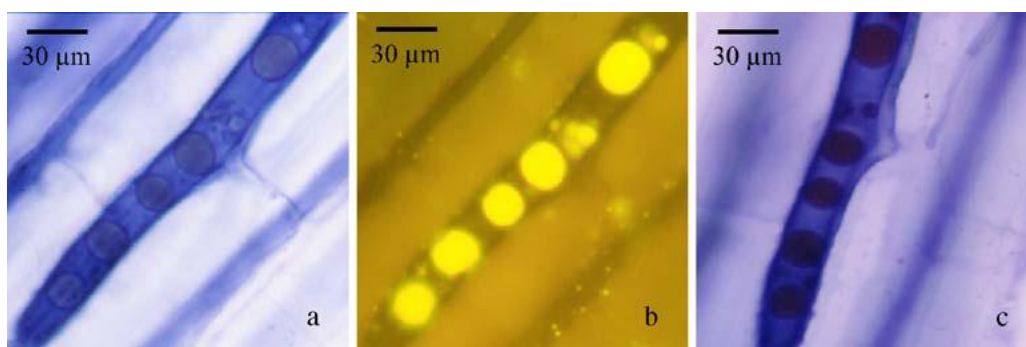


Figura 13. Observación en microscopio de luz, de elementos intracelulares en hifas de *G. intraradices*, creciendo en un medio con antraceno ($\times 100$). (a) Campo brillante, (b) En Fluorescencia usando un filtro estándar, (c) Tinción con Azul de sudan.

Fuente: Verdín *et al.*, (2006).

Aunque las estrategias implicadas en la biodegradación de hidrocarburos con MA, aún no han sido dilucidadas al presente, Verdín *et al.*, (2006), sugieren que en el caso particular de su investigación, la acumulación de antraceno, fue el resultado de un intercambio bidireccional a lo largo del micelio cenocítico, mediado a través de enzimas transportadoras de cuerpos lipídicos, desde la hifa extra radical hacia la hifa intra radical y viceversa, lo que en consecuencia se interpreta como una traslocación de antraceno a través de cuerpos lipídicos en las hifas del hongo.

CAPÍTULO VI

6. MARCO METODOLÓGICO

La investigación se llevó a cabo en tres fases: trabajo de campo, ensayos preliminares de laboratorio y vivero, y finalmente la correspondiente a la ejecución y análisis.

6.1 Fase I. Trabajo de campo.

La zona objeto de estudio se ubicó en la fosa “La Caracola”, la cual tiene un tiempo en desuso de 17 años (a la fecha de muestreo), y representa una de las 17 mil fosas petrolíferas existentes en todo el territorio nacional (Portal Web PDVSA, 2006). Se encuentra situada bajo las coordenadas 9° 01' 819" N y 64° 33' 155" W, entre la población de Anaco y El Tigre- Estado Anzoátegui, zona con graves problemas ambientales, a causa de la contaminación con hidrocarburos de petróleo. En la misma se realizaron muestreos rizosféricos y no rizosférico con fines de determinaciones biológicas

y evaluaciones químicas del suelo respectivamente. En la figura 14 se resume la operatividad de esta fase.

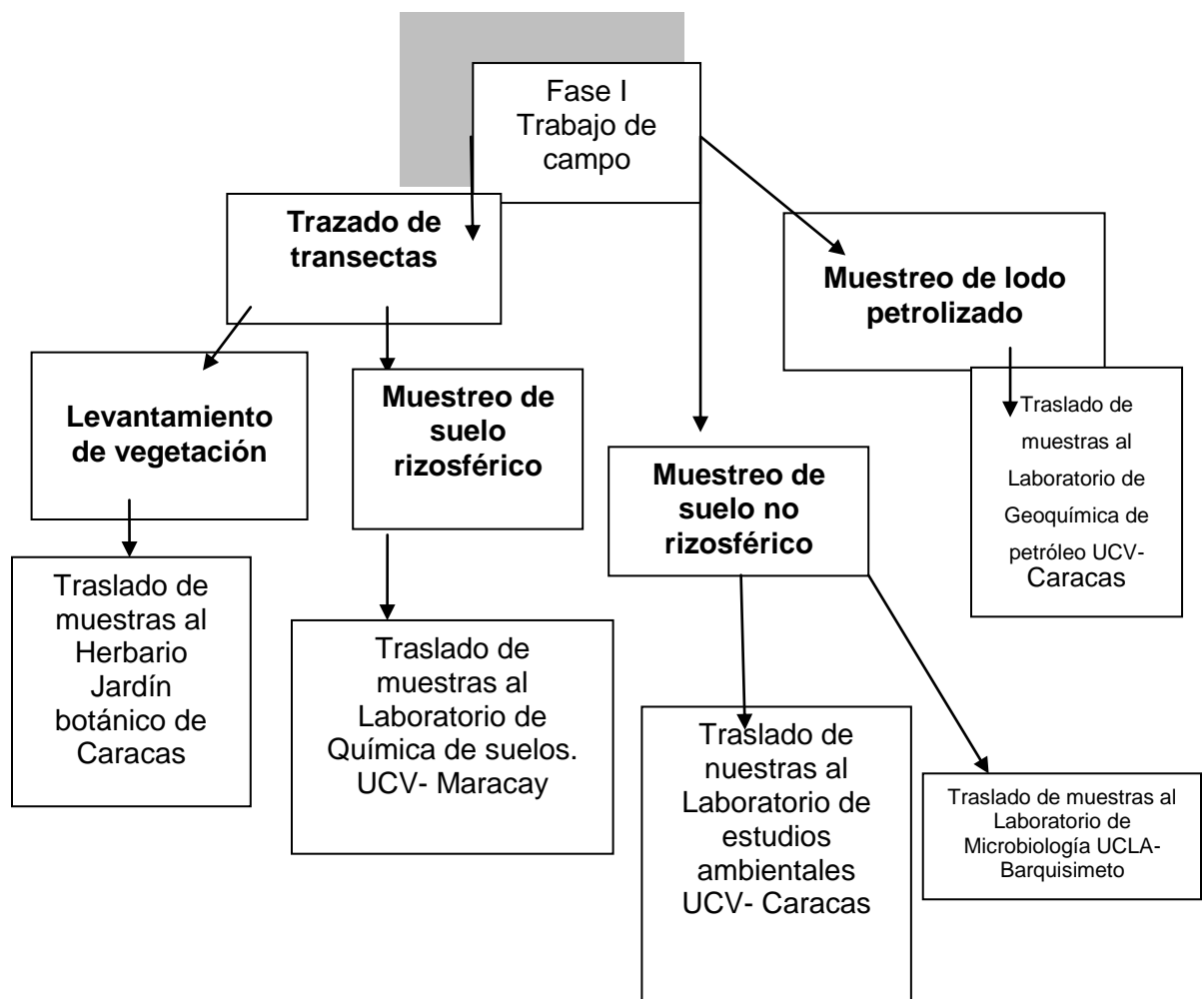


Figura 14. Actividades realizadas durante el trabajo de campo

6.1.1 Muestreos en campo

6.1.1.1 Muestreo de vegetación

El objetivo de este muestreo consistió en obtener información sobre la flora de la Sabana Oriental Venezolana, con capacidad de tolerancia a los contaminantes con petróleo. Al llegar a la fosa la Caracola, se recorrió un área aledaña de 3000m², realizando el muestreo de vegetación por el método de las líneas de intercepción, el cual se basa en el principio de la reducción de una transecta a una línea, y se emplea para estudiar la vegetación densa dominada por arbustos. Una transecta es un rectángulo situado en un lugar para medir ciertos parámetros de vegetación como altura y frecuencia, entre otros (Matteucci, 1982). (Figura 15).

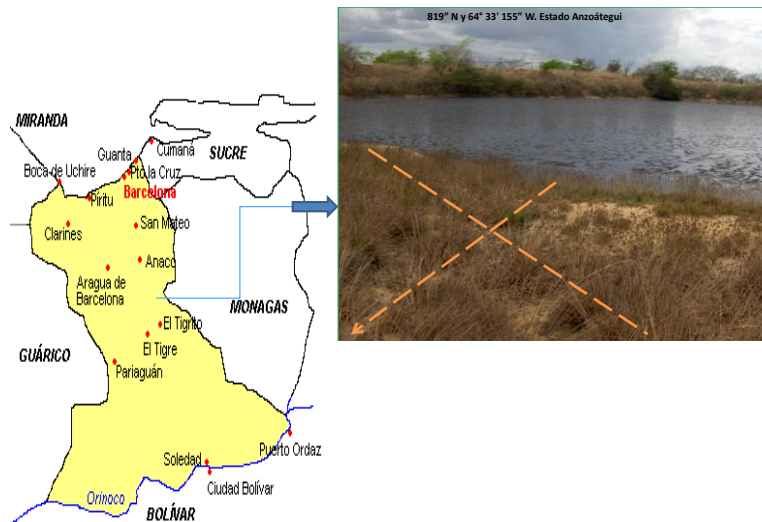


Figura 15. Ubicación de la fosa la Caracola.

En cada punto de muestreo bajo la transecta, se extrajo la (s) especie vegetal completa (parte aérea y sistema radical), así mismo como sus semillas en caso de poseerlas. En ausencia de plantas sobre el punto de muestreo, la toma se trasladaba al sitio más cercano a él. Una vez obtenida la muestra botánica, la parte aérea se colocó en una “prensa botánica”, para su conservación e identificación posterior.

Para la recolección vegetal, se requirió del siguiente material: prensa botánica, cartón corrugado, papel periódico, machete, tijeras, cuaderno de notas y lápiz. Se procedió a levantar dos transectas de 60m c/u, una perpendicular a la otra, con puntos de muestreo cada 5 metros. Por cada punto de muestreo, el vástago de la planta fue colectado y colocado en la mitad de una hoja de papel periódico, acomodando las hojas con el haz hacia

arriba y otras con el envés visible, y se anotaron los datos correspondientes al posible nombre, género o familia, para su secado, y posterior identificación científica.

Las semillas se conservaron en bolsas de papel debidamente rotuladas y cerreadas para sus posteriores pruebas de germinación.

6.1.1.2 Muestreos de suelo

6.1.1.2.1 Muestreo de suelo rizosférico

Para la toma de las muestras del suelo rizosférico de cada planta sobre la transecta, se procedió a limpiar la superficie de cada punto, y se inició la recolección del suelo en contacto con la raíz, conformando un total aproximado de 200-400g por planta. Seguidamente las muestras fueron colocadas en bolsas plásticas con cierre e identificadas debidamente para su traslado a los respectivos laboratorios para evidenciar la presencia y número de esporas de hongos Glomeromycota, y estimar las poblaciones de bacterias y hongos asociados a la raíz.

6.1.1.2.2 Muestreo de suelo no rizosférico

Con la intención de practicar posteriormente los respectivos análisis químicos, se efectuó un muestreo aleatorizado simple del suelo en toda el área bajo estudio, para lo cual se colectó un total de 3kg, haciendo recorridos en

forma de zig-zag, donde por cada 15 m. se tomó una sub muestra con un palin, previa limpieza de la superficie del terreno. Las 10 sub muestras fueron extraídas a una profundidad de 30 cm, y se depositaron en un recipiente para mezclarlas uniformemente, de donde se tomó 1kg correctamente rotulado y almacenado para su traslado al laboratorio de química de suelos de la UCV-Maracay. Adicionalmente, se colectó un total de 450 kg de este suelo, distribuidos en 15 sacos con capacidad de 30kg, para el posterior montaje del experimento en invernadero.

6.1.1.3 Muestreo del lodo petrolizado

La recolección de la muestra de lodo petrolizado, se realizó de acuerdo al muestreo aleatorio simple, y a una profundidad de 0-30 cm aproximadamente según EISOPQAM (2001). Este muestreo se caracteriza porque cualquier punto de muestreo presenta la misma probabilidad de ser seleccionado que los restantes puntos. Por tanto, al aplicar este procedimiento a un sitio potencialmente contaminado para obtener “n” muestras, cualquier combinación de “n” muestras, tiene la misma probabilidad de ser seleccionada. En consecuencia, el número de combinaciones posibles estaría determinado por el tamaño de la muestra. El objetivo de este muestreo fue la recolección física de una porción representativa del área para conocer sus características químicas (Figura anexa i). Tomada la muestra se trasladó al laboratorio de Geoquímica de petróleo UCV- Caracas, para su análisis.

6.2 Fase II. Ensayos preliminares

Con la finalidad de obtener datos que permitieran dar curso a la tercera fase de la investigación, se procesó la información y material extraído del campo. En la figura 16, se resumen las actividades realizadas durante esta fase.

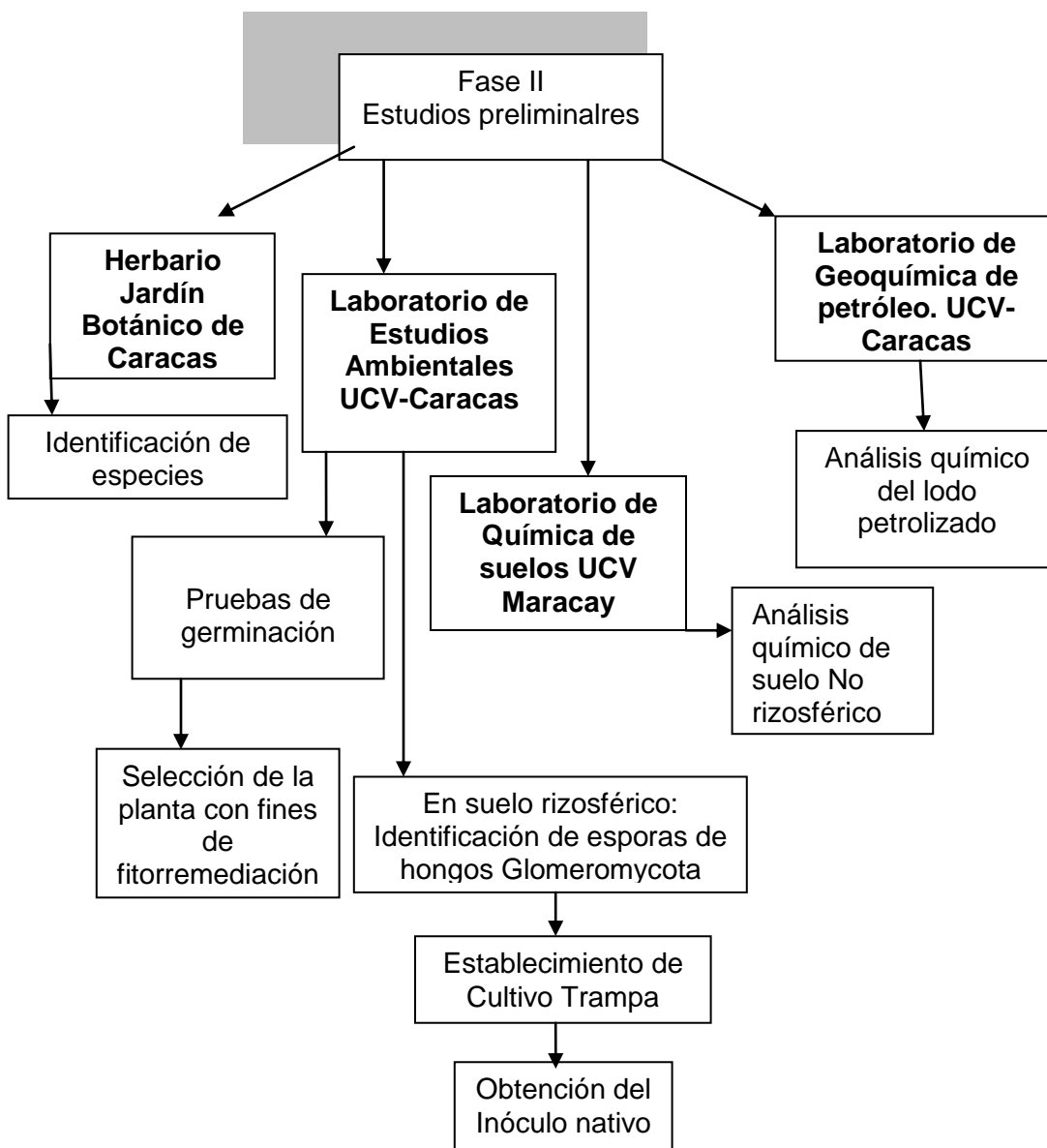


Figura 16. Actividades desarrolladas durante la fase preliminar

6.2.1 Estudios de vegetación

Para ello se colectaron y prensaron en campo las especies vegetales las cuales se secaron a temperatura ambiente durante un mes aproximadamente, para su posterior identificación en el Herbario del Jardín Botánico de Caracas, con el uso de la clave de Badillo y Schee (1965) y el manual de plantas comunes en Venezuela de Pittier (1978) y Schenee (1984).

6.2.2 Selección de las plantas con potencial Fitorremediador

La aplicación de la fitorremediación como técnica en áreas contaminadas requiere principalmente, que el crecimiento de las plantas no se vea afectados por la presencia del contaminante, razón por la cual es importante conocer el efecto tóxico del contaminante en la especie utilizada para fitorremediación, antes de realizar el experimento a escala de campo.

Para la selección de las especies vegetales con fines de fitorremediación, se tomaron en cuenta el criterios el utilizado por Merkl *et al.*, (2004), basado en las características morfológicas y formas de propagación (producción de semilla, porcentaje de germinación y establecimiento de las plantas en el semillero), y los criterios, empleados por USEPA (United States Environmental Protection Agency), que establece que las plantas pueden seleccionarse de las especies ya existentes en el sitio contaminado, de las

especies nativas de la región, de las especies reportadas como fitorremediadoras, y/o de híbridos o especies genéticamente manipuladas.

Para cumplir tal labor, se llevaron a cabo pruebas de germinación de las semillas colectadas (Figura 17).



Figura 17. Esquema general de trabajo para la selección de plantas con potencial fitorremediador.

Las pruebas de germinación se efectuaron con el objeto de evaluar previo a la siembra, la viabilidad de las semillas colectadas. En bandejas con papel absorbente, embebidas en agua destilada, se situaron 100 semillas correspondiendo cada una de ellas a cada especie recolectada. Todas las bandejas se colocaron a una temperatura ambiente en el laboratorio de Estudios Ambientales del Instituto de Zoología y Ecología Tropical y se observaron durante un lapso aproximado de 1 semana a 3 meses,

dependiendo de la especie. Al final del período de observación se registró el tiempo transcurrido para la germinación y se estimó el número de semillas germinadas por la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de germinación} = \left(\frac{\text{semillas germinadas}}{\text{numero total de semillas en prueba}} \right) \times 100$$

6.2.3 Aislamiento e identificación de morfotipos de Glomeromycota

Se inició con el procesamiento de las muestras de suelo rizosférico colectadas en cada punto de muestreo. Para ello, se obtuvo una porción de 50 g del suelo homogéneamente mezclada. El proceso se basó en la metodología de Gerdermann y Nicolson (1963), modificada por Sieverding (1991). Esta metodología se fundamenta en el lavado de la muestra de suelo, haciéndola pasar a través de una batería de tamices: uno de 500 μm colocado en la parte superior para retener el material orgánico, y otros de 38,45, o 53 μm colocados en la parte inferior, los cuales capturan la mayoría de las esporas. Posteriormente se emplea un gradiente de densidad de 20 y 60% y centrifugación a 3500 rpm para observar las esporas bajo la lupa. Del sobrenadante, se eligieron los morfotipos en buen estado (esporas vivas y turgentes), y se ubicaron en cajas de petri rotuladas, contentivas de un papel

de filtro para conservarlas durante un lapso no mayor de un mes en la nevera a 4°C, hasta su incorporación en la planta trampa.

Para la identificación de los hongos Glomeromycota, esporas extraídas del procedimiento anterior, se montaron sobre láminas porta objeto a las cuales se le ubicó previamente una gota de alcohol polivinílico y ácido láctico glicerol (PVLG) o PVLG con reactivo Melzer (1:1 v/v), se colocó el cubreobjeto en ángulo de 45°, y se aplicó una ligera presión sobre el cubreobjeto, para romper levemente las esporas. Finalmente se sellaron por los bordes del cubreobjeto con esmalte para uñas transparente, y se dejaron secar a temperatura ambiente durante 24 horas.

Transcurrido el tiempo anteriormente señalado, se procedió a la observación, digitalización y toma de medidas de las esporas con un microscopio óptico marca National DC3-163, con una cámara incorporada y acoplada a un computador con software Motic Imagen Plus 2.0. Todas las observaciones fueron realizadas con una magnificación de 40X, y las medidas del diámetro ecuatorial y polar de las esporas se efectuaron con el programa Image J1.44. Para esto último, se calibró la escala correspondiente para transformar las medidas expresadas de pixeles a micrómetro.

La identificación de las esporas se basó en características morfológicas: forma, color, contenido, unión hifal y tipos de paredes o grupos de paredes,

además el tipo de las ornamentaciones, color de las esporas y la carta de color del INVAM (2013).

6.2.4 Obtención del inóculo de hongos Glomeromycota nativos.

Un inóculo es definido como un producto biológico (líquido o sólido) que facilita la introducción de propágulos de microorganismos a un medio, y cuyas actividades fisiológicas auxilian el crecimiento y desarrollo de las plantas (De la Rosa *et al.*, 2012).

Debido a que con frecuencia las poblaciones naturales de hongos micorrizógenos son insuficientes o ineficientes para el establecimiento de una buena simbiosis, es necesario evaluar su potencial con fines de aplicación. Esta parte del estudio se llevó a cabo durante año y medio, y se dividió en dos etapas: la primera, que consistió en el aislamiento e identificación de morfotipos de los hongos Glomeromycota (explicada anteriormente), y la segunda, en el establecimiento de los cultivos trampa. Para la conformación de éstos últimos, se utilizaron plantas micótrofas (dependientes de las micorrizas para su crecimiento), en un suelo esterilizado libre de contaminantes.

Este sistema, permite multiplicar hongos nativos colectados en el campo y amplificar así la cantidad de esporas o promover la esporulación de los hongos escondidos en la muestra, razón por la cual esta metodología es importante, pues permite obtener esporas en todos los estadios de desarrollo y

con todos los atributos morfológicos necesarios para su identificación (Sieverding, 1991) (Figura 18).



Figura 18. Esquema de trabajo para la elaboración del inóculo nativo.

Fuente: Diseño propio

En este ensayo se utilizaron como plantas “trampa” el sorgo (*Sorghum Bicolor* L Moench) y el pasto *Brachiaria decumbens*. El sustrato empleado para el cultivo de las plantas trampa fue arena esterilizada en autoclave a razón 3 veces en intervalos de 24 horas.

Para iniciar el cultivo de las “plantas trampa” se emplearon 20 recipientes de plásticos de 100 g de capacidad, contentivos de arena estéril, a los cuales se trasplantaron dos semillas pre germinadas por recipiente, se ubicaron al azar sobre un meson dentro del vivero del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la UCV- Caracas, donde recibieron riego semanal, y fertilizaron con 10 ml solución de Christine Hepper y O’Shea (1984) (tabla anexa i).

Las plantas se mantuvieron por un período de 4-6 meses, luego del cual se dejaron secar, para estimular la esporulación del hongo en la raíz de la planta. Transcurrido el tiempo anteriormente señalado, se evaluó la calidad del inóculo por el método de tamizado y decantación Gerdermann y Nicolson (1963), modificado por Sieverding (1991), el cual fue descrito anteriormente durante la identificación de las esporas.

6.2.5 Análisis químico del lodo petrolizado

Se llevó a cabo Laboratorio de Geoquímica de Petróleo del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la UCV- Caracas, donde se procedió a estimar el grado de meteorización del hidrocarburo, a través del análisis de su proporción de hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), y contenido de saturados por cromatografía de gases acoplado a

masas (CG-EM). Este análisis comprende un fraccionamiento, seguido o no, de una cuantificación de cada fracción obtenida.

En base al método 3540 (USEPA, 1996), 2 g de la muestra de lodo petrolizado por duplicado, se tomaron al azar para su análisis SARA (Saturados, Aromáticos, Resinas, Asfaltenos). Previo al mismo, se eliminó el contenido de agua y sedimentos, agregando tolueno en proporción 1:1 y centrifugando a 1500rpm durante media hora. Seguidamente la solución de lodo se sometió a rotoevaporación al vacío a una temperatura de 70°C, para recuperar el tolueno y obtener el crudo limpio. A partir del crudo limpio, se obtuvieron 2 fracciones; la soluble en n- heptano (maltenos) y la insoluble (asfaltenos).

Empleando la técnica de cromatografía líquida en columna de alúmina, a partir de la fracción de maltenos se separaron las diferentes fracciones eluyendo con, n-hexano la fracción de hidrocarburos saturados, tolueno los hidrocarburos aromáticos y con una mezcla de tolueno más metanol en proporción 70:30 la resinas, de acuerdo al siguiente esquema (Figura 19)

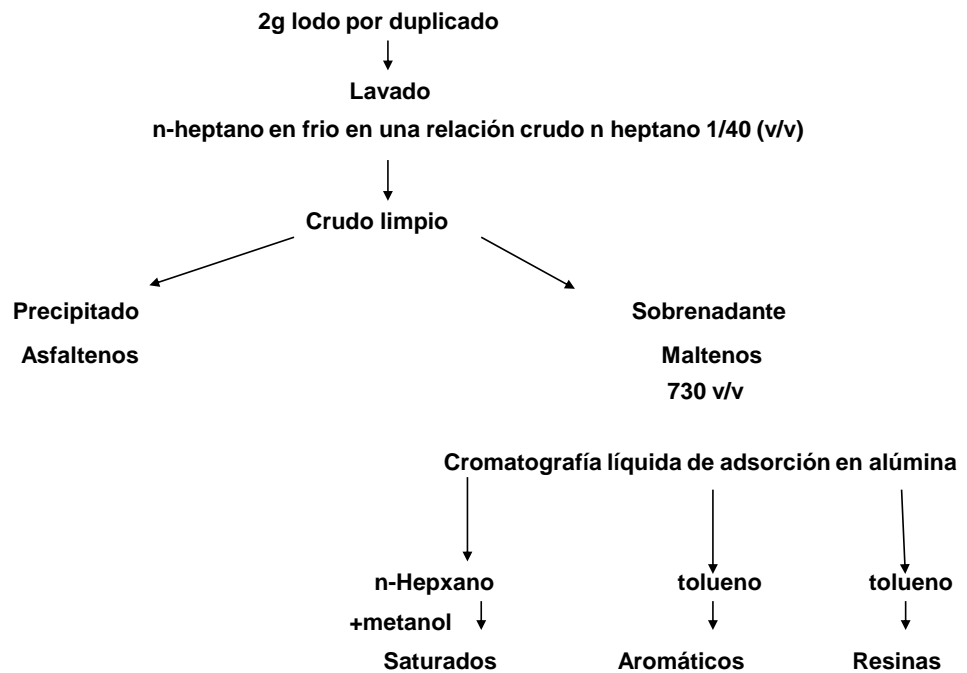


Figura 19. Análisis SARA de la fosa la Caracola

Fuente: Elaboración propia

En base a la metodología de Peters *et al.*, (2005), a través del estudio de los biomarcadores, los hidrocarburos saturados fueron analizados por cromatografía de gases acoplado a masas (CG-EM), utilizando un equipo Agilent Technologies (6890 N) acoplado a un espectrómetro de masas MS Agilent (5973 Network Mass Selective Detector).

6.2.6 Análisis químico del suelo no rizosférico

Para el análisis químico de la muestra de suelo, un kg de suelo fue trasladado al Laboratorio General de suelos del Instituto de edafología UCV-Maracay, donde se le determinó su pH por método potenciométrico, la cantidad de materia orgánica (%) por la metodología Walkley y Black (1934), CIC ($\text{cmol}^{(+)} \text{kg}^{-1}$) por el método con acetato de amonio, el Nitrógeno según Kjeldahl y el fósforo disponible por extracción con NaHCO_3 0,5M a pH 8,5 (Olsen y Sommers, 1987), la salinidad en agua, y metales pesados (cadmio, níquel, plomo, y cromo), por el método con extracción ácida y posterior espectrofotometría de absorción atómica.

6.3 Fase III. Ejecución y análisis

Esta fase de la investigación se llevó a cabo a su vez en dos partes: Una de invernadero (figura anexa ii), donde se conformaron y designaron los tratamientos, se aplicó el manejo agronómico y se procedió al estudio y medición de las variables seleccionadas. La otra parte, se cumplió en laboratorios en los cuales se practicaron las determinaciones químicas y microbiológicas que conllevaron al análisis estadístico final de la prueba y a las conclusiones. La figura 20, resume las actividades cumplidas durante esta fase.

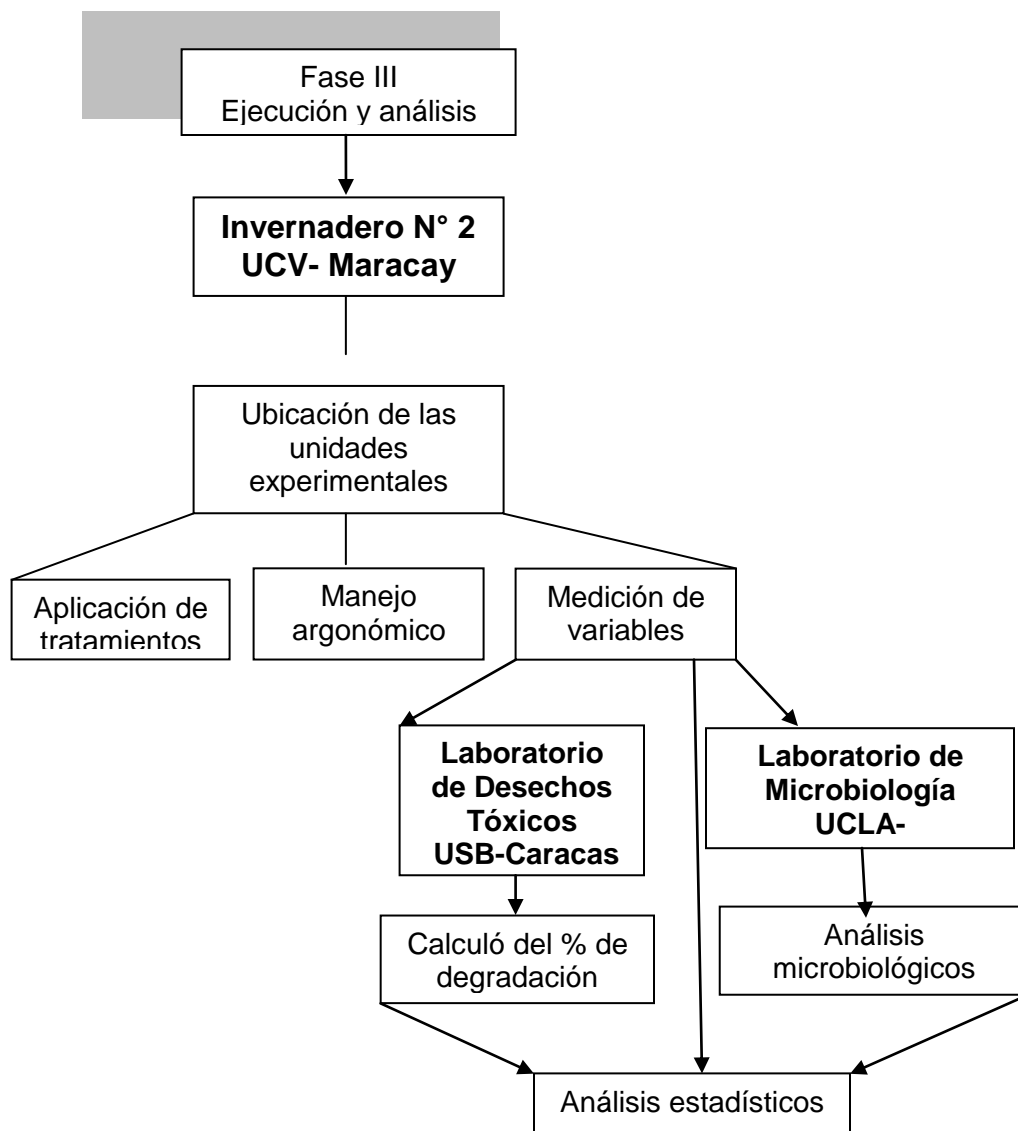


Figura 20. Actividades desarrolladas durante la fase de ejecución y análisis.

6.3.1 Localización de la investigación

La instalación del experimento fue en el Invernadero N° 2 del Postgrado de Ciencia del suelo UCV- Maracay- Venezuela, cuya ubicación geográfica es longitud O: 67° 36' 00", latitud N 10° 15' 00". Las condiciones microclimáticas promedio mensual del mismo fueron: temperatura 37 °C, luminosidad de 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ y humedad relativa de 75%.

6.3.2 Material biológico utilizado

Se utilizaron dos inóculos de hongos Glomeromycota: uno mixto nativo elaborado a base de esporas de la zona impactada con petróleo, y otro de colección viva. Este último estaba conformado por un cultivo de *Acaulospora mellea*, proveniente de suelos de sabana del estado Guárico preservado en el Laboratorio de Estudios Ambientales del Instituto de Zoología y Ecología Tropical- Caracas, bajo la dirección y coordinación de la Dra. Marcia Toro. La especie *A. mellea* fue reportada como una de las especies de hongos Glomeromycota predominante en los suelos de sabanas del Estado Guárico (Toro, 2007).

La utilización del inóculo mixto, se basó en la necesidad de evaluar el comportamiento de posibles consorcios de esporas de hongos Glomeromycota, adaptadas al ecosistema impactado por petróleo, a fin de

validarlo. Por otro lado, se consideró evaluar la eficiencia del inóculo de colección a base de *Acaulospora mellea* bajo condiciones de contaminación.

Para el experimento se utilizaron dos especies de plantas con potencial fitorremediador: *Brachiaria brizantha* cv. Marandu de la familia *Poaceae*, y *Acacia macracantha* var. glabrens Eggers de la familia *Fabaceae*, ambas seleccionadas de acuerdo a criterios señalados más adelante.

6.3.3 Diseño experimental

La investigación fue conducida utilizando un diseño completamente aleatorizado, y en base a los supuestos del ANOVA se localizó en una estructura controlada (invernadero), minimizando el efecto de agentes externos, se aleatorizaron los tratamientos al aplicarlos, y se estableció un número suficiente de repeticiones.

Se compararon 12 tratamientos con ocho repeticiones para un total de 96 unidades experimentales, en las cuales se ubicó la combinación de las dos especies de plantas bajo estudio, con los dos tipos de inóculos y el suelo contaminado artificialmente o no al 4% de concentración de lodo petrolizado.

Las unidades experimentales estaban representadas por microcosmos, con una capacidad de 3 kg, donde fue colocado el suelo no contaminado proveniente de las adyacencias de la fosa bajo estudio y el cual

posteriormente se aplicaron los tratamientos. Estos microcosmos son contenedores donde se establecen modelos con múltiples componentes, los cuales permiten simular y comprender las relaciones que se establecen entre las poblaciones microbianas en la rizósfera, así como la función de éstas en el ecosistema cuando tiene lugar un suceso de contaminación. Estos sistemas, además de los resultados cualitativos, permiten obtener resultados cuantitativos respecto al comportamiento del contaminante en el medio (Infante, 2007).

6.3.4 Análisis estadísticos

El análisis de datos para todo el experimento fue realizado con el programa estadístico InfoStat 1.1 para Windows. Diseño completamente al azar; con arreglos de tratamientos factorial 2x3 un factor a 2 niveles (suelo contaminado y sin contaminación) y otro a 3 niveles (sin inóculo, con inóculo nativo y *A. mellea*).

Luego del ANOVA, se aplicó la prueba de Duncan para separar las medias, en los casos con diferencias estadísticamente significativas, dicha prueba se realizó al 0,05 de probabilidad, es decir al 95% de confiabilidad. Esta prueba es conveniente aplicarla cuando los tamaños de las muestras son iguales y los tratamientos pueden ordenarse de manera ascendente o descendente en una escala no numérica (Chacín, 2000)..

6.3.5 Tratamientos aplicados

Como ya se mencionó anteriormente, a los 96 microcosmos se les asignó al azar los respectivos tratatamientos con sus repeticiones, conformando las unidades experimentales de este estudio (tabla 2).

Tabla 2. Descripción de tratamientos

Planta	Contaminación	Inoculación	Tratamientos
<i>Brachiaria brizantha</i>	Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	T1
		Con Inóculo Nativo	T3
		Con <i>A. mellea</i>	T5
	Con Hidrocarburo	Sin inóculo	T2
		Con Inóculo Nativo	T4
		Con <i>A. mellea</i>	T6
<i>Acacia macracantha</i>	Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	T7
		Con Inóculo Nativo	T9
		Con <i>A. mellea</i>	T11
	Con Hidrocarburo	Sin inóculo	T8
		Con Inóculo Nativo	T10
		Con <i>A. mellea</i>	T12

Cada microcosmo, se colocó sobre un plato a manera de evitar pérdidas de sustrato. No poseían un sistema de drenaje por lo cual no se presentaron pérdidas significativas de hidrocarburos ni nutrientes, debido a escorrentía o lavado del suelo (Figura 21). Bajo estas condiciones experimentales se considera que existe cierta fotodescomposición del lodo similar a la ocurrida en condiciones de campo, pero no fue cuantificada.



Figura 21. Organización del microcosmo.

Se sembraron cuatro semillas por microcosmo a una profundidad de un centímetro, previa inoculación con hongos Glomeromycota en cantidades de 120 gr de inóculo nativo y 61 gr de inóculo de colección a base de *Acaulospora mellea*, de acuerdo al tratamiento. El número de semillas obedeció a la

necesidad de conservar la réplica de 4 plantas por microcosmo hasta el final del experimento.

Los tratamientos correspondientes a los suelos contaminados, se prepararon aplicando 100gr del lodo petrolizado a 2,5 kg de la cantidad de suelo utilizada, forjando una contaminación del 4%. Esta concentración se estableció en una relación masa (suelo): masa (contaminante), mezclada homogénicamente para proporcionar una distribución uniforme del mismo y humedecida posteriormente (Merkl *et al.*, 2005). El criterio para la selección de la cifra del 4%, se basó en que representa un valor mayor del 1%, la cual es la cantidad tope mínima según la legislación venezolana (Decreto 2.635, República de Venezuela 1998); constituye una cifra por debajo del 5% no tóxica, aceptada en Venezuela y en el trópico (Infante *et al.*, 2010), y se encuentra entre los valores del 3 y 5 %, probados por Hernández y Mager (2003) y Brand *et al.*, (2006), respectivamente.

La figura 22, esquematiza las actividades implicadas en la conformación y aplicación de los tratamientos.

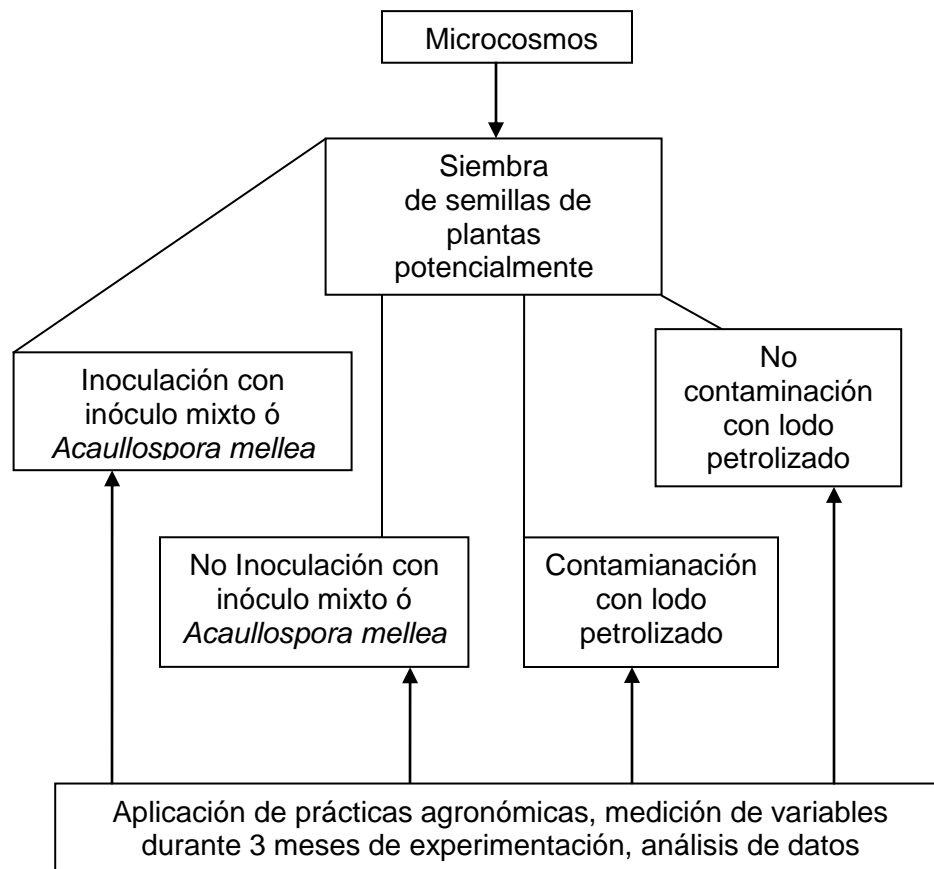


Figura 22. Actividades implicadas en la aplicación de los tratamientos

6.3.6 Manejo agronómico

Para mantener el suelo de los microcosmos a capacidad de campo y evitar su desecación, se hicieron riegos controlados con agua destilada cada 2 días.

Debido a que la capacidad de campo representa la capacidad máxima de retención de agua en el suelo, su valor tiene importancia para apreciar cuanto pueden durar las reservas de agua del suelo antes de requerir nuevos aportes de agua de riego, además es uno de los valores que determina la cantidad de agua del suelo aprovechable por las plantas (Pla, 1983). Se obtuvo saturando 3 muestras de suelo no rizosférico, sometidas a diferentes presiones, de acuerdo a los cálculos (Figura anexa iii y tabla anexa ii).

La fertilización se realizó con la solución nutritiva completa de Christine Hepper y O'Shea (1984), a razón de 33 ml. por microcosmo mensualmente a partir del primer mes. Esta solución fue reducida a 1/5 de aplicación de la cantidad de fósforo, a fin de favorecer el establecimiento de la simbiosis micorrizica.

6.3.7 Variables medidas

6.3.7.1 Altura de planta: a 4 plantas por cada tratamiento y por repetición, se les midió semanalmente su altura con una cinta métrica hasta completar los 3

meses. Esta variable está referida a la longitud alcanzada por el tallo principal, en el caso de las gramíneas, y en el caso de las leguminosas hasta la parte apical de la planta.

6.3.7.2 Peso seco de planta: transcurridos un período de 3 meses, se procedió a cuantificar el peso seco (PS) de 4 plantas por cada tratamiento y por repetición, para lo cual fueron retiradas de los respectivos microcosmos, la parte aérea o vástago y el sistema radical. Dichas muestras fueron colocadas en bolsas de papel e identificadas debidamente para someterlas a estufa a 70°C por 3 días y luego pesadas para determinar su PS. El peso fue obtenido con una balanza electrónica modelo VP.302 de capacidad 500g.

6.3.7.3 Porcentaje de colonización micorrízica:

Con el sistema radical derivado de las muestras anteriormente pesadas se calculó el porcentaje de colonización micorrízica. Utilizando la metodología de Phillips y Hayman (1970), se procesaron las raíces aplicando en primer lugar abundante agua corriente para asearlas, cubriéndolas luego con solución de KOH al 10% y puestas al baño de María (90°C) durante 10 a 15 minutos. Fueron lavadas nuevamente con agua corriente, acidificadas en una solución de HCL al 1N durante 10 minutos. Decantado el HCL, finalmente se les adicionó el colorante azul de Tripán al 0.05%.

Con el método de intersección de cuadrantes de Giovannetti y Mosse (1980), se contabilizó el porcentaje de colonización, empleando una caja de petri previamente marcada con una red de líneas verticales y horizontales formando cuadrados de 1 cm de lado. Seguidamente con la ayuda de agujas de disección, se distribuyó de manera aleatoria fragmentos de raíces de más o menos un cm. de longitud y se contaron bajo microscopio, tomando en cuenta los siguientes criterios: a) Si la raíz está exactamente sobre una línea, se cuentan como dos intersecciones. b) Si la raíz toca la línea en un solo punto, se cuenta como una intersección. Debiéndose cuantificar todas las intersecciones, el % colonización se calculó según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de raíces colonizadas} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de intersecciones}}{\text{N}^\circ \text{ de intersecciones totales}} \times 100$$

6.3.8 Análisis de las poblaciones microbianas.

El conocimiento de la composición de la comunidad microbiológica de la rizósfera tiene gran significancia para comprender la dinámica de las interacciones con la vegetación, e inferir acerca del posible efecto micorrizosférico de los hongos Glomeromycota en la remediación del suelo impactado con lodo petrolizado.

A este respecto, finalizado el período de experimentación (3 meses), a cuatro plantas por tratamiento y repetición, se les recolectó todo el suelo

rizosférico posible (porción de suelo adherida a la raíz 2- 3mm), y preservó en nevera a 4°C en una bolsa rotulada con cierre hermético.

Estos análisis se realizaron en el laboratorio de Microbiología del Decanato de Agronomía- UCLA Barquisimeto.

6.3.8.1 Aislamiento y estimación de las poblaciones de aerobios heterótrofos

Para la determinación de microorganismos heterótrofos totales se seleccionó la técnica del conteo de microorganismos viables por dilución en placas propuesta por Clark (1965), la cual permite determinar el potencial de biodegradación de un suelo contaminado.

Es un método simple, rápido y aún vigente para la calcular con cierta aproximación células microbianas en el suelo. Se fundamenta en que cualquier célula viable inoculada en un medio de cultivo se multiplica y produce datos de fácil identificación, como la formación de colonias en placas de agar.

Consiste en la preparación de una serie de diluciones de una muestra de suelo en un diluyente apropiado, esparciendo una alícuota de una dilución sobre la superficie de un medio de cultivo sólido e incubando la placa bajo condiciones ambientales controladas. La dilución debe permitir generar colonias separadas, donde cada una puede proceder de una sola célula o de

una agrupación unidad viable, la cual se contará como una bacteria. Bajo este fundamento, estas placas pueden ser usadas no sólo para el conteo de poblaciones microbianas, sino también para el aislamiento de organismos.

De cada tratamiento anteriormente descrito se tomó una muestra compuesta de 10 gr de suelo (1,25 c/microcosmo) y se aplicaron los siguientes pasos.

1) En condiciones estériles, se adicionó el suelo a una botella de dilución con rosca, contentiva de 90 ml de solución peptonada estéril (dilución 10^{-2}) y se homogeneizó vigorosamente durante 5 minutos.

2) De la solución anterior transfirió un 10 ml a otra botella con 90 ml de solución salina estéril (dilución 10^{-3}). De ahí se hicieron diluciones sucesivas hasta completar diluciones decimales hasta 10^{-5} . Se agitó de forma constante con vórtex en cada paso durante 5 minutos.

3) Se tomó 0.1 ml de la dilución seleccionada y colocó en el centro de la placa de agar (siembra en superficie). Esto por triplicado y con las tres diluciones próximas 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} .

4) Se extendió la alícuota en la superficie de la placa con una varilla de vidrio previamente esterilizada (inmersa en alcohol y pasándola por la flama del mechero permitiendo su enfriamiento).

5) Se incubaron las placas de forma invertida a 30°C en una estufa, en ausencia de luz, con agar nutritivo para el conteo de bacterias, y agar papa dextrosa para los hongos.

6) Después de un periodo de incubación (de 3 a 7 días, dependiendo del tipo de microorganismo), se contó el número de unidades formadoras de colonias viables (UFCV/ g de suelo).

Para la identificación de bacterias se siguió el protocolo de Schaad y Chun (1980), basado en el uso de pruebas convencionales básicas para determinar el género y la especie. Estos son estudios simples que se han desarrollado para demostrar en forma clara características bioquímicas como presencia o ausencia de enzimas, grupo de enzimas, vías metabólicas, factores de crecimiento, presencia de inhibidores, etc.

Las pruebas convencionales básicas aplicadas fueron: tinción Gram, reacción al KOH 3%, tinción Rojo Congo, medio Hugh y leifson, YDC, KB, Medio DI y D3, Medio de Kado y Hesktt, Arginina dihidrolasa, crecimiento a 40°C. Aplicadas las pruebas en forma secuencial, se utilizó la clave para la identificación.

La identificación de los hongos filamentosos se basó en el examen macroscópico de la colonia y en sus características microscópicas, semejanzas macroscópicas como la forma de la colonia, el color de la

superficie, la textura y la producción de pigmentos. La caracterización definitiva se basó en la forma típica, método de producción y ordenamiento de las esporas, siendo también importante conocer el tamaño y la disposición de las hifas (Schaad y Chun, 1980).

Además de tener un estimado de las poblaciones de microorganismos presentes en el suelo rizosférico y no rizosférico, se consideró importante discriminar y estimar las poblaciones microbianas capaces de utilizar el lodo petrolizado como única fuente de carbono y energía, para lo cual se utilizaron dos metodologías; el método de las diluciones y siembra en placa, partiendo de suelo contaminado artificialmente con lodo petrolizado al 4%, y el método de enriquecimiento con lodo petrolizado al término del 4%.

6.3.8.2 Aislamiento y estimación de microorganismos con potencialidad biorremedora de lodo petrolizado.

De todos los microorganismos presentes en un suelo contaminado con petróleo, sólo un grupo especializado de ellos son capaces de utilizarlo como fuente carbonada principal, constituyendo entonces agentes primarios de su degradación y elementos importantes en el saneamiento biológico de suelos afectados con hidrocarburos. Razón que hace obligante su estudio y conocimiento para su ulterior uso como arma de la biorremediación.

Existe un sin número de métodos a través de los cuales se pueden aislar e identificar microorganismos biodegradadores de petróleo, sin embargo, la mayoría de ellos son onerosos, poco accesibles y engorrosos, debido a que están supeditados a la naturaleza, complejidad química del contaminante, a la disponibilidad de solventes y a la utilización de equipos sofisticados de alto costo. No obstante, en la presente investigación se utilizaron dos métodos, que si bien no son precisos como los métodos moleculares, tienen la ventaja de ser mucho más accesibles, aplicables y económicos.

Estos son; el método de las diluciones partiendo de un suelo contaminado previamente y el método de enriquecimiento con el contaminante, los cuales son modificaciones de los métodos tradicionales.

6.3.8.2.1 Método de recuento en placa partiendo de suelo contaminado con lodo petrolizado al 4%.

Partiendo de las diluciones derivadas de la metodología anterior, pero empleando los tratamientos contaminados con lodo petrolizado, se sembró la alícuota sobre medio agar lodo petrolizado al 4%.

Posteriormente se llevaron a incubar en estufa a 30°C de 24 horas a 15 días para observar el crecimiento de las colonias. Para el contéo se dicriminaron por cada caja de Petri las colonias de hongos y bacterias.

6.3.8.2.2 Método de enriquecimiento hasta el 4%

Estudios realizados sobre adaptación y selección de microorganismos autóctonos a medios de cultivo enriquecidos con petróleo crudo, señalan que aquellos con crecimiento abundante, aislados de suelos contaminados son considerados degradadores de petróleo (Rivera *et al*, 2000). En esta investigación, se fue ajustando la concentración de lodo petrolizado progresivamente hasta lograr una contaminación del 4% como única fuente carbonada.

Para determinar la presencia de microorganismos con posibilidad de degradar lodo petrolizado al 4%, se siguió la metodología utilizada por Aycachi (2008), basada en el enriquecimiento de muestras de suelo y adaptación a concentraciones crecientes del lodo, pero con algunas modificaciones.

Por cada tratamiento contaminado con lodo petrolizado al 4%, e incluyendo un tratamiento testigo, como en la metodología anterior, se procedió a pesar una muestra compuesta de 50 g suelo del microcosmos (6,25 gr c/microcosmo), previamente tamizada, para llevarla hacia un biorreactor de

diseño propio (figura anexa iv), contentivo de 100 ml de caldo Bushnell Hass (BH) con 1% del lodo petrolizado e incubarla a 30 °C durante 72 h.

Luego de las 72h, se tomó 10 ml de la muestra enriquecida al 1%, se llevó hacia un segundo biorreactor contentivo de 100 ml de caldo BH con 2% del lodo petrolero e incubó a 30°C durante 72 h. De este último biorreactor se tomó 10 mL de la muestra enriquecida y se llevó a un nuevo biorreactor contentivo de 100 ml de caldo BH al 4% del lodo petrolizado. Seguidamente se incubó a 30 °C durante 72 h.

A partir de la muestra enriquecida en caldo BH con 4% de lodo petrolizado, se tomó una alícuota de 0,5 ml de cada tratamiento y por triplicado y se sembró por mediante la técnica de agotamiento en placas de petri con agar BH con 4% de lodo petrolizado. Esta técnica se basa en una disminución progresiva y continua del inóculo sobre un medio sólido contenido en una placa de Petri. El objetivo es obtener, a partir de un elevado número de elevado de microorganismos, un número reducido de ellos distribuidas individualmente sobre la superficie de la placa, que permitan su identificación.

Seguidamente, las placas se incubaron en estufa a 30 °C hasta observar evidente desarrollo para su conteo. Se seleccionaron y repicaron las colonias que presentaron la mayor biomasa y mayor rapidez en el crecimiento

en tubos de ensayo contentivos de agar BH con 4% de lodo petrolizado, y se preservaron en nevera a 4°C.

Posteriormente se identificaron los diferentes tipos de microorganismos utilizando distintos test químicos aplicados anteriormente en la identificación de aerobios heterótrofos de acuerdo a Schaad y Chun (1980).

6.3.9 Estimación del proceso de biodegradación

6.3.9.1 Porcentaje de degradación del lodo petrolizado

Tanto el contenido final de aceites y grasas, como el porcentaje de degradación del lodo petrolizado, se determinaron por cuatuplicado al final del ensayo en cada tratamiento contaminado. Para tal efecto, se procesaron muestras compuestas preparadas en base a la mezcla de 6,5g. de suelo de por repetición en cada uno de los tratamiento.

Las muestras fueron refrigeradas a 4°C, hasta su estudio en el Laboratorio de Desechos Tóxicos de la USB- Caracas, donde se realizó el análisis de grasas y aceites totales mediante extracción con diclorometano asistida por ultrasonido. El método de referencia usado fue el SW 846-3550 (Test Methods for Evaluating Solid Waste Physical/Chemical Methods. USEPA (Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos). En:

<http://www.epa.gov> . Este sitio web, ofrece información actualizada relativa a los métodos de prueba para la evaluación de residuos sólidos.

Este método, es el compendio oficial de los métodos analíticos y de muestreo de residuos que han sido evaluados y aprobados para su uso en el cumplimiento de los reglamentos de la RCRA. SW-846, funciona principalmente como un documento de orientación. Cambia con el tiempo a medida que se desarrollan nuevas informaciones y datos, y ha sido emitido por la EPA a partir de 1980. Se encuentra actualmente en su tercera edición. Una copia oficial impresa de SW-846 y la mayoría de sus actualizaciones se pueden comprar al Servicio Nacional de Información Técnica (NTIS).

Para el caso de la República Bolivariana de Venezuela, los niveles permisibles de crudo en un suelo son del 1%, porcentaje tomado como base para medir la eficiencia de degradación de hidrocarburos en esta investigación y asegurar a ciencia cierta, que se cuenta con una verdadera propuesta biotecnológica.

6.3.9.2 Tasa de degradación

En base a los valores de grasas y aceites totales obtenidos, se calculó el % de degradación y se expresó como el cambio en el contenido de crudo (HTP), extraíbles respecto al contenido inicial, al final de tiempo de 3 meses de experimentación.

Tomando como valor inicial 4% de contaminación artificial, se obtuvo el valor neto de la grasa y acetite degradada en cada uno de los tratamientos, mediante la resta del valor de la grasa y aceite inicial (4%), menos los valores de aceites y grasas de c/tratamiento, reportadas por el laboratorio de Desechos Tóxicos de la USB y en base al valor neto, por regla de tres simple se determinó el porcentaje de grasa y aceite degradados.

Los resultados para los diferentes tratamientos, fueron analizados a través de un análisis de varianza, por medio de la prueba de Dunnett's con un nivel de confianza del 95%.

6.3.10 Supervivencia de plantas al impacto del lodo petrolizado

Para determinar la influencia de los diferentes tratamientos sobre la población de plantas tratadas, mensualmente se registraron conteos de los individuos presentes en cada una de las unidades experimentales.

CAPITULO VII

7 RESULTADOS Y DISCUSIONES

7. 1 Fase preliminar

Los estudios de esta fase, permitieron en primer lugar seleccionar a *Brachiaria brizantha* y *Acacia macracantha*, como las especies que se utilizarían para el diseño de los tratamiento de la fase III. En segundo lugar se obtuvo el inóculo que formaría parte de los tratamientos, y por último se logró la caracterización química del lodo petrolizado y del suelo no rizosférico.

7. 1. 1 Estudios de vegetación

Del levantamiento de vegetación realizado en el área afectada con hidrocarburos, se identificaron un total de 8 especies vegetales, las cuales no presentaron ninguna sintomatología aparente de toxicidad por el contaminante al momento del muestreo. Igualmente, fue encontrada una gran predominancia de plantas de las familias Cyperceae y Poaceae a lo largo de las transectas (tabla 3).

De las especies identificadas, *Croton rhannifolius*, fue reportada por Alarcón y Cuenca (2005), en las dunas de la Península de Paraguaná - Venezuela, mientras que la especie *Fimbristylis cymosa*, además de haber

sido localizada en esta área, fue hallada también conjuntamente con las especies de *Andropogon*, *Pappophorum*, *Aristida* y *Cyperus*, en suelos contaminados con petróleo de la sabana oriental de Venezuela por Merkl *et al.*, (2004), situación que da una idea de la capacidad adaptativa de estas plantas y su posible rol en los ecosistemas perturbados.

Tabla 3. Especies vegetales identificadas en la Fosa la Caracola.

N°	Especie	Familia
1	<i>Croton rhannifolius</i> Pax & Hoffm	<i>Euphorbiaceae</i>
2	<i>Fimbristylis cymosa</i> R. Br	<i>Cyperacea</i>
3	<i>Cyperus sp</i>	<i>Cyperaceae</i>
4	<i>Calotropis gigantea</i> (L.) W.T.AITON	<i>Asclepiadaceae</i>
5	<i>Acacia macracantha</i> Willd	<i>Fabacea</i>
6	<i>Andropogon angustatus</i> (J. Presl)	<i>Poacea</i>
7	<i>Pappophorum mucronulatum</i> (Nees) Kuntze	<i>Poaceae</i>
8	<i>Aristida torta</i> (Nees) Kunth	<i>Poaceae</i>

Como puede evidenciarse, la fosa la Caracola presenta un número no muy grande de especies vegetales donde predominan las pertenecientes a las familias *Cyperaceae* y *Poaceae*, seguidas de las *Fabaceae* y otras plantas herbáceas no descritas.

No cabe duda de que estas plantas juegan un papel importante en los ecosistemas perturbados. En el caso de las poáceas tropicales, existe un gran número que han mostrado capacidad adaptativa a suelos contaminados con petróleo y gran exposición de superficie radical bajo estas condiciones, lo cual aporta una mayor degradación de estos elementos (Merkl *et al.*, 2004 ; Merkl *et al.*, 2005).

En relación a las fabáceas, se piensa que éstas tienen ventajas competitivas con relación a las plantas no- fabáceas en los procesos de fitoremediación, debido a su habilidad para captar nitrógeno; ya que las mismas no tienen que competir con microorganismos y otras plantas por los suministros limitados de nitrógeno existentes en los suelos contaminados por petróleo (Lindström *et al.*, 2003), un ejemplo de ello es la Casuarina (*Casuarina equisetifolia*), la cual ha mostrado un 100% de supervivencia con respecto a otras especies forestales, en sitios contaminados por la industria minera (Shanker *et al.* 2005; Sun *et al.*2004).

Para tener un espectro cuantitativo de la conformación vegetal sobre la base total de las especies colectadas, se calculó el valor de la frecuencia (F) de las mismas, el cual es un parámetro de estudio de vegetación, basado en la probabilidad de encontrar dicho atributo, uno o más individuos en una unidad muestral particular (Matteucci y Colma, 1982), y se estima con la siguiente fórmula.

$$\text{Frecuencia} = (\text{N}^\circ \text{ de sp} / \text{N}^\circ \text{ ind totales}) * 100$$

A partir de esta información se logró igualmente precisar cuan abundante son los miembros por familia. (Tabla 4).

Tabla 4. Frecuencia de aparición de especies de plantas en la fosa La Caracola.

Especie		Nº individuos y/o macollas por Sp.	º individuos y/o macollas totales	Frecuencia Sp.
1	<i>Fimbristylis cymosa</i> R. Br	49	75	65.33
22	Cyperus Sp	5	75	6.67
3	<i>Andropogon angustatus</i> (J. Presl)	10	75	13.33

4	<i>Aristida torta</i> (Nees) Kunth	4	75	5.33
5	<i>Acacia macracantha</i> Willd	2	75	2.67
76	<i>Calotropis gigantea</i> (L.) W.T. AITON	1	75	1.33
77	<i>Croton rhannifolius</i> Pax & Hoffm	1	75	1.33
88	<i>Pappophorum mucronulatum</i> (Nees) Kuntze	2	75	2.67

En las dos transectas se midió un total de 75 individuos de 8 especies distintas, siendo la especie con mayor mayor frecuencia de aparición *Fimbristylis cymosa* (65,33%) de la familia *Cyperaceae*, seguida de *Andropogon angustatus* (13,33%) de la familia *Poaceae*. Esto demuestra que las ciperaceas prevalecen sobre las poaceas, lo cual coincide con González (2003), al señalar que las primeras son pioneras, y de amplia distribución en este tipo de hábitat, y con lo reportado por Dezzeo *et al.*, (2008), en cuanto al dominio de las cyperaceas sobre las gramíneas en ambientes perturbados con petróleo.

7.1.2 Selección de plantas con potencial fitorremediador

El criterio inicial para la selección de las especies con potencialidad fitorremediadora de la fosa la Caracola, se basó no tanto en la frecuencia en el campo, sino en su condición inicial de producir semillas, para efectos de ulterior reproducción y multiplicación con fines de fitorremediación.

Las semillas utilizadas para esta prueba fueron de *Andropogon angustatus*, *Pappophorum mucronulatum*, *Callotropis procera*, y *Acacia macracantha*. De estas, la última conocido su problema de latencia, se procedió a la escarificación química, usando ácido sulfúrico concentrado por 30 minutos y lavado posterior con abundante agua destilada. De esta manera se eliminó su dureza y aceleró su proceso de germinación.

El resultado de esta prueba reveló un 0% de germinación en las especies *Andropogon angustatus* y *Pappophorum mucronulatum*, 1% de germinación en *Callotropis procera*, lo que parece indicar que su presencia en campo es producto de su multiplicación asexual. Con *Acacia macracantha* se logró una germinación del 75%.

Se seleccionó *Acacia macracantha*, planta que ha sido ubicada en Venezuela por Valero *et al.*, (2005), en zonas intervenidas en una alta frecuencia (21%), porque además de su elevada fructificación ante la presencia del hidrocarburo, exhibía excelentes parámetros morfométricos en el campo.

El otro criterio de selección empleado fue el aplicado por USEPA (2000), que establece que, las plantas pueden seleccionarse de las especies ya existentes en el sitio contaminado.

Según Gálan y Linares (2008), la descripción de esta planta es la siguiente:

Nombre científico: *Acacia macracantha* var. *glabrens* Eggers

Nombre Común: Cují negro, Cují de jardín, espino

Familia: Fabaceae (Leguminosae)

Tiempo de vida: Perenne

Origen: se encuentra distribuida en centro América hasta el norte de sud América. En Venezuela es uno de los cujies más frecuentes de las zonas secas y cálidas del país desde el nivel del mar hasta más o menos 1500 m

Botánica:

Hojas: compuestas, alternas, bipinnadas con glándulas o nectarios en el raquis, tiene de 10 – 24 pares de foliolos sésiles pequeños oblongos de 1.5 – 3 mm de largo y 0.5 – 1 mm de ancho, estípulas caducas.

Flores: axilares de 1 – 5, en forma de cabezuelas densas amarillo mostaza, de 1 cm insertadas a pedúnculos de 1 a 3 cm, florece de noviembre a febrero.

Fruto: es una vaina algo plana, su tamaño va de 5- 10 cm x 1 cm de ancho; las semillas son cafés oscuras.

Requieren de climas cálidos con alta temperatura y luminosidad.

La otra planta seleccionada con fines de fitorremediación fue *Brachiaria brizantha* cv Marandú, especie que aunque no estaba presente en la zona de muestreo, fue elegida tomando en cuenta el criterio empleado por USEPA (2000), que establece que... “las plantas pueden seleccionarse de las especies ya existentes en el sitio contaminado, y de las especies reportadas como fitorremediadoras”.

En este sentido, Hernandez y Mager (2003), demostraron la capacidad de adaptación de esta especie a condiciones de hidrocarburos livianos, al exhibir una rápida germinación, un activo crecimiento y una baja relación vástago/raíz, mientras que Merkl *et al.*, (2004), la pre seleccionaron entre las especie tropicales para Venezuela para ser empleada en fitorremediación.

Para el caso de este ensayo, se usaron semillas certificadas, provenientes del INIA-Aragua, las cuales manifestaron un 90% de germinación. Brito y Rodella (2002), describen a esta segunda especie como:

Nombre científico: *Brachiaria brizantha* cv Marandú.

Nombre Común: Braquiaria

Familia: Poaceae (Gramíneae)

Tiempo de vida: Pastura permanente (perenne)

Hábito de crecimiento: macoloso

Altura: 1,0 a 1,5 m en promedio

Relación tallo hoja: elevado predominio de hojas

Producción de materia verde:60-70 /ha/año

Origen: es una gramínea tropical permanente originaria de Rodesia, Africa. En la actualidad es uno de los pastos más difundidos y sembrados en Brasil y en la Selva del Perú. Fue introducido masivamente con marcado éxito en la Selva Peruana (Alta y Baja) desde 1986, mediante siembra de semillas Certificadas, y posteriormente por su elevada rusticidad en los valles calurosos de la Costa, en suelos de mediana a baja fertilidad, arenosos o pedregosos y con deficiencia de agua. De muy fácil y económico establecimiento con semilla escarificada de alto valor cultural, es muy apreciado por los ganaderos por su adaptación a diferentes tipos de suelos (incluso pedregosos, arcillosos o arenosos) y climas, alto rendimiento en materia verde y elevado nivel de proteína. Ligeramente macoloso, de mediana resistencia a la sequía, su cobertura casi total del suelo y crecimiento agresivo controlan eficazmente las malezas reduciendo considerablemente el costo de mantenimiento y evitando

la erosión. Sus mínimos requerimientos de agua hacen que permanezca siempre verde. Por su comprobada resistencia al “salivazo” y no ser atacado por las hormigas, se recomienda su establecimiento para reemplazar en forma económica y progresiva pastos de otras especies atacados, diezmados o susceptibles en zonas donde se presentan estas plagas o se observa degradación y enmalezamiento de las pasturas.

Botánica: rizomas cortos y erectos, hojas planas verdes brillantes,

7.1.3 Identificación de las esporas de hongos Glomeromycota.

Como resultado del procesamiento e identificación de las esporas de hongos Glomeromycota, a continuación se describen los morfotipos encontrados en la fosa La Caracola.

Descripción de esporas Glomeromycota de la fosa La Caracola

Morfotipo N°1

Forma: globosa

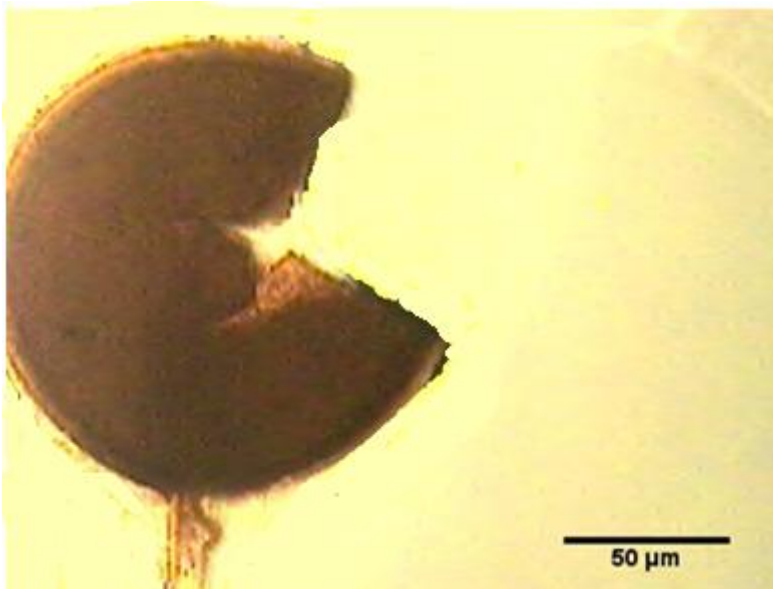
Color (PVLG):marrón oscuro

θ espora (μm):137,623

Espesor pared (μm):6,487

θ hifa (μm):12marrón claro

Posible Género: *Glomus sp 1*



(Objetivo 40X). Figura 23. Morfotipo N°1

Morfotipo 2

Forma: globosa

Color (PVLG): Pardo rojiza

Largo (μm):160

Ancho (μm):85

Espesor pared (μm): 8,35 naraja oscura

θ hifa (μm): 5,52 hialina

Posible género: *Glomus sp 2*

Especie: Características morfológicas similares a *Glomus deforme*.Cuenca *et al.*, (2003).



(Objetivo 40X)

Figura 24. Morfotipo 2

Morfotipo N° 3

Forma:Globosa. Ornamentada

Color (PVLG):marrón claro-amarillento

Hifa : hialina

Posible género: *Glomus sp 3*



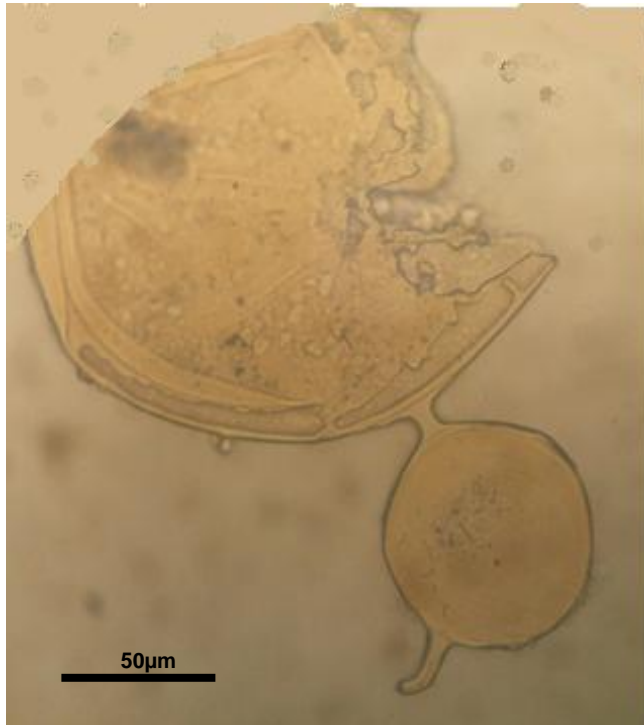
(Objetivo 40X). Figura 25. Morfotipo N° 3

Morfotipo N°4

Forma: ovalada

Color (PVLG): amarillo claro

Posible género: *Acaulospora* (anteriormente *Entrophospora*) (Redecker *et al.* 2013).



(Objetivo 40X)

Figura 26. Morfotipo N°4

Morfotipo N°5

Forma: Sub globosa

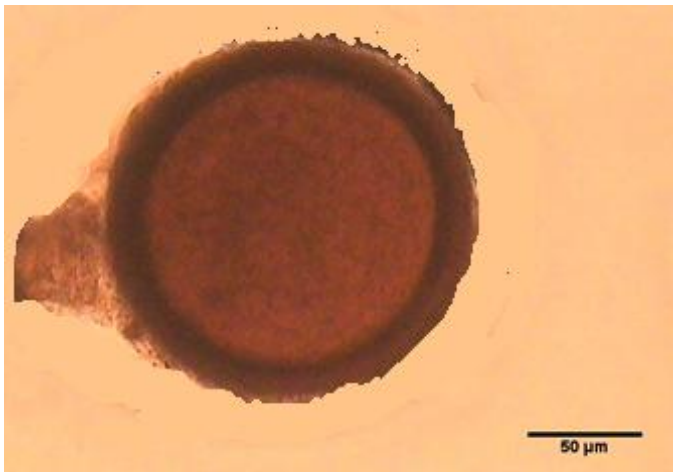
Color (PVLG): pardo rojizo

θ espora (μm): 162,508

Espesor pared (μm): 17,019

θ hifa (μm): 35,668

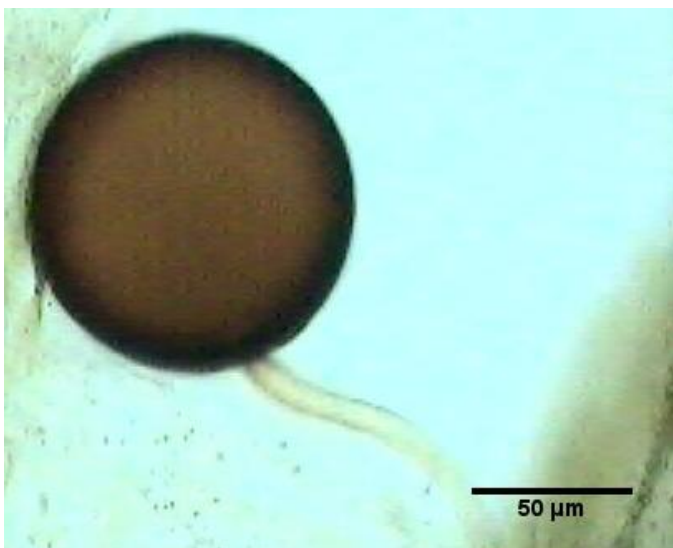
Posible género: *Glomus sp 4*



(Objetivo 40X)
Figura 27. Morfotipo N° 5

Morfotipo N° 6

Forma: globosa
Color (PVLG): marrón oscuro
 θ espora (μm): 121,226. lisa
Espesor pared (μm): 4,189. negra
 θ hifa (μm): 9,367. hialina
Posible género: *Glomus sp 5*



(Objetivo 40X)
Figura 28. Morfotipo N° 6

Morfotipo N° 7

Forma: Globosa

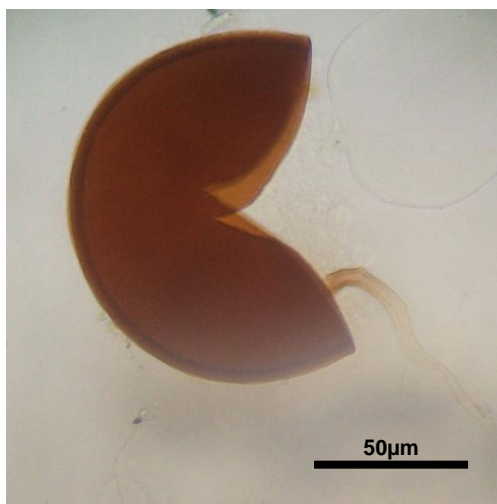
Color (PVLG): Pardo rojizo

θ espora (μm): 163,591

Espesor pared (μm): 5,547

θ hifa (μm): 5,523

Posible género: *Glomus sp 6*



(Objetivo 40X)

Figura 29. Morfotipo N° 7

Morfotipo N° 8

Forma:

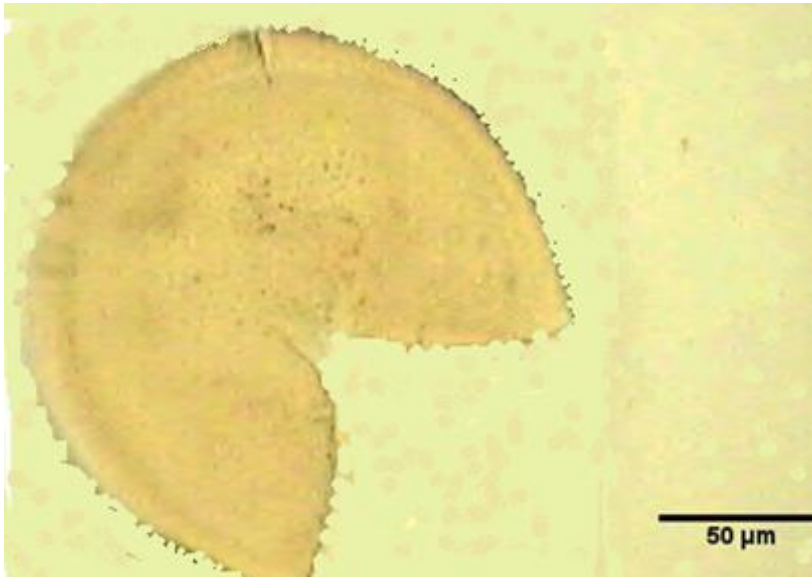
Color (PVLG): verde manzana

θ espora (μm): 157,338

Espesor pared (μm): 13. Reticulada y ornamentada

θ hifa (μm): ----

Posible género: *Acaulospora sp1*



(Objetivo 40X)

Figura 30. Morfotipo N° 8

Morfotipo 9

Forma: sub globosa

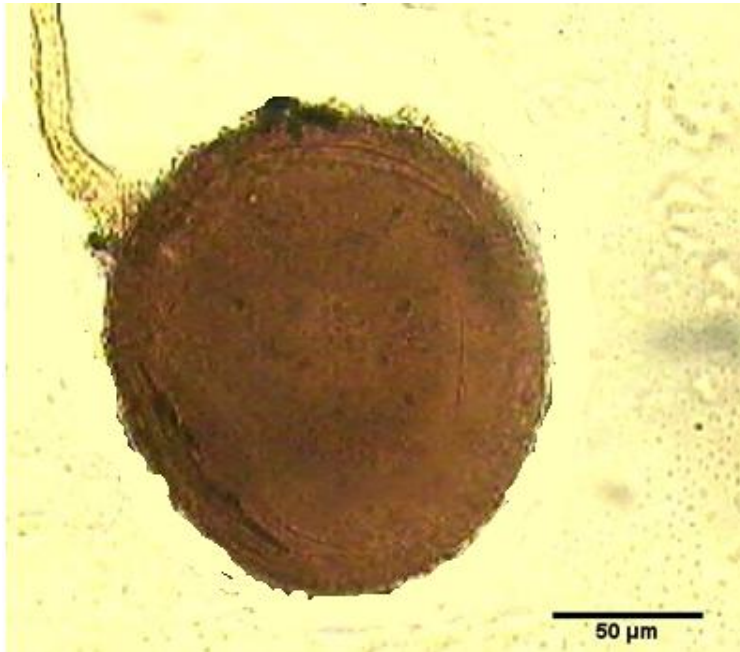
Color (PVLG):marrón claro

θ espora (μm):157,131

Espesor pared (μm):9,245

θ hifa (μm): 15,505

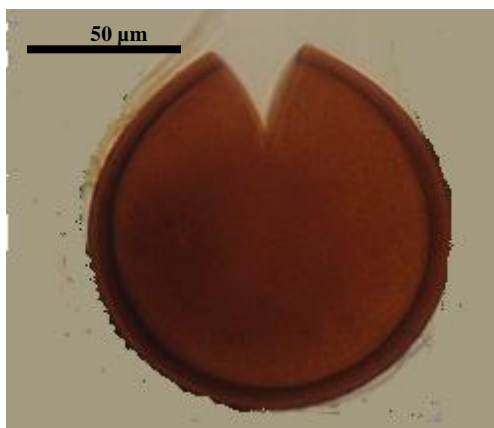
Posible género:*Glomus sp 8*



(Objetivo 40X).
Figura 31. Morfotipo N° 9

Morfotipo N°10

Forma: sug globosa
Color (PVLG): pardo
 θ espora (μm):152,312
Espesor pared (μm):8,878
 θ hifa (μm): --
Posible género: *Glomus sp 9*

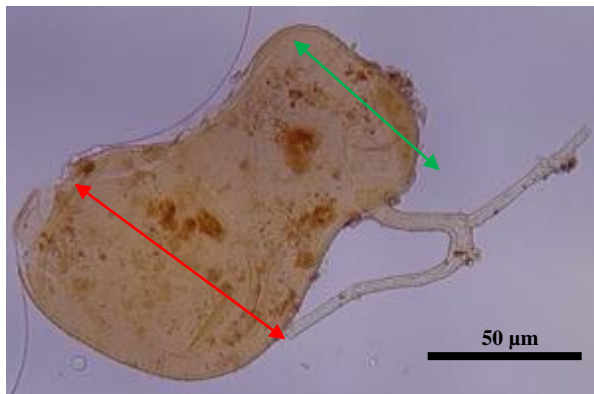


(Objetivo 40X)
Figura 32. Morfotipo N° 10

Morfotipo N°11

Forma: irregular

Color (PVLG):

Largo (μm): 209,858Ancho apical (μm):108,009Ancho medio (μm):92,550Ancho basal (μm):141,245Espesor pared (μm):7,25 θ hifa (μm):10,371Posible género: *Glomus sp 10*

(Objetivo 40X)

Figura 33. Morfotipo N° 11

Morfotipo N°12

Forma: irregular

Color (PVLG): marrón claro

 θ espora (μm):162,659Espesor pared (μm):6,541 Ornamentada θ hifa (μm):12,481Posible género: *Glomus sp 11*



(Objetivo 40X). Figura 34. Morfotipo N° 12

Morfotipo N°13

Forma: subglobosa

Color (PVLG): Naranja oscuro-marrón

Posible Género: *Acaulospora sp2*

Posible especie: Características morfológicas similares a *A. mellea*. (Referencia BR983A. INVAM.2013)

Obs: posiblemente trazas de lodo petrolizado en su interior



(Objetivo 40X). Figura 35. Morfotipo N° 13

Morfotipo N°14

Forma: ovalada

Color (PVLG): marrón claro

Posible género: *Glomus sp 12*

Obs: posiblemente trazas de lodo petrolizado en su interior



(Objetivo 40X)

Figura 36. Morfotipo N° 14

Morfotipo N°15

Forma: sub globosa

Color (PVLG): marrón amarillento

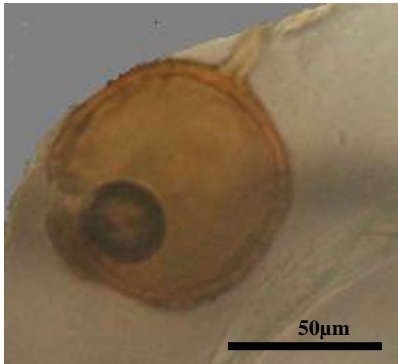
θ espora (μm): 71,036

Espesor pared (μm): 6,975

θ hifa (μm): 6,880

Posible género: *Glomus sp 13*

Obs: Probablemente trazas de lodo petrolizado en su interior



(Objetivo 40X)

Figura 37. Morfofoto N° 15

Morfotipo N°16

Forma: Sub globosa

Color (PVLG): marrón claro

θ espora (μm): 292,784. Ornamentada, con presencia de cicatriz

Espesor pared (μm): 14,082

θ hifa (μm): ____

Posible género: *Acaulospora* sp 3



(Objetivo 40X)

Figura 38. Morfotipo N° 16

Forma: globosa

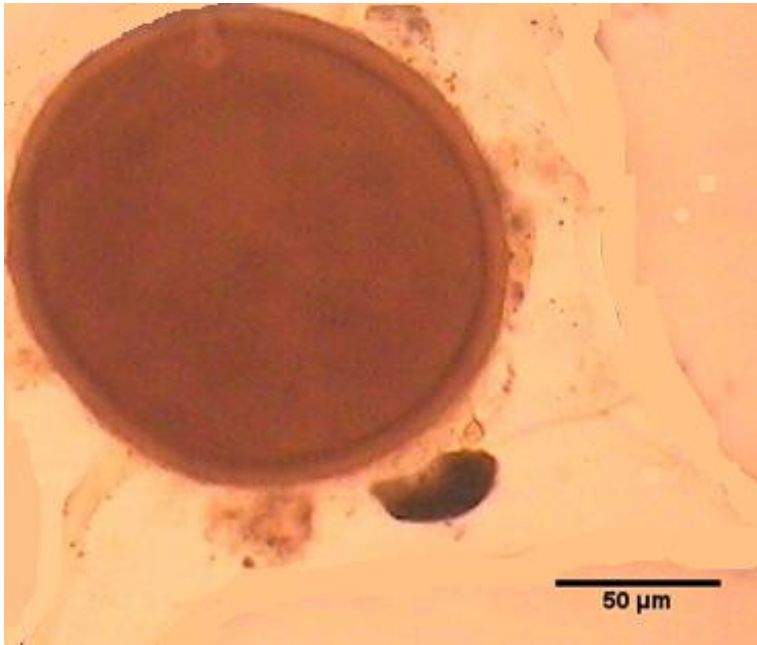
Color (PVLG): marrón claro

θ espora (μm):128,541

Espesor de pared (μm):5,608

θ hifa (μm):13,083

Posible género:*Glomus sp14*



(Objetivo 40X)

Figura 39. Morfofoto N° 17

Morfofoto N°18

Forma: Globosa

Color (PVLG): marrón rojizo

θ espora (μm):155,063

Espesor de pared (μm): 7,343

θ hifa (μm):14,907

Posible género: *Glomus sp 15*



(Objetivo 40X)

Figura 40. Morfotipo N° 18

Morfotipo N°19

Forma: Globosa

Color (PVLG): Hialina (fotografía tomada con filtro)

θ espora (μm): 441,794

Espesor de pared (μm): 27,715

θ hifa (μm): 43,298

Posible género: *Glomus sp 16*



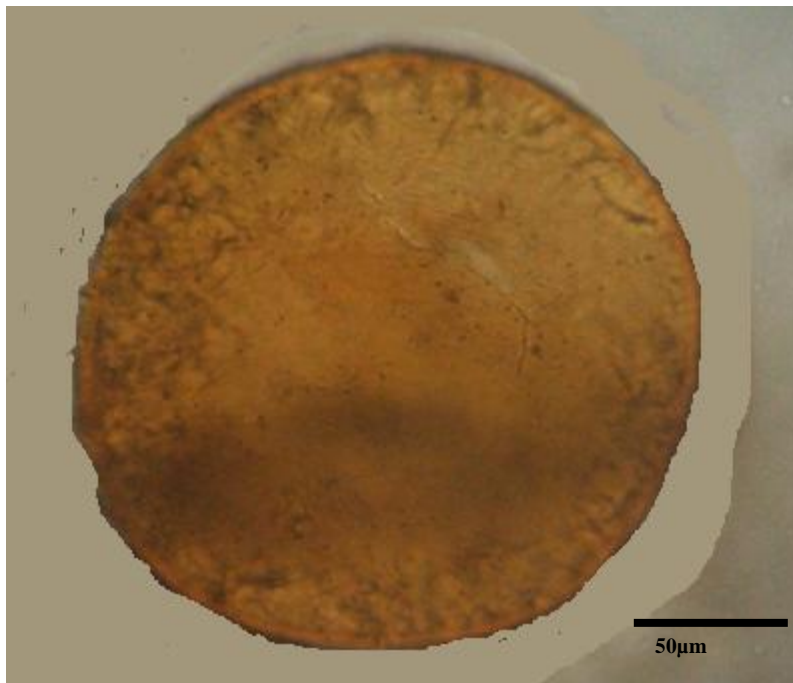
(Objetivo 40X)

Figura 41. Morfotipo N° 19

Morfotipo N°20

Forma: globosa

Color (PVLG): marrón claro

 θ espora (μm): 194,927. OrnamentadaEspesor de pared (μm): 5,154 θ hifa (μm): -Posible género: *Glomus sp17*

Objetivo 40X)

Figura 42. Morfotipo N° 20

Morfotipo N°21

Forma: ovalada

Color: marrón

Largo espora (μm): 137,696Ancho (μm): 161,620Espesor de pared (μm): 6,754 θ hifa (μm): ---Posible género: *Glomus sp 18*

Obs: Probablemente trazas de lodo petrolizado en su interior



Posibles trazas de
lodo petrolizado en su
interior

(Objetivo 40X)

Figura 43. Morfotipo N° 21

Morfotipo N°22

Forma: Subglobosa

Color (PVLG):

θ espora (μm): 87,608

Espesor de pared (μm): 9,456

θ hifa (μm): 7,289

Posible género: *Glomus sp 19*

Posible especie: Características morfológicas similares a *Glomus constrictum*.
(Trappe, 1977).



(Objetivo 40X)

Figura 44. Morfotipo N° 22

Morfotipo N°23

Forma:

Color (PVLG):

θ espora (μm):112,652

Espesor de pared (μm):3,783

θ hifa (μm):6,175

Posible género:*Glomus sp 20*



(Objetivo 40X)

Figura 45. Morfotipo N° 23

Morfotipo N°24

Forma: Globosa

Color (PVLG):beige

θ espora (μm): 664,751

Espesor de pared (μm): 30,092

θ hifa (μm): 62,476

Posible género:*Glomus sp 21*



(Objetivo 40X)

Figura 46. Morfotipo N°24

Morfotipo N°25

Color (PVLG): color miel

Forma: ovoide

Largo espora (μm):133,029

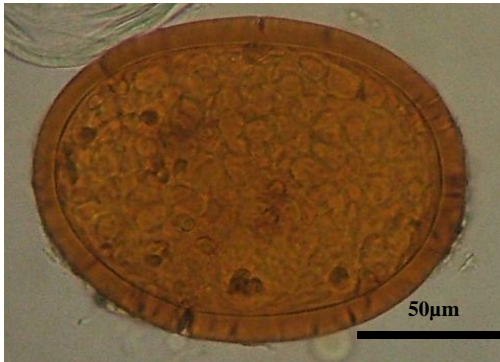
Ancho espora (μm):103,348

Espesor de pared (μm): 34,248

θ hifa (μm): -

Posible género: *Glomus sp 22*

Posible especie: Características morfológicas similares a *Glomus macrocarpus* (Descrita por primera vez por Tulasne y Tulasne. 1844)



(Objetivo 40X)
Figura 47. Morfotipo N°25

Morfotipo N°26

Forma: Globosa

Color (PVLG): marrón claro

θ espora (μm):153,837

Espesor de pared (μm):9,797

θ hifa (μm):13,997

Posible género: *Glomus sp 23*



(Objetivo 40X)
Figura 48 .Morfotipo N°26

Morfotipo N°27

Forma: globosa

Color (PVLG): marrón claro

θ espora (μm):160,354

Espesor de pared (μm):9,994

θ hifa (μm): 16,170

Posible Género: *Glomus sp 24*



(Objetivo 40X)

Figura 49.Morfotipo N°27

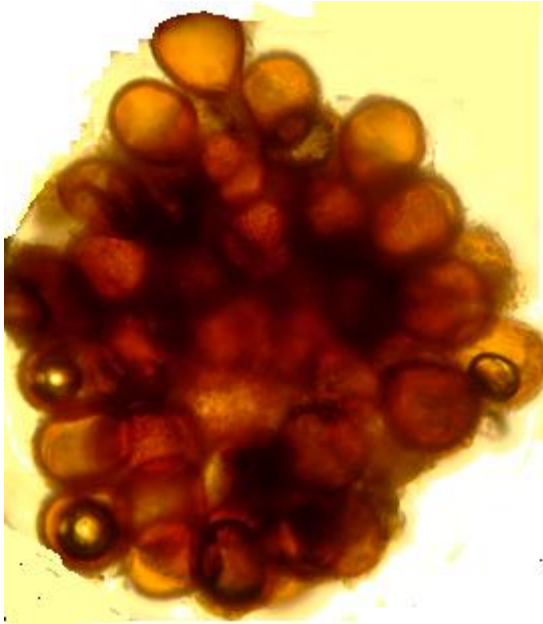


Figura 50. Esporocarpio posiblemente de *Glomus sp.* Color amarillo dorado con clamidosporas elipsoidales dispuestas radialmente en un centro del plexo de las hifas no septadas

Ante la evidente presencia de morfotipos de Glomeromycota en el suelo bajo estudio, se corrobora lo planteado por Franco *et al* (2007), el cual señala que las esporas de los hongos Glomeromycota, son capaces de tolerar hidrocarburos en suelos contaminados con el mismo.

De los 27 morfotipos de hongos Glomeromycota de posibles géneros identificados, el 86,21% se ubicó dentro de *Glomus*, 10,34% *Acaulospora*, y un 3,45% en *Entrophospora*. Estos resultados, evidencian una riqueza de morfotipos y una pobreza en géneros (3 géneros). Igualmente se observaron diferentes estados de desarrollo de las esporas, y un 63% de morfotipos con coloración oscura (fig. 23-25, 27-29, 31,32, 34-40, 42-44, 47-49), un 22 %

concoloración clara (fig. 26, 30, 33,41, 45,46), y 15% con coloración oscuras y aparente presencia de trazas de lodo petrolizado (fig.36, 37,43, 45).

Aunque en esta investigación, los posibles géneros *Glomus* y *Acaulospora* ocupan los primeros lugares al igual a los reportados por Caproni *et al.*, (2003) y Peña *et. al* (2007), bajo condiciones de suelos ácidos, la proporción de las mismas es diferente.

De los hongos Glomeroycota reportados en este estudio, el género *Glomus*, fue confirmado por Verdín *et al.*,(2006), como capaz de utilizar antraceno. Por otro lado Pawlowska *et al.*, (2004), encontraron que el género *Glomus*, bajo la acción de elevadas concentraciones de Pb, Cd y Zn. Igualmente *Entrofospora* fue hallada formando asociaciones con raíces de gramíneas (*Andropogon sp*, *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria mutica*), en suelos contaminados con metales pesados.

Es importante destacar, que en esta investigación se planteó la caracterización fenotípica de las esporas bajo criterios totalmente morfológicos, lo cual implica una aproximación a su identificación. Aunque los criterios morfológicos de identificación de esporas han sido, y siguen siendo utilizados por diversos investigadores como Lovera y Cuenca (2007), los mismos han permitido describir, redescubrir y descubrir nuevas especies y géneros de hongos Glomeromycota con apoyo complementario de técnicas moleculares,

razón por la cual, los géneros señalados en esta investigación podrían ser nuevos géneros como por ejemplo *Clariodeoglomus* o *Paraglomus*, o nuevas especies.

Por lo tanto, para llegar a una identificación exacta de géneros, especies, o variedades, de hongos Glomeromycota importantes, que cumplan con objetivos agrícolas y/o de biorremediación es indispensable acudir a herramientas moleculares (Ruíz *et al.*, 2002).

7.1.4 Obtención del Inóculo nativo

Se obtuvo un total 2 kg de inóculo nativo mixto, producto de la mezcla de todos y cada uno de los suelos rizosféricos de los de cultivos trampa. Este inoculante estaba constituido por esporas, raicillas infectadas, hifas de los hongos Glomeromycota y suelo.

El muestreo realizado al inóculo para la precisión de su riqueza arrojó un número de 260 esporas/ 100gr de suelo, proporción suficiente para inducir la colonización, sin embargo, al compararlo con inóculantes diseñados por Salas y Blanco (2000), con una riqueza de 13.547 esporas/g de suelo para maíz, y 1.100 esporas/g de suelo para Fabáceas forrajeras, y el inóculo elaborado por Cuenca *et al.*, (2007), con 4.349 y 16.359 esporas/ 100g de sustrato para áreas tropicales, podría considerarse escaso en esporas.

Se comprobó la riqueza del inóculo *A. mellea*, por el método de tamizado y decantación Gerdermann y Nicolson (1963), modificado por Sieverding (1991), resultando un total de 428 esporas/100g de suelo, y 260 esporas/100g de suelo para el inóculo mixto nativo.

Las dosis resultantes de los inóculos aplicadas fueron de 120g de inóculo nativo mixto y 61g de inóculo a base de *Acaulospora mellea*. Estas proporciones obedecieron a cálculos realizados en base al inóculo con menor riqueza de esporas (nativo mixto). Esto se cumplió con la finalidad de garantizar la misma cantidad de esporas a todos los tratamientos a ser inoculados, es decir 260 esporas por microcosmo, independientemente del tipo.

7.1.5 Análisis químico del lodo petrolizado

Se obtuvieron los cromatogramas de masas de los n alcano e isoprenoides pristano (P) y Fitano (F), para la interpretación de los iones $m/z = 113$ (n- alcanos e isoprenoides), $m/z = 191$ (hopanos), $m/z = 218$ (esteranos). Estos iones, no son más que biomarcadores moleculares, a través de los cuales se obtiene información acerca del grado de madurez del petróleo.

A partir de las áreas fueron calculadas las relaciones Pristanos C_{23-3} , Fitano C_{27-3} y Hopanos C_{31-35} , para ser usados como índices de biodegradabilidad, por compararse compuestos de diferentes grados de resistencia.

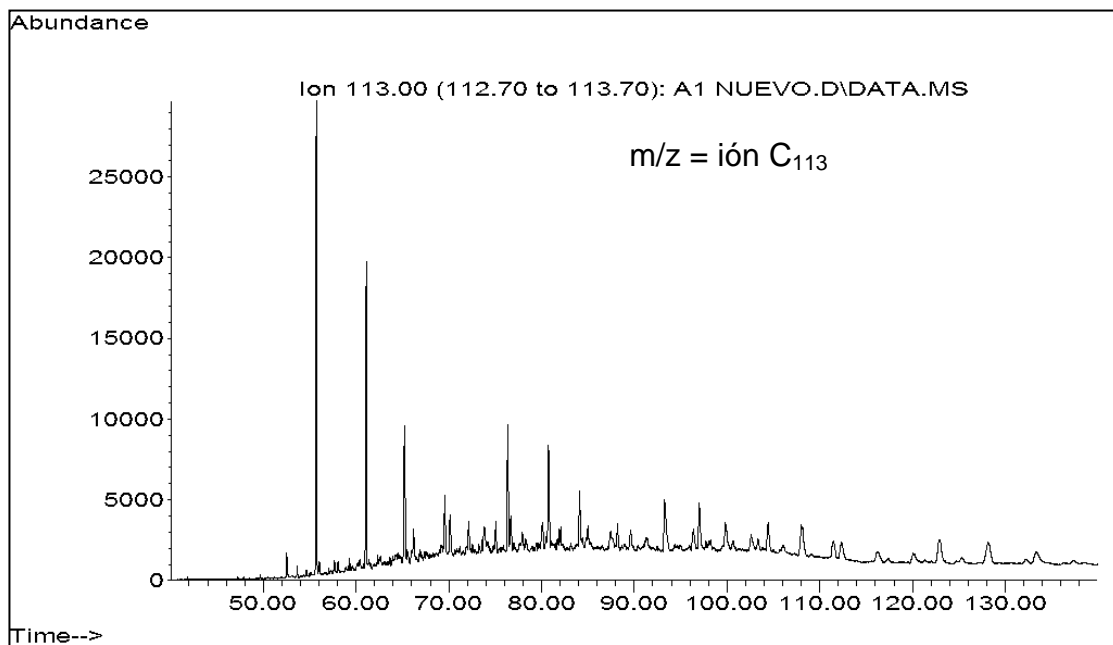
Se obtuvo un 38% de hidrocarburos saturados, 19 % de hidrocarburos aromáticos, 13% resinas y 30% asfaltenos. La cromatografía de gases acoplado a masas reveló que los alcanos se encuentran alterados (Tabla 5).

Tabla 5. Estimación de las fracciones de hidrocarburo de la fosa La Caracola

Muestra	Peso muestra (g)	maltenos (g)	saturados (g)	aromaticos (g)	resinas (g)	asfalteno (g)
A-1	0.1045	0.0658	0.0344	0.0182	0.0132	0.0387
A-2	0.0854	0.0663	0.0367	0.0178	0.0118	0.0191
Muestra			% Sat	% Arom	% Res	% Asf
A-1			33	17	13	37
A-2			43	21	14	22
		Promedio	38	19	13	30

De acuerdo a los datos anteriores, la cantidad de saturados se encuentra en mayor proporción, seguida de la fracción de asfaltenos y resinas. En resumen, los grupos de compuestos presentes en el crudo de la fosa pueden representarse en orden decreciente como sigue: saturados >aromáticos>asfaltenos>resinas. Este orden coincide con el reportado por García *et al.*, (2012), de un crudo de Guafita IX (sub cuenca Barinas), y pertenece a un crudo mediano (22-29° API), según la clasificación de crudo (PDVSA ,2013).

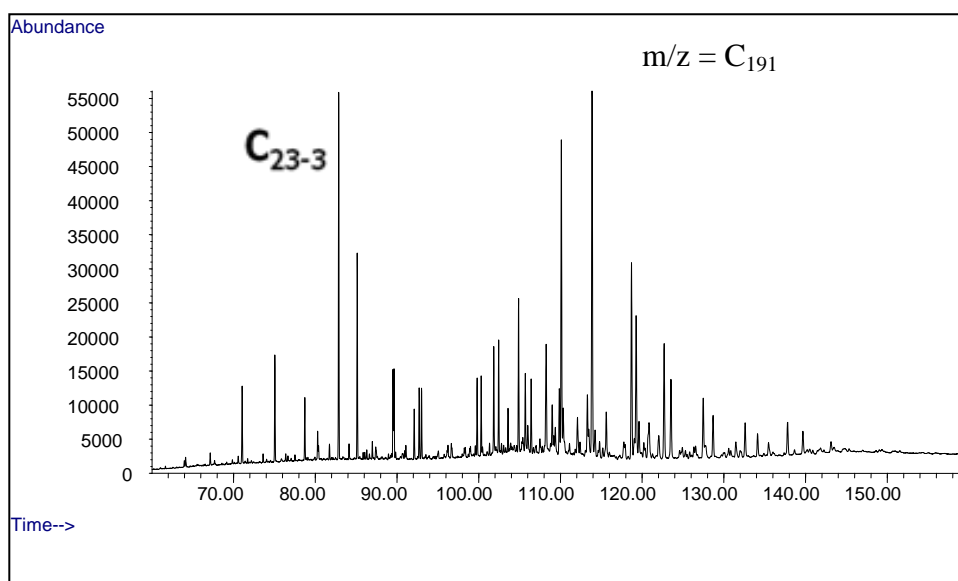
Al comparar el fragmentograma de los n- alcanos e isoprenoides de la fosa la caracola con un fragmentograma no alterado (de datos no publicados por la Dra Liliana López Laboratorio de Geoquímica de petróleo del Instituto de Zoología y Ecología Tropical de la UCV- Caracas), se evidenció una degradación en la fracción de hidrocarburos saturados (Figura 51), probablemente debido a biodegradación microbiana, a procesos físicos, químicos, antrópicos, o combinación de los mismos.



Alteración de n-alcános e isoprenoidespristano y fitano

Figura 51. Fragmentograma de los n- alcanos e Isoprenoide de la fosa la Caracola

En el fragmentograma de los terpanos (Figura 52), se observó la serie de terpanos tricíclicos de C_{23-3} a C_{27-3} , y de mayor intensidad relativa respecto a los terpanos pentacíclicos (C_{29} y C_{30}) y los homohopanos ($C_{31}-C_{35}$). En los esteranos (Figura 53), se notó la presencia de los esteranos regulares (C_{27} , C_{28} y C_{29}), diasteranos, pregnano (C_{20}) y homopregnano (C_{21}), estos últimos de menor intensidad.



Esteranos no alterado

Figura 52. Fragmentograma de los hopanos de la fosa La Caracola

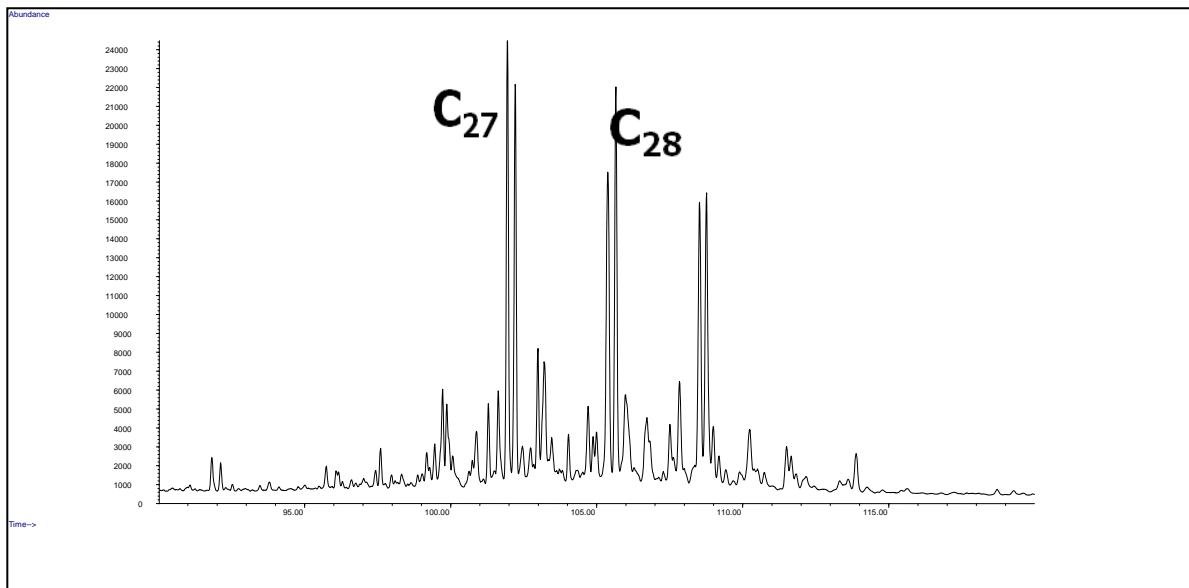


Figura 53. Fragmentograma de los esteranos de la fosa la Caracola

En base al alto porcentaje de hidrocarburos saturados, en relación a los hidrocarburos aromáticos y asfaltenos (Tabla 5), aunado a la interpretación de los iones m/z (figura 52 y 53), el lodo petrolizado de la fosa la caracola para el momento del muestreo, tenía potencialidad de ser biodegradado.

Finalmente, de acuerdo a la clasificación por Wenger e Isaksen (2002), el lodo petrolizado se ubicó en el nivel 3 en la escala de biodegradación, razón por la cual pudo ser utilizado para la segunda fase de la investigación.

7.1.6 Análisis químico del suelo no rizosférico

El suelo utilizado para el ensayo fue tomado del horizonte A, que de acuerdo a USDA (2006), puede ubicarse dentro del orden Aridisol con

horizonte argílico y color claro. Según los resultados obtenidos (Tabla anexa iii), el análisis químico del suelo reveló que posee muy bajo contenido de nitrógeno total (0,07%), siendo pobre en fósforo (3,89 mg/kg⁻¹), con valores muy altos de sodio (78,4%), muy bajo contenido de materia orgánica (0,38 %), pH ácido (5,76), y contenido de níquel, cromo, plomo, no detectables. Estas propiedades químicas, se corresponden con las predominantes de las sabanas Orientales de Venezuela.

7.2 Fase de ejecución y análisis

7.2.1 Parámetros morfométricos en la planta

7.2.1.1 Altura

Las plantas de *B. brizantha* sometidas a los diferentes tratamientos mostraron durante el desarrollo del ensayo una tendencia muy parecida en su crecimiento en altura, pero con algunas variaciones cuantitativas. Al final de la prueba, las plantas del tratamiento sin hidrocarburo sin inóculo (T1) mostraron la mayor altura con 44,75 cm. Detrás de ella con valores muy similares entre sí se ubicaron las de los tratamientos sin hidrocarburos con inóculo nativo (T3), las del tratamiento sin hidrocarburo inoculadas con *A. mellea* (T5), las tratadas con hidrocarburos sin inóculo (T2) y las correspondientes al tratamiento con hidrocarburo mas el inóculo nativo (T4), La menor altura fue alcanzada en el tratamiento con hidrocarburo inoculado

con *A. mellea* (T6). La figura 54 presenta gráficamente estas tendencias de crecimiento.

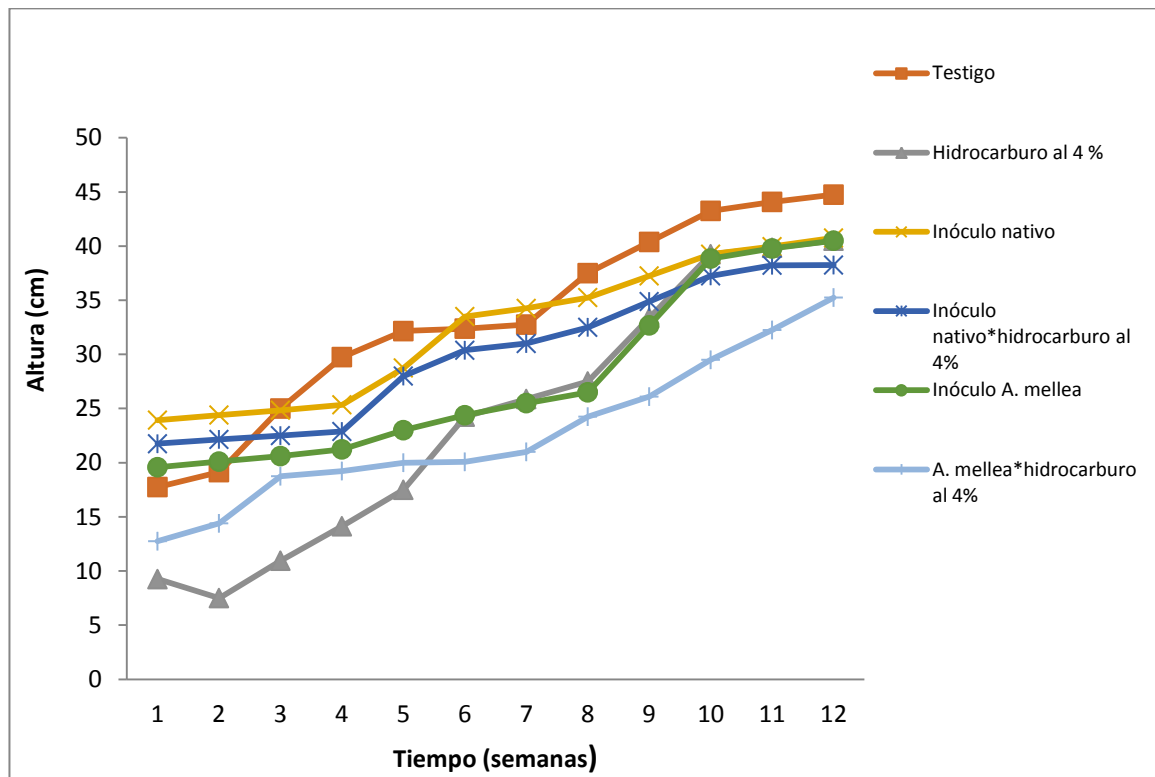


Figura 54. Altura promedio de plantas de *B. brizantha* sometidas a los diferentes tratamientos durante 12 semanas de experimentación.

En la tabla 6 se resume la estadística aplicada a los valores de altura de *B. brizantha*, vemos en el que sólo hubo diferencias significativa simple entre le aplicación o no de hidrocarburo. Esto se refleja en los valores mas bajo en aquellos tratamientos contaminados. La prueba de rango mutiple de Duncan al 0,005%, discriminó tres grupos, señalando sólo una diferencia con signinificación simple entre las medias de los tratamientos de no contaminación.

Igualmente la tabla 6, demuestra que no hay diferencias significativas entre los tratamientos inoculados respecto a los no inoculados, por lo que no podemos asegurar acerca de la bondad de los tratamientos con inoculaciones. Tampoco se evidenció significancia para el efecto de interacción.

El valor del CV del 11,10 indica un buen control del error experimental en esta prueba.

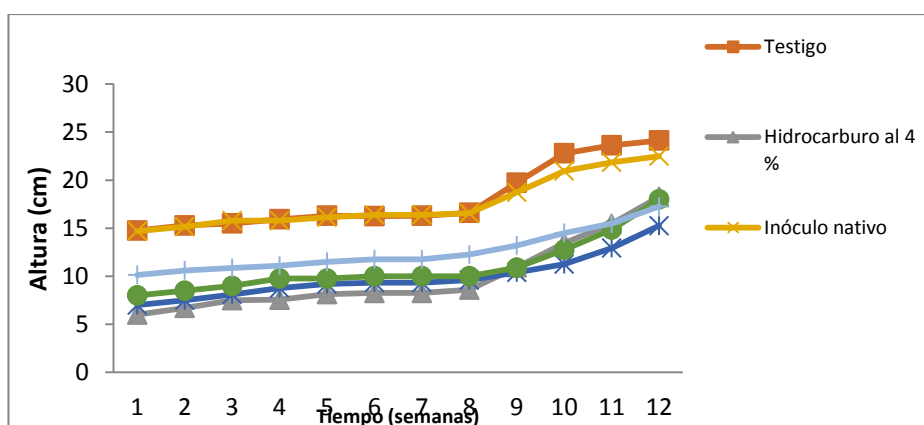
Tabla 6. Altura promedio de *Brachiaria brizantha* al final de los 3 meses del experimento.

Suelo	Inóculo	Altura promedio (cm)
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	44,75 a
	Con inóculo nativo	40,75 ab
	Con <i>A. mellea</i>	40,50 ab
Con Hidrocarburo	Sin inóculo	40,50 ab
	inóculo nativo	38,25 ab
	Con <i>A. mellea</i>	35,25 b
Significancia efecto simple (de suelo)		*
Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)		ns
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)		ns
C.V.		11,10
Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)		
ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$		
Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente		

Al revisar los valores de altura obtenida en *Brachiaria brizantha* en suelo contaminado con 50 mg kg⁻¹ de combustible pesado, luego de 90 días de estudios realizados por Sangabriel *et al* (2006), se nota que los mismos no superaron los 15,8cm. Las mediciones de altura para *Brachiaria brizantha* en esta investigación fueron cuantitativamente superiores.

Para el caso de las Fabáceas (figura 55), la tendencia del crecimiento de las plantas de los diversos tratamientos fue muy parecida entre sí, aunque con variaciones numéricas. La disposición fue en el siguiente orden decreciente: sin hidrocarburo sin inóculo (T7), sin hidrocarburo con inóculo nativo (T9), sin hidrocarburo con *A. mellea* (T11), con hidrocarburo con inóculo nativo (T10), con hidrocarburo con *A. mellea* (T12) y con hidrocarburo sin inóculo (T8)

Figura 55. Altura promedio de plantas de *A. macracantha* sometidas a los diferentes tratamientos durante 12 semanas de experimentación.



La tabla 7 presenta el resumen de los análisis estadísticos aplicados, donde se comprueba la existencia de diferencias altamente significativas entre

los tratamientos contaminados y no contaminados con lodo petrolizado. También se refleja en esta, unas variaciones altamente significativa para los diferentes tipos de inóculo utilizado.

Tabla 7. Altura promedio de *Acacia macrantha* al final de los 3 meses de tratamiento.

Suelo	Inóculo	Altura promedio (cm)
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	24,13 a
	Con inóculo nativo	18,00 bc
	Con <i>A. mellea</i>	22,50 a
Con Hidrocarburo	Sin inóculo	18,25 b
	Con inóculo nativo	15,25 c
	Con <i>A. mellea</i>	17,25 bc
Significancia efecto simple (de suelo)		***
Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)		***
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)		ns
C.V.		9,69
Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$) ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$ Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente		

La prueba de rango múltiple de Duncan evidenció 4 grupos de medias: el primer grupo conformado por el T7 (sin hidrocarburo sin inóculo) y el T11 (sin hidrocarburo inoculado con *A. mellea*); el segundo grupo conformado por

T8 (con hidrocarburo sin inoculación). El tercer grupo formado por las medias de los tratamientos T9 (sin hidrocarburo con inóculo nativo) y T12 (con hidrocarburo con *A. mellea*), y en el el último lugar las medias de los tratamientos del T10 (con hidrocarburo con inóculo nativo).

El C.V de 0,69, denota un control adecuado del error experimental.

De esta conformación de tratamientos y medias, resulta evidente, que hubo un efecto detrimental del hidrocarburo sobre el crecimiento de *A. macracantha* y también se observa la superioridad del efecto de *A. mellea* sobre el aumento de la altura de las plantas.

En esta investigación, se esperaba entre otros beneficios el incremento de la altura en las plantas creciendo bajo condiciones de contaminación y favorecidas por la inoculación. Sin embargo en el caso de *B. brizantha* se notó una reducción del crecimiento en los tratamientos contaminados y no se expresó ningún efecto benéfico por parte de los diferentes inóculos utilizados. En el caso de *A. macracantha* también se evidenció un efecto detrimental del lodo petrolizado aplicado porque en estos tratamientos las plantas presentaron menor tamaño que las no tratadas.

De acuerdo a López (2011), *A. macracantha* tiende a no producir respuesta a la inoculación con bacterias promotoras del crecimiento en condiciones de invernadero. Este autor asoma la posibilidad de que la escasa

respuesta de *A. macracantha* a la inogulación pueda deberse a que en esta etapa la planta naturalmente expresa su tasa de crecimiento mas lenta. De igual manera, en esta investigación no se presentó una respuesta evidente en cuanto al crecimiento de los tratamientos inoculados con *A. mellea* y el inóculo nativo hecho que se puede atribuir a las mismas razones

En términos generales el crecimiento de *B. brizantha* fue superior al de *A. macracantha* indistintamente de los tratamientos; esto puede explicarse porque siendo especies vegetales distintas y de familias diferentes, presentan desiguales tasas de crecimiento; una es gramínea y la otra es una leguminosa arbórea. Esta última, a pesar de que en la zona de muestreo exhibió atractivos parámetros morfométricos y una elevada fructificación, durante el periodo de investigación expresó un tardío crecimiento en altura acompañado de un fenómeno de defoliación recurrente (figura 56a y 56b), coincidiendo de alguna manera con lo señalado por Lopez (2011)



Figura 55.(a). Planta de *A. macracantha* con hojas. (b). Planta de *A. macracantha* en proceso de defoliación durante 3 meses de tratamientos.

Aunque *A. macracantha*, pertenece al grupo de plantas caducifolias, la marcada pérdida de sus hojas, posiblemente no le permitió recuperarse, debido a que el su crecimiento es básicamente dependiente del área foliar, de la tasa de asimilación neta, de la concentración de compuestos químicos en las hojas, que de acuerdo a Villar *et al.*, (2004), pudieron suscitar un desbalance nutricional y comprometer la asociación hongo-planta.

Por otro lado, las condiciones intrínsecas de la especie *B. brizantha* específicamente, su hábito de crecimiento, que es del tipo macoloso, le permitió emitir nuevos brotes, en la medida que se marchitaban los anteriores durante el experimento (Figura anexa iv), ajustándose al patrón de producción

de biomasa y edad de la planta señalado por Pérez *et al.*, (2004). Este comportamiento según Munns *et al.*, (1979), son adaptaciones específicas mediante las cuales estas plantas pueden sobrevivir bajo condiciones inhóspitas.

Otra condición que favorece a *B. brizantha* es su fisiología; ya que son plantas con modificaciones estructurales y fisiológicas típicas de las C4, condición que le proporciona ventaja en entornos estresantes, debido a que presentan adaptaciones bioquímicas del proceso fotosintético, que evitan la fotorespiración, y además, permiten tasas fotosintéticas elevadas con los estomas cerrados, lo cual no compromete la capacidad de crecimiento y reproducción incluso la supervivencia de la planta (Azcón y Talón, 2000).

7.2.1.2 Peso Seco

Los resultados de las mediciones del peso seco de la parte aérea de las plantas de *B. brizantha*, expuestos en la tabla 8, evidencian una reducción de los valores, en aquellas crecidas en los tratamientos que fueron contaminados con lodo petrolizado, respecto a las que se desarrollaron sin contaminación.

La aplicación de un análisis de varianza permitió detectar la existencia de diferencias altamente significativas al menos en un par de las medias

estudiadas, y empleando el método de comparación de medias de Rango Múltiple de Duncan, se determinó la superioridad estadística de las medias de los tratamientos libre de contaminante en relación a las contaminadas, cuyo orden se muestran en la misma tabla.

No hubo una tendencia clara en cuanto al comportamiento del peso del vástago en los diferentes tipos de inóculo. Dentro del grupo de las plantas no contaminadas se observa que las no inoculadas y las inoculadas con *A. mellea* fueron estadísticamente superiores a las inoculadas con el compuesto nativo. Sin embargo, bajo condiciones de contaminación todas las medias de los tratamientos de inoculación, tuvieron el mismo comportamiento estadístico.

Tabla 8. Producción de materia seca (g) del vástago, raíz y relación v/r de *Brachiaria brizantha*

Suelo	Inóculo	Peso del vástago (g)	Peso de raíz (g)	Relación vástago/raíz
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	45,15 a	46,88 c	1,04 a
	Con inóculo nativo	33,02 b	63,89 ab	0,53 bcd
	Con <i>A. mellea</i>	43,80 a	76,44 a	0,60 bc
Con Hidrocarburo	Sin inóculo	18,11 c	28,09 d	0,75 b
	Con inóculo nativo	18,39 c	54,48 bc	0,35 d
	Con <i>A. mellea</i>	24,01 c	56,91 bc	0,43 cd

Significancia efecto simple (de suelo)	***	***	**
Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)	**	***	***
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)	*	ns	ns
C.V.	20,82	23,55	25,40

Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)

*ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$*

Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente

Respecto al peso seco del sistema radical de *B. brizantha*, la tabla 8 presenta los valores de los exámenes estadísticos aplicados, notándose la misma tendencia anterior, es decir un efecto detrimental en el peso en las plantas de los tratamientos contaminados con lodo petrolizado respecto a las no contaminadas. En ambos grupos se nota la superioridad de los tratamientos inoculados sobre los no inoculados. Las inoculadas con *A. mellea* presentaron un mejor comportamiento cuantitativo, que estadísticamente fue comprobado por la prueba de Duncan.

El crecimiento de la biomasa total en los tratamientos contaminados con lodo petrolizado fue de un 50,2 % en relación a los no contaminados; resultados que aunque bajos, superan a los obtenidos por Hernandez y Mager (2003) del 11,4% en *B. brizantha* creciendo bajo la influencia de contaminación del 3% de HCP. Estos resultados ratifican que esta especie

es capaz de incrementar su peso aún bajo condiciones de estrés por contaminación con hidrocarburo.

Una posible explicación a la reducción de la biomasa de *B. brizantha* bajo condiciones de contaminación con HCP, es la interferencia en el intercambio de gases y agua a nivel radical y en la absorción de nutrimentos, así como también los efectos adversos sobre las membranas celulares y transporte de metabolitos (Xu and Jonson, 1995), alteraciones fisiológicas, que disminuyen la producción de biomasa.

En cuanto a la relación vástago/ raíz, los valores promedios en las plantas crecidas en suelo no contaminado y contaminado fueron de 1,04 y 0,75 respectivamente, lo que indica una reducción de este parámetro con la aplicación del lodo petrolizado. Esto evidencia, que la parte más sensible a la acción del hidrocarburo fue la aérea y seguramente debido a ello los efectos benéficos de la inoculación se expresaron claramente en el peso seco de la raíz, cuyos mayores valores se presentaron en los tratamientos inoculados. Hernández y Mager (2003), también encontraron reducción de la relación vástago/raíz en *B. brizantha* en tratamientos contaminados con hidrocarburo.

Son múltiples y conocidas las ventajas de la inoculación de plantas con MA, entre ellas, la captación y transferencia de agua y nutrimentos (Camargo, 2002), aumento en la biomasa (Van der Heijden, 2002), inmovilización de altas concentraciones de metales no esenciales en la raíz impidiendo que éstos

pasen a la parte aérea de la planta (Leyval *et al.*, 2002), bloqueo a la entrada de microorganismos patógenos, al estimular establecimiento de rizobacterias en la micorrizósfera (Lioussanne, 2010). Algunas de ellas o varias, pudieron mejorar el estatus de las plantas inoculadas en este trabajo.

La tabla 9, muestra los resultados obtenidos en la experimentación con *A. macracantha*. Revela similares valores promedios de peso del vástago muy similares, por lo que seguramente no se detectó ninguna diferencia entre los tratamientos desde el punto de vista estadístico.

Tabla 9. Producción de materia seca (g) del vástago y raíz y relación v/r de *Acacia macrantha*

Suelo	Inóculo	Peso del vástago (g)	Peso de raíz(g)	Relación vástago/raíz
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	4,83 a	5,33 ab	0,91 a
	Con inóculo nativo	4,85 a	5,43 ab	0,90 a
	Con <i>A. mellea</i>	4,09 a	4,51 ab	1,13 a
Con Hidrocarburo	Sin inóculo	4,11 a	4,09 ab	1,80 a
	Con inóculo nativo	4,39 a	4,66 ab	1,02 a
	Con <i>A. mellea</i>	4,12 a	6,58 a	0,70 a
Significancia efecto simple (de suelo)		ns	ns	ns

Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)	ns	ns	ns
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)	ns	*	ns
C.V.	20,14	16,39	33,15

Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)

*ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$*

Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente

En cuanto al peso seco radical se observa de igual manera un comportamiento muy parejo en todos los tratamientos, sin una evidente diferencia entre el peso promedio de las muestras de los distintos tratamientos, solo sobresalió una media con una significación de efecto simple correspondiente al tratamiento contaminado e inoculado con *A. mellea*.

Los resultados de la relación V/R no experimentó variación alguna por efecto de los distintos tratamientos, como lo demuestra la tabla 9, y por consiguiente no se consiguieron diferencias significativas estadísticas que permitieran implementar una discusión.

El poco desarrollo radical mostrado por *A. macracantha* es una característica fisiológica inherente a su condición de especie arbórea, que exhibe la tasa de crecimiento general mas baja en la fase de vivero (López, 2011) y que fue señalada en la discusiones anteriores como la causa más probable de la exigua respuesta de esta gramínea a los diferentes tratamiento, al menos en la etapa de vivero. El escaso volumen radical que mostraron las

plantas de estas especies en los microcosmos posiblemente no condicionó el establecimiento de una micorrización eficiente.

7.2.3 Porcentaje de colonización micorrízica y número de esporas

La tabla 10 revela los valores promedios correspondientes al porcentaje de colonización y número de esporas resultantes de la aplicación de los distintos tratamientos, así como la variación estadística detectada por el ANAVAR y por la aplicación de la prueba de comparación de medias según Duncan.

Tabla 10. Porcentaje de colonización y número de esporas en plantas de *Brachiaria brizantha* luego 3 meses de tratamiento.

Suelo	Inóculo	% Colonización	Número de esporas
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	21,00 c	15,25 b
	Con inóculo nativo	50,00 a	17,75 b
	Con <i>A. mellea</i>	22,50 c	27,75 a
Con Hidrocarburo	Sin inóculo	13,50 d	7,50 c
	Con inóculo nativo	42,25 b	9,50 c

	Con <i>A. mellea</i>	14,00 d	10,00 c
Significancia efecto simple (de suelo)		***	***
Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)		***	***
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)		ns	***
C.V.		11,84	11,65

*Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)
ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$
Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente*

Se observa en primer lugar, una diferencia altamente significativa entre los valores porcentuales de la colonización de los tratamientos no tratados y tratados con el lodo petrolizado, resultando superiores en los primeros. En segundo lugar se notan las variaciones numéricas de la colonización sucedidas en los distintos tipos de inoculación, con superioridad evidente del inóculo nativo. Las inoculaciones con *A. mellea* y las no inoculadas no reflejaron desemejanzas entre si. Hernández *et al.*, (2000), evaluando la presencia de la micorriza arbuscular y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en un suelo contaminado con petróleo, notaron que en la medida que se incrementaba la concentración del hidrocarburo, disminuía el porcentaje de colonización en la planta.

En cuanto al número de esporas, las comprobaciones estadísticas denotan discrepancias entre los tratamientos sin lodo petrolizado y los contaminados con este compuesto, evidenciando superioridad los primeros.

También se revelan discrepancias estadísticas entre los tipos de inóculos aplicados, marcando las mayores cantidad de esporas en los casos con *A. mellea*, en tanto que los inoculados con el inóculo nativo y los no inoculados se comportaron idénticamente.

Estos resultados evidencian un efecto deletéreo del lodo petrolizado, tanto para el % de colonización como para el número de esporas, y son concordantes con lo reportado con Malcova *et al.*, 2003, que señalan que una reducción de las poblaciones de esporas de los hongos Glomeromycota, así como del porcentaje de colonización de los mismos, puede estar directamente relacionada con la concentración del contaminante.

Por otro lado, la disimilitud en cuanto a la tendencia de los valores porcentuales de la colonización y de la cantidad de esporas, en los tratamientos con diferentes tipos de inoculación que se presenta en esta investigación, ya ha sido reportada en otros estudios en el cultivos de maíz (Marcano, 2012).

Tanto el bajo porcentaje de colonización, como el número de esporas expresado por *Brachiaria* en estos resultados, contrastan con la alta micotrofia de esta especie, ya que es considerada una excelentes hospedantes de hongos Glomeromycota. En este sentido, experimentos realizados por el CIAT (1985), sobre la dependencia de micorrizas en 24 especies de pastos

forrajeros tropicales, reportaron que *Brachiaria decumbens* y *Brachiaria brizantha* fueron las especies mas dependientes, mientras que *Panicum maximum* resultó la menos dependiente.

Para el caso de *A. macracantha*, el porcentaje de colonización y el número de esporas logrados en los tratamientos aplicados se presentan en la tabla 11. Esta indica que el valor del porcentaje de colonización en el tratamiento sin hidrocarburo y sin inocular fue muy alto en relación al resto de los tratamientos, situación que sin duda alguna condicionó la alta significancia estadística reflejada en el ANAVAR.

Tabla 11. Porcentaje de colonización y número de esporas en plantas de *Acacia macrantha* luego de 3 meses de tratamiento

Suelo	Inóculo	% Colonización	Número de esporas
Sin Hidrocarburo	Sin inóculo	10,50 a	18,50 a
	Con inóculo nativo	3,75 c	5,00 bc
	Con <i>A. mellea</i>	5,00 b	3,50 cd
ConHidrocarburo	Sin inóculo	2,50 c	4,25 bcd

	Con inóculo nativo	2,75 c	5,50 b
	Con <i>A. mellea</i>	2,50 c	2,50 d
Significancia efecto simple (de suelo)		***	***
Significancia efecto simple (de tipo de inóculo)		***	***
Significancia interacción (Suelo*tipo de inóculo)		***	***
C.V.		18,52	17,19
<i>Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)</i>			
<i>ns. No significativo, * $\leq 0,05$; ** $\leq 0,01$; *** $\leq 0,001$</i>			
<i>Cifras seguidas por la misma letra no difieren significativamente</i>			

Para el número de esporas, el ANAVAR determinó diferencias significativas muy altas, donde los tratamientos sin hidrocarburo y sin inóculo presentaron los valores más altos. Las inoculaciones con *A. mellea* fueron las menos efectivas.

En términos generales se deduce de este estudio, que el reducido porcentaje de colonización y el poco número de esporas en los diferentes tratamientos pudo deberse a las probables relaciones antagónicas en la zona rizosférica con la microflora del suelo, además de la condición de pérdida foliar recurrente de las plantas de *A. macracantha* en la fase de el vivero, lo cual pudo comprometer la delicada relación simbiótica, al no garantizar con eficiencia la demanda de carbohidratos del hongo.

Otro factor que pudo haber condicionado la escasa respuesta de *A. macracantha* a la inoculación, fue la presencia de un sistema radical con una raíz principal no profusa, a causa como ya se señaló anteriormente, del

reducido crecimiento general de las plantas en fase de vivero, Lopez (2000). Esto predispone una menor probabilidad de contacto espora-raíz, en comparación con *B. brizantha*.

En general, el bajo porcentaje de colonización y número de esporas, tanto en *B. brizantha* como en *A. macracantha*, además del efecto negativo del lodo petrolizado, pudo estar sujeto a las complejas intracciones que se establecen en el microambiente de la raíz, los organismos que cohabitan en la micorrizósfera, y la fisiología de la raíz (Barea *et al.*, 2005)

7.2.4 Contaje de microorganismos aerobios heterótrofos.

Al realizar el conteo total de las poblaciones de colonias de bacterias aerobias y hongos expresados en UFCV/g de suelo, se encontraron diferencias significativas (Duncan \leq P 0.05), en los diferentes tratamientos (figuras 57, 58, 59 y 60).

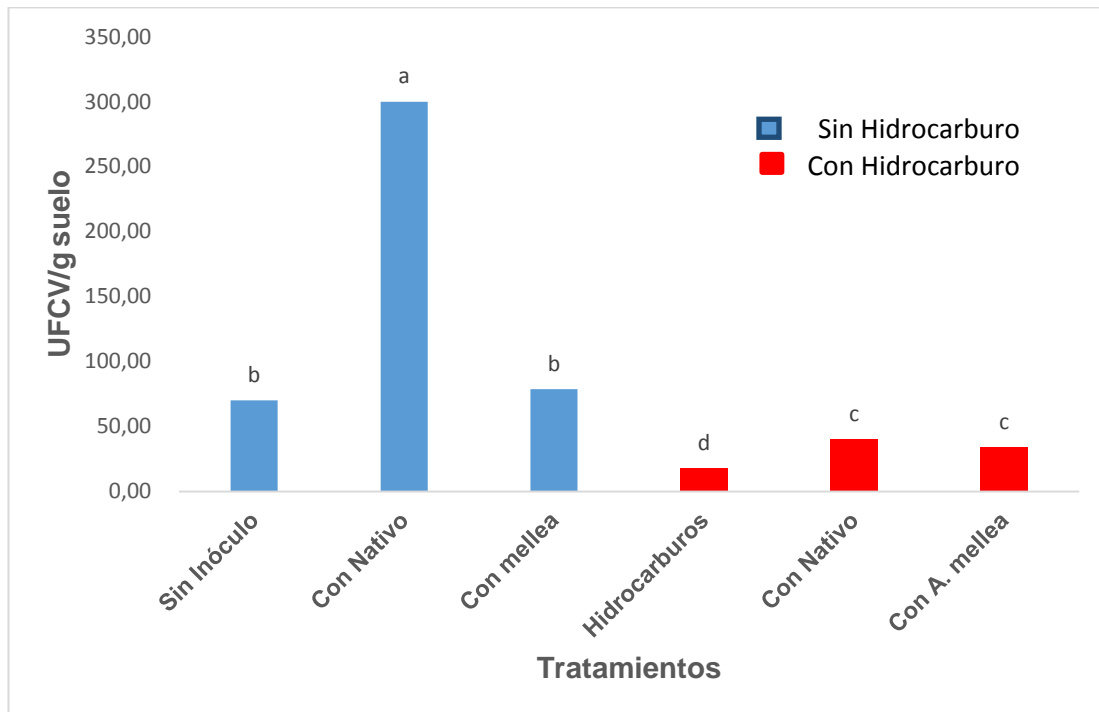


Figura 57. Poblaciones de bacterias aerobias asociadas a la rizósfera de *B. brizantha*. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento Test de Duncan $p < 0,05$.

Al observar la figura 57, se detecta que las mayores poblaciones de bacterias rizosféricas se ubicaron en los tratamientos libres de contaminantes e inoculadas con MA con inóculo nativo, seguido de *A. mellea*. Igualmente se nota, que ante la presencia del contaminante las poblaciones bacterianas experimentan un dramático descenso en todos los tratamientos y las mayores son logradas por los tratamientos inoculados, los cuales se comportan estadísticamente igual.

Una tendencia similar se presenta en las poblaciones de hongos libre, y bajo contaminación. Por otro lado, se nota bajo contaminación, las poblaciones

con el nativo fueron estadísticamente superiores a las con *A. mellea* (figura 58).

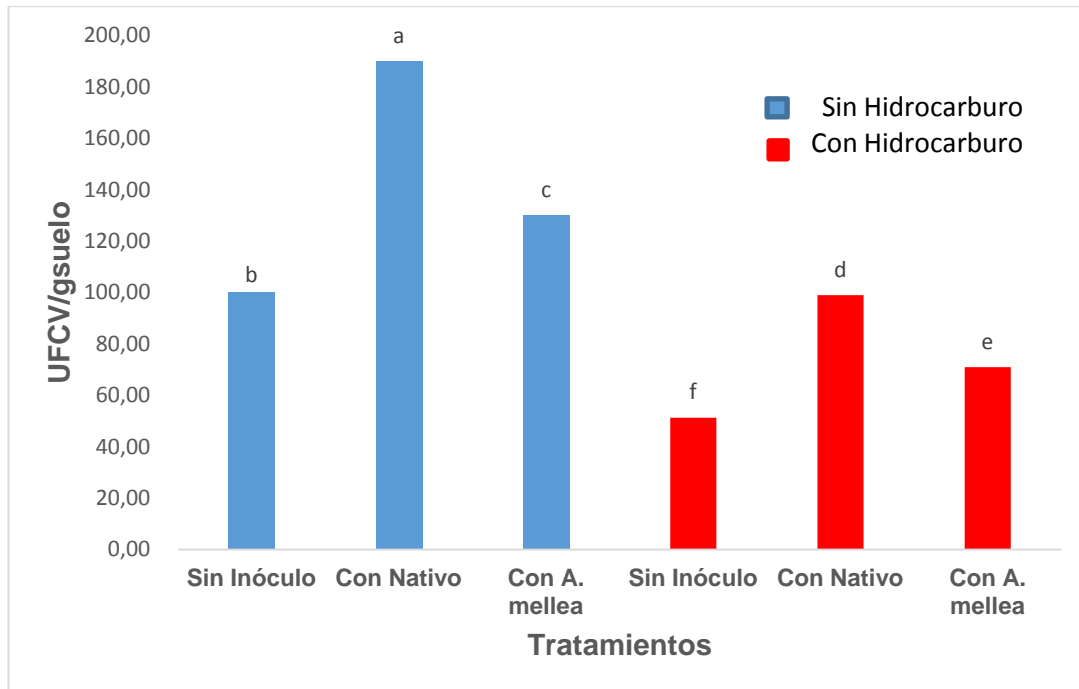


Figura 58. Poblaciones de hongos asociados a la rizósfera de *B. brizantha*. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento Test de Duncan $p < 0,05$.

Las poblaciones microbianas asociados a la rizosfera de *A. macrantha*, evidenciaron un comportamiento similar a las poblaciones microbianas de *B. brizantha*, en condición contaminada y no contaminada. Igualmente las mayores poblaciones la experimentaron los suelos rizosféricos libres del lodo petrolizado, los tratamientos que resultaron superiores en suelo contaminado fueron los inoculados, siendo el mejor con el inóculo nativo (Figura y 59).

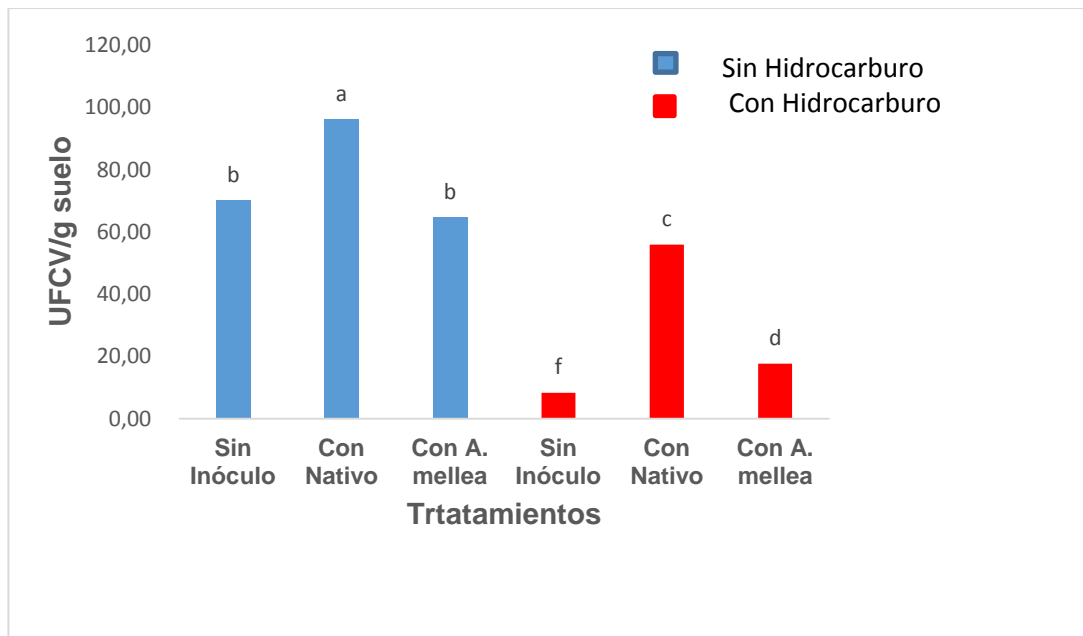


Figura 59. Poblaciones de bacterias aerobias rizosféricas asociadas a la rizósfera de *A. macracantha*. Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento Test de Duncan $p < 0,05$.

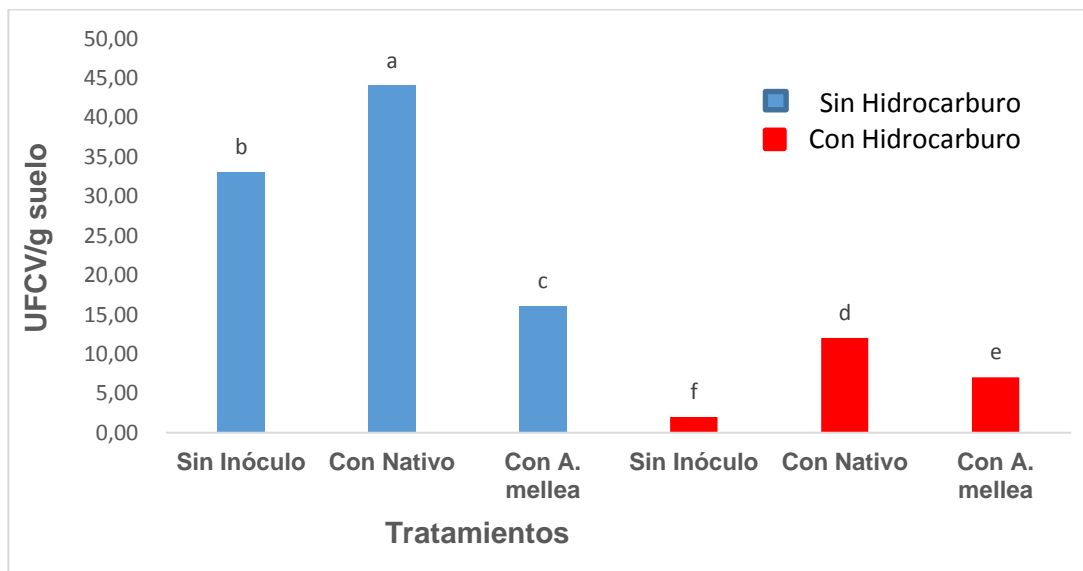


Figura 60. Poblaciones hongos asociados a la rizósfera de *A. macracantha*.

Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento Test de Duncan $p < 0,05$.

Estos resultados pueden indicar:

- a) Que la presencia de hidrocarburo, ejerce un efecto negativo en detrimento de la proporción de las poblaciones de bacterias y hongos.
- b) La existencia de un consorcio microbiano autóctono capaz de ser estimulado por el efecto rizosférico de la planta, por la fertilización.
- c) Que la presencia de la planta, independientemente del tipo de sistema radical, estimuló las poblaciones microbianas.
- d) Que el tipo de sistema radical es fundamental para determinar el tamaño de las poblaciones microbianas en suelos contaminados con petróleo, favoreciendo el incremento de las mismas en el caso de las raíces fibrosas como *B. brizantha*, y desfavoreciendo las mismas en las raíces con predominio de un sistema primario como las Fabáceas.

Estos cambios o variaciones observadas en las poblaciones de microorganismos, podrían ser explicadas a través de lo planteado por Johansson *et al* (2004) , que sugieren que la colonización por hongos AM de raíces de las plantas, pueden afectar las comunidades microbianas asociadas a las raíces a manera interacciones directas e indirectas; directas a través del

suministro de compuestos de carbono ricos en energía derivado de los asimilados que se transportan a la micorrizosfera a través hifas fúngicas, por cambios en el pH de la micorrizosfera inducidos por el hongo, por la competencia por exudación nutrientes, y por compuestos inhibidores o estimulantes del hongo.

Indirectamente, a través de los efectos que ejercen la micorriza sobre el crecimiento de la planta huésped, la exudación de la raíz, y la estructura del suelo.

Estos autores también señalan que así como los hongos MA afectan los microorganismos, éstos últimos pueden interferir los hongos MA a nivel micorrizosférico mediante: (1) en la receptividad a la raíz; (2) en el reconocimiento raíz-hongo; (3) ejerciendo un efecto fungicida; por (4) modificación de la química de la del suelo rizosférico; y (5) efectos sobre la germinación de la propágulos fúngicos.

Resulta indudable la complejidad de las interrelaciones a nivel micorrizosférico. En este sentido, Fitter y Garbaye (1994), resumen los diferentes grupos microorganismos que interactúan con los hongos MA:

1. Organismos puramente saprofiticos- no dependen de la raíz, no compiten por alimento con microorganismos estrictamente rizosféricos o micorrizosféricos, no obstante pueden producir anticuerpos u ocupar

rápidamente nichos ecológicos de la micorrizosfera. Son capaces de utilizar un amplio grupo de moléculas complejas orgánicas como ligninas, proteínas, glicoproteínas, celulosa y otros polisacáridos.

2. Organismos especializados de la micorrizosfera (RPCV - Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal). Son quizás los más importantes ya que compiten por las moléculas orgánicas simples (azúcares, aminoácidos y ácidos orgánicos) liberados por las plantas y los hongos micorrizógenos arbusculares.

3. Patógenos de raíces- organismos biotróficos, su ciclo de vida lo realizan en el interior y exterior del sistema radical. Algunas bacterias, hongos (*Phytium* sp, *Fusarium* sp., *Rhizotocnia* sp., etc.).

4. Simbiontes de raíces- biotróficos y dependientes de las raíces, completan su ciclo de vida dentro y fuera de la raíz. Son beneficiosos a las plantas.

5. Predadores - protozoos, nemátodos, colémbolos y otros insectos.

7.2.5 Identificación de microorganismos aerobios heterótrofos.

Las tablas 14 y 15 muestran los resultados de la caracterización microbiológica de algunos aislados de la fosa la Caracola. De las muestras analizadas se obtuvieron 3 aislados de bacterias y 3 de hongos.

Tabla 12. Características culturales de las bacterias aisladas en la fosa la Caracola.

MEDIO AGAR NUTRITIVO						
MORFOLOGIA COLONIAL						
Aislado	Tamaño (mm)	Color	consistencia	elevación	superficie	forma
<i>Acidovorax</i> (<i>Pseudomonas</i>)	3-5	transparente	friable	convexa	lisa	circular
<i>Erwinia</i> sp.	3-5	crema	friable	convexa	lisa	circular
<i>Xanthomonas</i>	3-5	amarillo	gelatinosa	convexa	lisa	circular

Tabla 13. Características culturales de los hongos aislados la fosa la Caracola

Medio Agar Papa dextrosa	Color	Elevación	Hifas	Esporas
<i>Penicillium</i>	inicialmente blanca luego verde	plana	más o menos erectas	redondeadas
<i>Aspergillus</i>	inicialmente blanca luego gris, otras amarillo	plana	septadas que surge del conidióforo	redondeadas a ovoides
<i>Cladosporium</i>	verde oscuro, con bordes en forma de estrella, y alrededor de un halo blanco	elevada	Gruesas y septadas	elipsoidales

Microscópicamente, las bacterias del grupo *Acidovorax* (*Pseudomonas*), según Willems (1990), están constituidas por microorganismos Gram-negativos, móviles con flagelación polar, con tamaño comprendido 0.5-1.0x1.5-4µm. Se encuentran normalmente en el suelo, y pueden ser patógenos oportunistas. Su metabolismo es siempre respiratorio, o bien aerobio (la mayoría usa como aceptor de electrones O₂), anaerobio (algunos usan NO⁻), sin embargo hay algunos individuos quimiolitotrofos que H₂ o CO como donadores de electrones, y debido a su gran versatilidad metabólica han sido consideradas candidatas para el tratamiento de contaminaciones ambientales producidas por la acumulación de metales pesados o por la acumulación de compuestos xenobióticos (Madigan *et al*; 2004).

Esta bacteria ha sido reportada en plantas de tratamiento de aguas residuales y medios acuáticos (Scweitzer *et al* 2001; Hoshino *et al.*, 2005), suelos y lodos (Heylen *et al*, 2008), y relacionada con comunidades microbianas bacterianas que degradan benceno (Fahy *et al.*, 2005).

Fisiológicamente esta bacteria es quimiolitotrofa oxidante del hidrógeno, para producir ATP o como fuente de poder reductor para el crecimiento autotrófico, es decir que pueden ser quimiolitotrofas facultativas, al ser capaces crecer usando compuestos orgánicos como fuente de energía. Esta habilidad metabólica de pasar de un comportamiento quimiolitotrófo a organótrofo y viceversa, probablemente se produce en la naturaleza para asegurar su

nutrición (Madigan *et al.*, 2004), y posible estrategia para sobrevivir en ambientes inhóspitos.

El segundo aislado obtenido, se corresponde con *Erwinia*, especie no patógena la cual fue identificada de acuerdo a las pruebas convencionales básicas aplicadas señaladas anteriormente y la clave para la identificación como lo establece el Manual de Schaad y Chun (1980).

Esta especie no patógena, está caracterizada por células aisladas, en forma de bacilos rectos de 0.5-1.0 μm . móviles mediante flagelos peritricos, gramnegativos. Pertenecen a un grupo de bacterias entéricas, aerobias facultativas que producen ácido a partir de glucosa, generalmente reducen nitrato a N_2 (Madigan *et al.*, 2004).

Esta cepa actualmente se encuentra aislada y preservada en el laboratorio de Microbiología del Decanato de Agronomía UCLA- Barquisimeto, y representa parte del producto generado de este trabajo de investigación. La intención es resguardarla con fines posteriores de identificación molecular, realización de pruebas de laboratorio y ensayos de campo de futuras investigaciones.

El tercer aislado corresponde al género *Xanthomonas*, las cuales se describen fenotípicamente como bacilos rectos aislados, de 0.4-0.7x 0.7-1.8 μm . Móviles mediante flagelo polar, aerobios, Gram-negativos,

generalmente producen pigmentos amarillos. La mayoría produce polisacáridos extracelulares y una membrana soluble en petróleo, éter metanol y benceno. Quimiorganotróficos: metabolismo respiratorio, aerobios estrictos (Schaad *et al.*, 2001).

En cuanto a los hongos identificados, se logró detectar, el género *Penicillium sp.*, con conidióforos simples, largos, erguidos que se ramifican, a dos tercios del extremo en forma de escoba, los conidióforos se observan globosos. En el género *Aspergillus*, las cabezas conidiales constituyen cadenas que se originan en la célula conidiógena o fiálide. En el género *Cladosporium* los conidióforos son macronematosos o semimacronematosos simples o poco ramificados. Conidios que generalmente quedan en cadenas acrópetas.

7.2.6 Aislamiento, conteo e identificación de microorganismos con potencialidad degradadora de petrolero por el método de dilución y siembra en placa, partiendo del suelo contaminado artificialmente con lodo petrolizado al 4%.

La figura 61 evidencia la presencia de poblaciones de bacterias del género *Erwinia* y *Xanthomonas*, asociadas a la rizosfera de *B. brizantha*, en la cual esta última se encuentra en una elevada población (300 UFCV/g suelo), y manifiesta cierta preferencia con *A. mellea*.

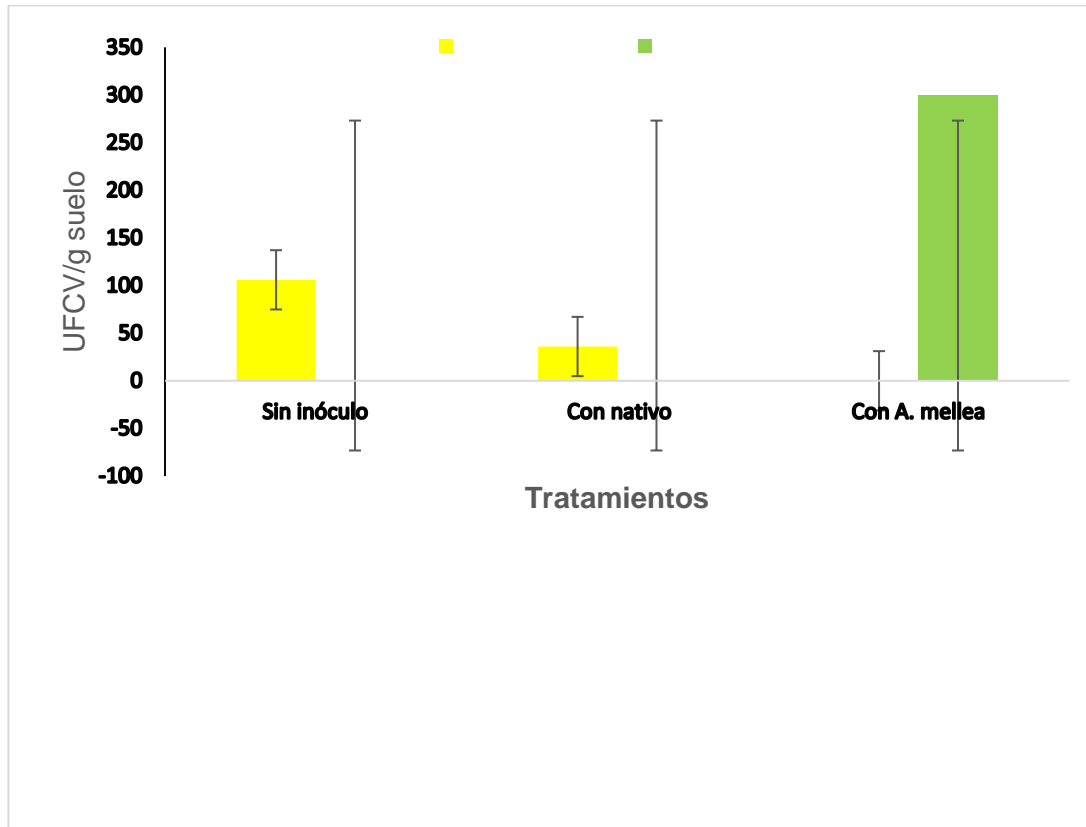


Figura 60. Poblaciones bacterianas potencialmente degradadoras de Iodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de *B. brizantha*. Valores promedio \pm de la desviación estándar.

La figura 62, distingue dos poblaciones de hongos reportados; *Aspergillus* y *Penicillium*. Por un lado *Penicillium* se manifiesta en todos los tratamientos, y por otro lado en consorcio *Aspergillus* con *A. mellea*.

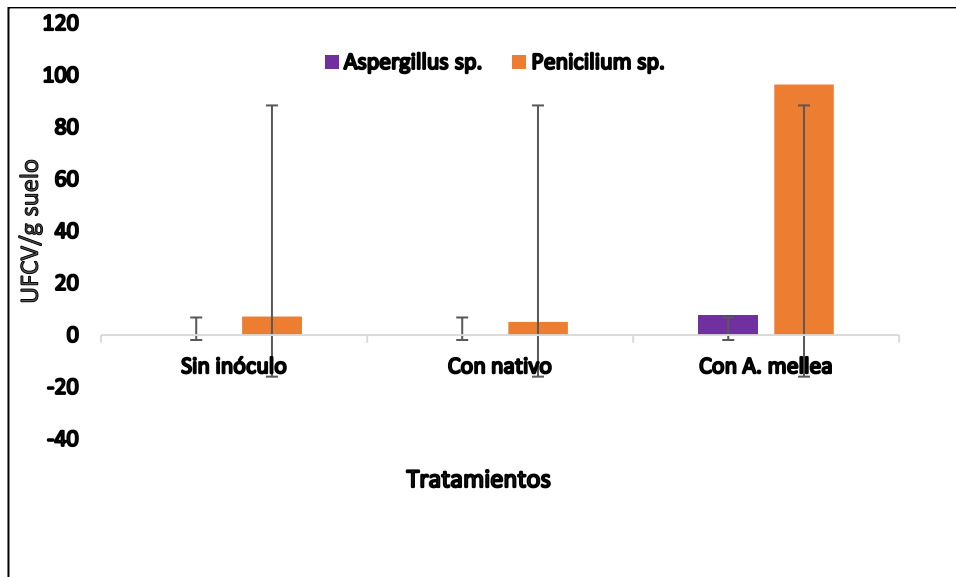


Figura 62. Poblaciones fúngicas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de *B. brizantha*. Valores promedio \pm de la desviación estándar.

Para el caso de *A. macracantha* se muestra la misma tendencia géneros bacterianos y fúngicos asociados a la rizósfera de *B. brizantha*, pero con cierto predominio de consorcios de los mismos en reducidas poblaciones con 20-80 UFCV/g suelo para bacterias, y < 10- 60 UFCV/g para hongos (figura 63 y 64).

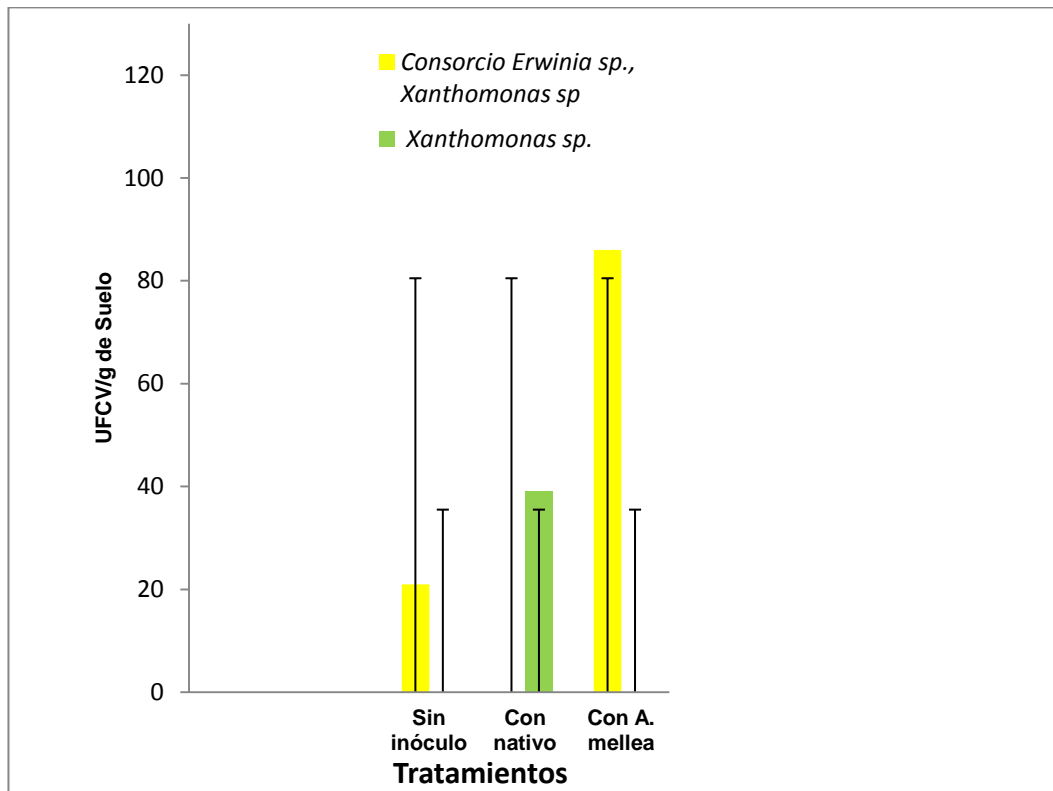


Figura 63. Poblaciones bacterianas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de *A. macracantha*. Valores promedio \pm de la desviación estándar.

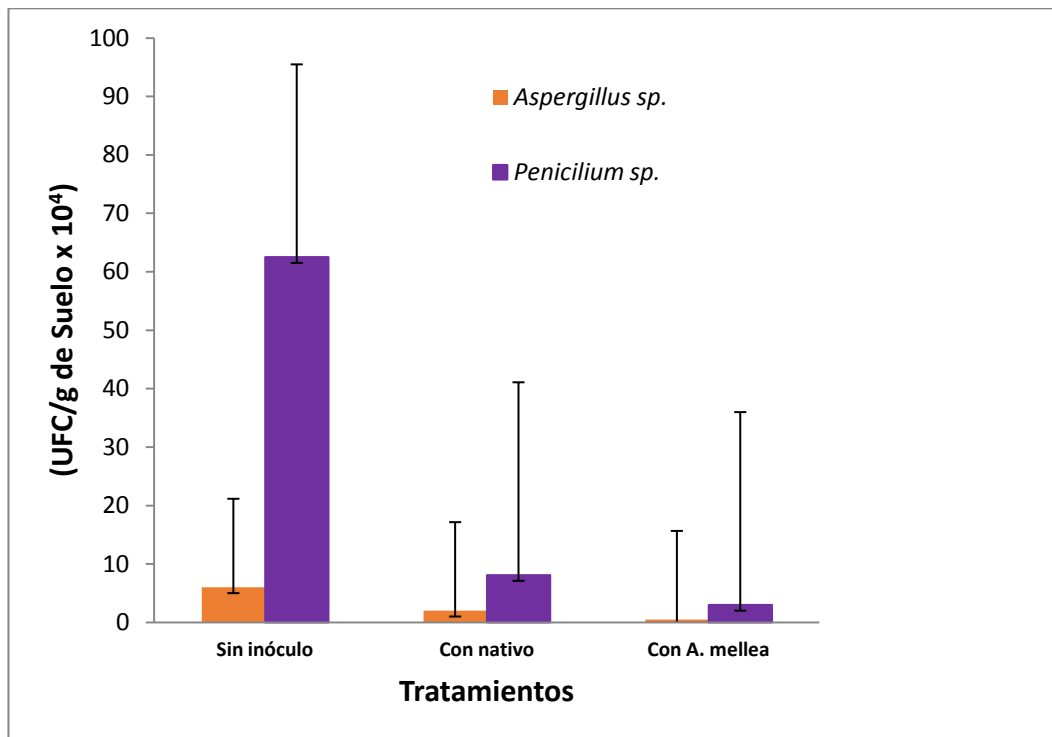


Figura 64. Poblaciones fúngicas potencialmente degradadoras de lodo petrolizado al 4%, asociadas a la rizófera de *A. macracantha*. Valores promedio \pm de la desviación estándar.

En contraste con lo planteado por Meyer y Linderman 1986, los datos parecen indicar que las poblaciones microbianas asociadas a la rizosfera de las plantas micorrizadas tanto de *B. brizantha* como de *A. macracantha* son similares a las no micorrizadas bajo condiciones de contaminación con lodo petrolizado al 4%.

En correspondencia con Mancera *et al.*, (2007), se confirma la presencia tanto *Penicillium* como *Aspergillus* como géneros de hongos capaces de crecer fuera de su habitat, en una mezcla de hidrocarburos constituida por hidrocarburos.

De forma semejante a Sylvia *et al.*, (2001), esta investigación es el reflejo de la existencia y pocos géneros bacterianos y fúngicos capaces de tolerar condiciones de suelo contaminado con lodo petrolizado al 4 %, y de la biotrofia planta-hongo Glomeromycota (Bever, 2002). La identificación de solo 3 géneros bacterianos y 3 géneros fúngicos, concuerdan con lo señalado por Díaz *et al.*, (2008), donde indica que la baja diversidad, o alta especialización, se produce en el suelo perturbado debido primero, a la extinción de las poblaciones que carecen de tolerancia para el cambio, y segundo al enriquecimiento selectivo de las poblaciones que toleran o prosperan bajo las nuevas condiciones, y al efecto micorrizosférico.

Con este método de aislamiento, además aislar el género *Erwinia*, se logró la identificación de dos géneros más: *Xanthomonas* y *Acidovorax* (*Pseudomonas*); géneros identificados durante el conteo general.

Por otro lado se puede inferir de acuerdo a este estudio que no existe un patrón metodológico único, o tipo de microorganismos estipulado para remediar un tipo de suelo. Ambos géneros bacterianos; tanto *Erwinia* como *Acidovorax*

(*Pseudomonas*), podrían ser microorganismos prometedores en la degradación de hidrocarburos en suelos venezolanos contaminados con petróleo, toda vez que sean identificados molecularmente, probados y monitoreados a nivel de invernadero y campo, antes de su utilización .

Uno de los género de hongos corroborados con esta metodología fue *Penicillium sp*, el cual ha sido reportado por Bento y Gaylarde (2001), Potin *et al.*, (2004) y por Chen *et al.*, (2006), como un hongo capaz de metabolizar hidrocarburos de petróleo, a través de diversos mecanismos y vías metabólicas, mediante los cuales los hongos disponen para transformar una gran variedad de compuestos orgánicos para llevarlos hasta compuestos más simples. Ese potencial radica fundamentalmente en las características de su sistema enzimático y en su vigoroso crecimiento que les permite, a través del desarrollo de su micelio, colonizar diferentes tipos de sustratos y acceder a los compuestos que constituyen las contaminaciones más frecuentes de los suelos (Hughes *et al.*, 2007).

Otro de los microorganismos confirmado en este estudio es hongo *Aspergillus sp.* (Figura 65), reconocido como uno de los hongos hidrocarbonoclastas (capaces de degradar hidrocarburos) de mayor importancia, el cual tiene la particularidad de crecer rápidamente en petróleo crudo (April *et al.*, 2000). Ha sido aislado de refinerías evidenciando actividad

degradativa del fenol a través de diversas enzimas oxidativas extracelulares (Chen *et al.*, 2006).

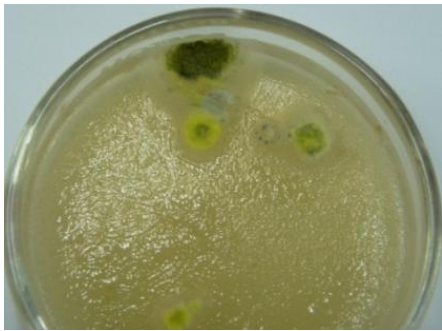


Figura 65. Aspecto general de las colonias de hongos aisladas de la fosa la Caracola en agar lodo petrolizado al 4%.

Según La Grega *et al.* (2002) las bacterias, hongos y levaduras son las responsables de las reacciones de biodegradación. Estos acotan también que aunque dichas reacciones forman parte normal del metabolismo de una célula bacteriana, el objetivo de estos microorganismos no es la eliminación de los contaminantes ambientales; sino crecer y mantenerse, es por ello que existe un incremento de la carga bacteriana como consecuencia de la degradación de los HTP; en la se evidencia el crecimiento de la carga bacteriana mesófila en el tiempo.

Posiblemente en este estudio se ponga de manifiesto el efecto micorrizosférico de cada inóculo, que según Sarand *et al* (2000), se ejerce cuando el suelo circundante del micelio del hongo proporciona un hábitat

adecuado para las diversas comunidades de microorganismos, debido a la mayor disponibilidad de sustratos de alta energía y superficies para la colonización radical.

7.2.7 Aislamiento e identificación de microorganismos con potencialidad degradadora de petrolero por el método de enriquecimiento hasta el 4%

Con la aplicación de esta metodología, se apoyó el crecimiento de microorganismos más especializados (que no crecen en medios ordinarios), y se facilitó el crecimiento de los mismos. Se obtuvo el aislamiento de los géneros bacterianos; *Acidovorax* (*Pseudomonas sp*) y *Erwinia sp* (figura 66).

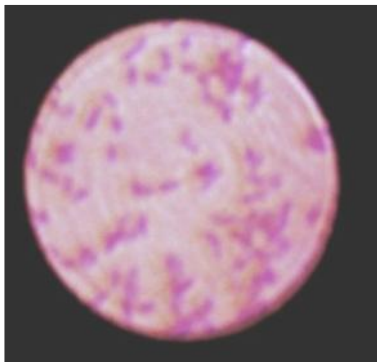


Figura. 66 .Tinción Gram del género *Erwinia* en agar lodo petrolizado al 4% (100X).

Varias especies del género *Pseudomonas* han sido identificadas molecularmente, con capacidad biodegradadora de hidrocarburos, por contener plásmidos en los que se encuentran codificadas enzimas capaces de

degradar, al menos parcialmente, compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosfatados (Pérez *et al.*, 2002). Estas enzimas suelen ser inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede permitir reducir los niveles de contaminación por estos compuestos xenobióticos. Al igual que *Agrobacterium tumefaciens*, la especie *P. aeruginosa*, es capaz de producir biosurfactantes como los rannolípidos durante la fase estacionaria de su crecimiento, los cuales permiten la remoción de aceites y productos relacionados (Nelson *et al.*, 2002) en las primeras etapas del proceso de biorremediación (Demaneche *et al.*; 2001).

- ✓ Finalmente, con la aplicación de estas dos metodologías de aislamiento se pudo:
- ✓ Ratificar la presencia del género bacteriano *Erwinia sp* (género no fitopatogénico).
- ✓ Revelar la “sensibilidad” que presenta *Erwinia sp* a ser cultivable en medios enriquecidos y medios contaminados con petrolizado al 4%.
- ✓ Confirmar la presencia de los hongos *Aspergillus sp* y *Penicillium sp*, pero no *Cladosporium sp*.

Entre las desventajas encontradas con la aplicación de ambas metodologías, es el desarrollo conjunto tanto bacterias como hongos, lo cual dificulta la discriminación de sus poblaciones y por ende su estimación.

Otra limitación encontrada con el empleo de ambas metodologías, y que apoya lo expresado por Meyer y Linderman (1986), es que muchos microorganismos no crecen tan fácilmente en medios artificiales.

7.2.8 Supervivencia de plantas al impacto del lodo petrolizado

Los resultados que aquí se presentan y discuten, corresponden a las evaluaciones del número y porcentaje de supervivencia de las plantas bajo el efecto de los variados tratamientos, durante los tres meses que duró esta fase de investigación en la cual se hicieron mediciones mensuales.

La tabla 14, describe los alcances obtenidos con la especie *B. brizantha*, evidenciando que el % de supervivencia y el promedio del número de plantas por tratamiento fue mayor en las plantas crecidas sin efecto del hidrocarburo.

Tabla 14. Número promedio de plantas y supervivencia de *B. brizantha* a los 3 meses de experimentación.

Suelo	Inóculo	% Supervivencia	Número promedio de plantas
Sin hidrocarburo	Sin Inóculo	21	2,625 (bc)
	Con Nativo	26	3,25 (ab)
	Con A. mellea	28	3,5 (a)
Con Hidrocarburo	Sin Inóculo	12	1,50 (d)
	Con Nativo	16	2,00 (cd)
	Con A. mellea	18	2,25 (c)

Significancia efecto simple (suelo) **
 Significancia efecto simple (Inóculo) **
 Significancia efecto interacción (Suelo x Inóculo) NS
 CV: 29

Estas diferencias fueron respaldadas estadísticamente según ANAVAR, además la prueba de rango múltiple de Duncan confirmó la superioridad del tratamiento inoculado con *A. mellea* sin influencia del contaminante, seguido en orden decreciente por el inoculado con nativo sin contaminación, el no inoculado sin lodo petrolizado, el inoculado con *A. mellea* contaminado, el inoculado con nativo contaminado y por último el sin inoculación contaminado.

Se destaca entonces dos aspectos importantes de lo anterior: primero, un efecto detrimental del contaminante en la supervivencia de las plantas, lo cual coincide con Orozco *et al.*, 2014, y segundo, un beneficio de los inoculos en el desarrollo de las plantas bajo contaminación, especialmente *A. mellea*.

Para el caso de *A. macrcantha* la tabla 15, presenta los resultados de las observaciones respectivas, evidenciando que como en el caso de *B. brizantha*, se encontraron variaciones de los valores del número de plantas y porcentaje de sobrevivencia, pero en este caso hubo diferencias significativas al 5% de acuerdo al ANAVAR, sólo para el efecto simple del inóculo. Con la prueba de comparación de medias de Duncan, las medias se ajustaron en dos grupos: uno conformado por los tratamientos sin hidrocarburo mas inóculo nativo, sin hidrocarburo mas *A. mellea* y el de hidrocarburo mas *A. mellea*; el

otro grupo formado por los tratamientos con hidrocarburo mas nativo; con hidrocarburo sin inóculo y sin hidrocarburo sin inóculo.

Tabla 15. Número promedio de plantas y sobrevivencia de *A. macracantha* a los 3 meses de experimentación

Suelo	Inóculo	% Sobrevivencia	Número promedio de plantas
Sin hidrocarburo	Sin Inóculo	56,25	2,25
	Con Nativo	65,6	2,625
	Con A. mellea	75	3,00
Con Hidrocarburo	Sin Inóculo	56,25	2,25
	Con Nativo	62,5	2,50
	Con A. mellea	68,75	2,75
Significancia efecto simple (suelo)			ns
Significancia efecto simple (Inóculo)			*
Significancia efecto interacción (Suelo x Inóculo)			ns
CV : 23,81 %			

En general, la tendencia en las plantas de *A. macracantha* fue hacia un menor número de plantas sobrevivientes hacia el tercer mes

Todo parece indicar que ambas especies de plantas pueden adaptarse a la presencia de petróleo y sobrevivir.

7.2.9 Contenido de grasas y aceites

La primera columna de la tabla 16, indica la concentración de aceites y grasas inicial expresada en porcentaje del 4 % (equivalente a 40000 mg/ kg de suelo), a partir del cual se inició el experimento en cada tratamiento. La segunda columna corresponde a los valores de cuatro repeticiones reportados de grasas y aceites por el laboratorio de Desechos Tóxicos de la Unidad de Gestión Ambiental USB- Caracas, luego de 3 meses de experimento, y la última columna corresponde a la diferencia del contenido inicial, menos el final.

Tabla 16. Porcentaje inicial y final de grasas y aceites en los diferentes tratamientos de *B. brizantha* y *A. macracantha*.

Tratamientos	Aceites y Grasas inicial (%)	Aceites y Grasas final (%)				Diferencia Aceites y grasa (%)			
		R1	R2	R3	R4	R1	R2	R3	R4
<i>B. brizantha</i>	4	2,24	3,10	2,8	3,16	1,75	0,9	1,19	0,84
<i>B. brizantha</i> + inóculo nativo	4	0,85	0,78	0,81	0,80	3,15	3,22	3,19	3,2
<i>B. brizantha</i> + <i>A. mellea</i>	4	2,73	2,92	2,25	1,78	2,27	1,08	1,75	2,22
A. <i>macracantha</i>	4	3,66	3,35	3,42	3,53	0,34	0,65	0,58	0,47
A. <i>macracantha</i> + inóculo nativo	4	2,37	2,83	2,67	3,01	1,63	1,17	1,33	0,99
A. <i>macracantha</i> + <i>A. mellea</i>	4	3,18	3,05	2,75	3,01	3,18	3,05	2,75	3,01
Suelo desnudo	4	3,33	3,98	3,99	3,93	0,67	0,02	0,01	0,07

Nota: R1, R2, R3 y R4 representan el promedio del número de repeticiones

Los resultados indican a término de tres meses de experimentación, que todas las muestras contienen restos de hidrocarburos remanente, igualmente se observa que hubo una reducción del contenido de grasas y aceites en todos los tratamientos y la mayor reducción de (3,22%) en *B. brizantha* más inóculo nativo. Por otro lado se lograron valores inferiores al valor límite del 1 % previsto en la normativa ambiental venezolana (República de Venezuela, 1998).

7.2.10 Porcentaje de Biodegradación

La fitorremediación fue comprobada en base al porcentaje de degradación de HTP logrado en los diferentes tratamientos con las especies *B. brizantha* y *A. macracantha* en un período de 3 meses que duró la fase experimental de invernadero. Los resultados fueron sometidos a análisis de varianza y pruebas de media y son presentados en las tablas 17 y 18.

Tabla 17. Tasa de biodegradación de HTP en los diferentes tratamientos con plantas de *Brachiaria brizantha* durante un período de 3 meses.

Tratamiento	% de Degradación
Planta sin inóculo	23 c
Con inóculo nativo	79,75 a
Con <i>A. mellea</i>	45,63 b
C.V.	17,88

Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$). Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento

Tabla 18. Tasa de biodegradación de HTP en los diferentes tratamientos con plantas de *Acacia macracantha* durante un período de 3 meses.

Tratamiento	% de degradación
Planta sin inóculo	12.563 c
Con inóculo nativo	31.813 b
Con <i>A. mellea</i>	74.938 a
Significancia	*
C.V.	13,75

Separación de las medias en las columnas según la prueba de Duncan ($P \leq 0,05$)
 Letras iguales indican que no hay diferencias significativas entre tratamiento

Ambas tablas, muestran diferencias significativas a $P \leq 0,05$, entre los tratamientos estudiados; siendo para *B. brizantha*, la inoculación con el compuesto nativo, la que resultó con la mayor tasa de degradación con un 79,75%, seguido por los tratados con *A. mellea* que marcaron una descomposición del 45,63% y por último el sin inóculo con 23%.

Para lo correspondiente a *A. macracantha*, la degradación en el tratamiento con inoculación con *A. mellea* registró un valor de 74,94%, superando al inóculo nativo que marcó una cifra del 31,81% y este a su vez superando al tratamiento sin inocular que logró sólo 12,56%.

Los valores de las tasas de degradación del hidrocarburo en presencia de *A. mellea*, podrían estar relacionados al efecto micorrizosférico de este hongo y a la actividad microbiana en la zona rizosférica de consorcios

representados por bacterias tales como *Acidovorax* (*Pseudomonas sp*), *Erwinia sp.* y *Xanthomonas*, y hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*. También una fracción mínima de esta degradación pudo deberse al indiscutible proceso de volatilización natural del hidrocarburo, producto de la elevada temperatura en el ambiente del experimento ($\pm 37^{\circ}\text{C}$ en promedio mensual).

En los resultados anteriores, similarmente a los reportados por Merkl *et al.*, (2006), la degradación del lodo petrolizado en los tratamientos con *B. brizantha*, puede ser correlacionada con los consorcios fúngicos no Glomeromycota y, refuerzan lo planteado por Małachowska y Kalka (2010), que indican que la sola presencia de bacterias u hongos por sí solo, no es tan eficaz como la combinación con la inoculación con hongos MA.

Similarmente con Gamal (2005), la inoculación con hongos MA, puede mejorar el saneamiento en la rizósfera alentando el crecimiento saludable de las plantas y mejorando así la actividad microbiana, crecimiento y tolerancia de las plantas tolerantes a hidrocarburos, por lo que éstas últimas facilitarían sumidero de contaminantes.

Coincidentalmente, ciertos géneros bacterianos reportados por Purushothaman *et al.*, (2010), en su capacidad de tolerar y degradan hidrocarburos, y algunos hongos filamentosos identificados por Mancera *et al.* (2008), en la remoción de hidrocarburos totales de petróleo, hidrocarburos

policíclicos aromáticos e hidrocarburos alifáticos, fueron reconocidos en este estudio.

Del mismo modo, como Małachowska y Kalka (2010), se podría asumir en este estudio, que los hongos MA contribuyen de manera eficiente en la eliminación de derivados de petróleo y desempeñar un papel en la fitorremediación mediante la mejora de la planta, su establecimiento y crecimiento en suelos contaminados Joner y Leyval (2003).

Todas las evidencias señaladas anteriormente, indican que los resultados de esta investigación apuntan a que el mecanismo de fitorremediación que podría prevalecer en este estudio es la rizodegradación, donde según Infante *et al.*, (2012), las poblaciones microbianas y la actividad en la rizosfera se pueden incrementar como resultado de la presencia de exudados de la raíz, y lograr un aumento de la biodegradación de contaminantes orgánicos en el suelo, conduciendo al co-metabolismo de los contaminantes en la rizósfera. Por otro lado, el potencial que pueden tener estas dos especies de plantas para descontaminar suelos con concentraciones de crudo liviano inferiores o iguales al 4%.

Igualmente se puso en manifiesto el papel concluyente que puede desempeñar la inoculación con hongos Glomeromycota, y la microflora asociada de plantas, en un suelo artificialmente contaminado con lodo

petrolizado, donde la microbiota asociada a *A. mellea* en la zona rizosférica de *Brachiaria brizantha* y *Acacia macrantha* mostrada anteriormente, conjuntamente con los altos valores de biodegradación, podrían ser indicadores de rizorremediación del lodo petrolizado en las zonas rizosféricas de estas especies.

Por último se considera prudente aclarar que, como la contaminación de los tratamientos con el lodo petrolizado se hizo en un porcentaje del 4% en base a peso (100gr de lodo por 2,5 kg de suelo), y como una fracción de este lodo queda retenido (20%), es decir, no es biodregradable, el valor comparativo inicial procedente sería tomar 3,2% como contaminación tangible, para ajustar el porcentaje de degradación logrado en este experimento. Con ello no se estaría variando la cantidad real de lo degradado, pero si se reflejaría en un porcentaje mayor en los resultados.

CONCLUSIONES

- Se aislaron e identificaron 27 morfotipos de hongos Glomeromycota, de los posibles géneros identificados, el 86,21% se ubicó dentro de *Glomus*, 10,34% en *Acaulospora*, y un 3,45% en *Entrophospora*.
- Se identificaron 8 especies vegetales distintas con potencial fitorremediador, siendo la especie con mayor mayor frecuencia de aparición *Fimbristylis cymosa* (65,33%) de la familia *Cyperaceae*, seguida de *Andropogon angustatus* (13,33%) de la familia *Poaceae*.
- La contaminación con lodo petrolizado al 4% ejerce un efecto negativo sobre los principales parámetros morfométricos de las plantas (altura, peso seco del vástago y relación vástago raíz) de *Brachiaria brizantha* y *Acacia macracantha*, resultando las menos afectadas las crecidas bajo inoculación.
- La utilización del inoculante nativo y el de *A. mellea*, favorecen la tolerancia de las plantas *B. brizantha* y *A. macracantha* a condiciones

de contaminación de 4 % de lodo petrolizado, lo que pudo asegurar su sobrevivencia al término de los 3 meses de experimentación.

- El porcentaje de colonización y número de esporas de MA fue afectado por la contaminación con lodo petrolizado al 4%.
- Se identificaron los géneros bacterianos *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas sp.*, *Acidovorax sp.*, y los fúngicos *Penicillium sp* y *Aspergillus sp.*, dentro del consorcio microbiano del suelo.
- La mayor tasa de degradación de lodo petrolizado (79,75%), se consiguió en plantas *B. brizantha* con el inoculante nativo. En *A. macracantha* el valor máximo de la degradación fue del 74,94% en las inoculadas con *A. mellea*.
- Los valores de las tasas de degradación del hidrocarburo en presencia de los inóculos nativo y de *A. mellea*, podrían estar relacionados al efecto micorrizosférico de estos hongos y a la actividad microbiana en la zona rizosférica de consorcios representados por bacterias tales como *Acidovorax (Pseudomonas sp)*, *Erwinia sp.* y *Xanthomonas*, y hongos como *Penicillium* y *Aspergillus*.
- El mecanismo de fitorremediación que pudo prevalecer en este estudio es la rizodegradación, tomando en cuenta el potencial que

tienen las especies *Brachiaria brizantha* y *Acacia macracantha*, para descontaminar suelos con concentraciones de crudo liviano inferiores o iguales al 4%.

- Este estudio ratificó el papel decisivo que pueden asumir los hongos MA en la eliminación de derivados de petróleo contaminantes del suelo, razón por la cual deberían ser considerados en Venezuela entre los planes de fitorremediación.

RECOMENDACIONES

- Repetir la misma investigación, pero utilizando 5% de lodo petrolizado y monitoreo el proceso de biodegradación durante el tiempo de experimentación.
- Incluir ensayos de toxicidad recomendado Infante y Morales (2012).
- Comprobar la capacidad biorremediadora de la bacteria *Erwinia* a varias concentraciones de lodo petrolizado
- Diseñar inóculos monospóricos nativos para evaluar su potencialidad biorremediadora de hidrocarburos.
- Evaluar las especies vegetales autóctonas con fines de uso en la fitorremediación.

ANEXOS DE FIGURAS

Figura i Puntos de muestreo del lodo petrolizado en la fosa la Caracola

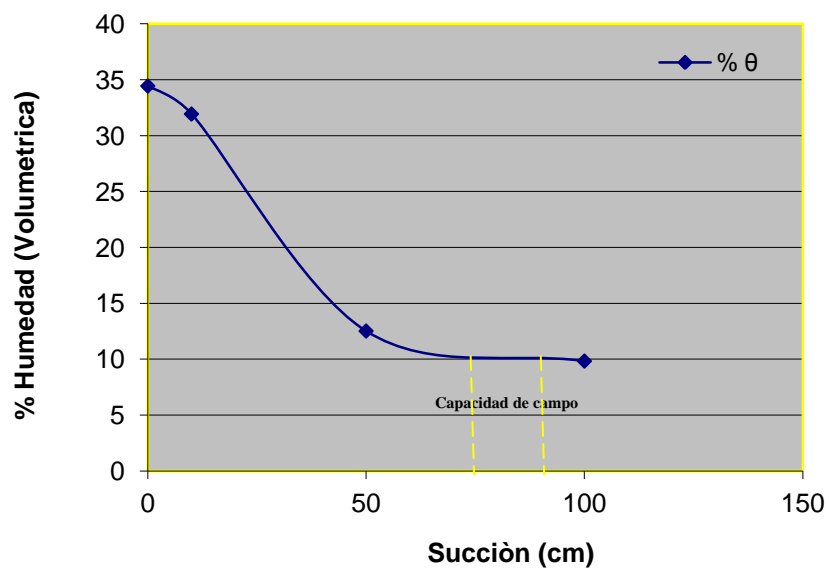


Figura ii. Curva de retención de humedad a capacidad de campo del suelo de la fosa la Caracola.



Figura iii. Vista general y distribución de los tratamientos dentro del invernadero.



Figura iv. Aspecto general del fermentador diseñado



Figura v. Aspecto del rebrote de *B. brizantha*

ANEXOS DE TABLAS

Tabla i. Composición de fórmula nutritiva aplicada solución Nutritiva Christine Hepper y O'Shea (1984)

Compuesto	g por litro de solución
Mg SO ₄ .7H ₂ O	18.4
K ₂ SO ₄	62.15
Ca (NO ₃) ₂ .4H ₂ O	350
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	2.6
FEEDTA-Na	2.3
MnSO ₄ .4H ₂ O	23.3
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,9
CuSO ₄ .5H ₂ O	2.4
H ₃ B0 ₄	16.6
((NH ₄) ₆ Mo ₇)O ₂₄ .4H ₂ O	0.35
(NH ₄) ₂ SO ₄	189

Ajustar a pH 6,8-7.

Tabla ii. Análisis químico de suelo no rizosférico de la Fosa la Caracola

Resultados de Análisis de Suelo

Código	Identificación	%	mg.kg ⁻¹	%	%	mg.kg ⁻¹			
		Nitrogeno Total	Fósforo	Sodio	Materia Organica	R1:1 pH	Ni	Cr	Pb
408050006	Fosa la Caracola	0,007	3,89	78,4	0,38	5,76	ND	ND	ND

Tabla iii. Cálculos para estimar la capacidad de campo del suelo de la fosa la Caracola.

N°Cilind	P.satur	P Cil.	Ps.10cm	Ps.seco	M Seca	Vol. Cil.	%hsaturad a	F10	Fmt	Fm
d36	201.27	27.2	199.5	177.6	150.4	90.475	26.2	1.96	26.16	24.21
b36	208.64	27	205.6	175	148.0	90.475	37.2	3.36	37.18	33.82
d26	209.09	27.1	207.1	172.9	145.8	90.475	40.0	2.20	40.00	37.80

N°Cilind	P.satur	P Cil.	ps 50cm	Ps.seco	M Seca	Vol. Cil.	%hsaturad a	f50	Fmt	Fm
d36	201.27	27.2	185.6	177.6	150.4	90.475	26.2	17.32	26.16	8.84
b36	208.64	27	184.8	175	148.0	90.475	37.2	26.35	37.18	10.83
d26	209.09	27.1	189.1	172.9	145.8	90.475	40.0	22.09	40.00	17.91

N°Cilind	P.satur	P Cil.	ps 100cm	Ps.seco	M Seca	Vol. Cil.	%hsaturad a	f100	Fmt	Fm
d36	201.27	27.2	180.9	177.6	150.4	90.475	26.2	22.51	26.16	3.65
b36	208.64	27	180.1	175	148.0	90.475	37.2	31.54	37.18	5.64
d26	209.09	27.1	185	172.9	145.8	90.475	40.0	26.63	40.00	13.37

	%HSATURAD	Q.10	F.100	Q.50	F.10	Q100	F.50	AGUA DISP	AIRE DISP
	26.2	24.206	22.51	8.84	1.96	8.84	17.32	15.36	1.96
	37.2	33.821	31.54	10.83	3.36	9.84	26.35	22.99	3.36
	40.0	37.800	26.63	17.91	2.20	10.84	22.09	19.89	2.20
Promedi	34.45	31.94	26.90	12.53	2.51	9.84	21.92	19.42	2.51
Desvest	7.31	6.99	4.52	4.76	0.75	1.00	4.52	3.84	0.75
CV	21.23	21.88	16.81	38.03	29.94	10.16	20.61	19.76	29.94

LITERATURACITADA

- Akiyama, K. & Hayashi, H. (2006). Strigolactones: Chemical Signals for Fungal Symbionts and Parasitic Weeds in Plant Roots. *Annals of Botany* (97), 925–931.
- Alarcón, A. (2001). Actualización de la taxonomía de los Glomales. *Terra latinoamericana*, 19, (1), 103-104.
- Alarcon, C. & Cuenca, G. (2005). Arbuscular Mycorrhizal in coastal and sand dunes of the Paraguaná Peninsula, Venezuela. *Mycorrhiza*, 16, (1), 1-9.
- Alarcón, A. & Ferrera, R. (2000). *Ecología, fisiología y biotecnología micorriza arbuscular.* , Mundi-prensa. Universidad Autónoma de Chapingo. México: Capingo
- Aliasgarzadet, N. & Salen, N. & Towfighi, H. (2001). Occurrence of arbuscular mycorrhizal fungi in saline soil of the Tabriz plain of Iran in relation to some physical. *Mycorrhiza*, (11), 119-122.
- April, T. & Foght, J. & Currah, S. (2000). Hydrocarbon degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* (46): 38-49.
- Aycachi R. (2008). Bacterias degradadoras de petróleo. Biodegradación de petróleo diesel. Facultad de Ciencias Biológicas Departamento de Microbiología y Parasitología Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallos. (Lambayeque, 04 de abril). Consultado el día 15 de Octubre de 2012. Web: <http://es.scribd.com/doc/6437940/>.
- Atlas, B. (2002). *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* Ed. Addison Wesley. Madrid. p561.
- Azcón, J. & Talón, M. (2000). *Fundamentos de fisiología vegetal.* (1era. Ed., pp. 515). Universidad de Barcelona. Valencia.-España
- Azcón, C. & Palenzuela, J. & Roldan, A. (2002). Analysis of the mycorrhizal potential in the rhizosphere of representative plant species from desertification-threatened Mediterranean shrublands. *Applied Soil Ecology.* 21, 1-9.
- Badillo, V. & Schee, L. (1965). *Clave de las familias de plantas superiores de Venezuela.* Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay - Venezuela.

- Bago, B. & Azcón, C. & Shachar, Y. & Pfeffer, P. El micelio externo de la micorriza arbuscular como puente simbiótico entre la raíz y su entorno. En: Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular. (Ed), (2000). A. Alarcón y R. Ferrera - Cerrato. IRENAT. Colegio de Postgraduados. Montecillos. Mundi Prensa. México. Pp. 78 – 92.
- Balestrini, R. & Lanfranco, L. (2006). Fungal and plant gene expression in arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mycorrhiza*, (16), 509–524.
- Balseiro, A.& Espi, A. & Márquez, I.& Pérez, V.& Ferreras, M.& Marín, J.& Prieto, J.(2005). Pathological features in marine birds affected by the prestige's oil spill in the north of Spain. *Journal Wildlife Diseases* 41, 371-378.
- Banks, M. & Govindaraju, R. & Schwab, A. & Kulakow, P. (2000). Effect of soil depth anroot surface area on phytoremediation efficiency. In: *Phytoremediation of Hydrocarbon-Contaminated Soil*, (Fiorenza, S., Oubre, C.L., and Herb Ward, C., Eds.). (pp. 29–44). Boca Raton, FL, CRC
- Barea, J. & Pozo, M. & Azcon, R. & Azcon, C. (2005). "Microbial co-operation in the rhizosphere." *Journal of Experimental Botany*, 56(417), 1761-1778.
- Bending, G. & Aspray, T. & Whipps J. (2006). Significance of Microbial Interactions in the Mycorrhizosphere. *Advances in Applied Microbiology*, (60), 97-132.
- Besserer, A. & Puech, V. & Kiefer, P. & Gomez, V. & Jauneau, A & Roy, S. & Portais, J. & Roux, C. & Beécard, G. & Séjalon, N. (2006). Strigolactones stimulate arbuscular mycorrhizal fungi by activating mitochondria. *PLoS Biol.*, 4(7), 1239-1247.
- Bento, F. & Gaylarde, C. (2001). Biodeterioration of stored diesel oil: studies in Brazil. *Internat.Biodeterior.Biodegr*, 47(2),107-112.
- Bever, J. (2002). Negative feedback within a mutualism: Host-specific growth of mycorrhizal fungi reduces plant benefit. *Proceedings of the Royal Society of London* 269, 2595-2601.
- Bonfante, P. & Anca, I.(2009).Plants, mycorrhizal fungi, and bacteria: a network of interactions. *Annual Rev. Microbiol.* (63), 363–383.
- Bongkeun, S. & Palleroni, M. (2000).Isolation and characterization of diverse halobenzoate degradingdenitrifying bacteria from soils and sediments.*Applied and Environmental Microbiology*, 66,(8),3446-345.

- Buée, R. & Jauneau, A. & Ranjeva, R. & Bécard, G. (2000). The pre-symbiotic growth of arbuscular mycorrhizal fungi is induced by a branching factor partially purified from plant root exudates. *Mol Plant Microbe Interact.* (13),693–698.
- Bravo, S. 2000. Aspectos básicos de química de suelos. (Ed Universidad Ezequiel Zamora. Colección Ciencia y Tecnología. p 249. Barinas.
- Brandt, R. & Merkl, N.& Schultze, R.& Infante C. (2006). Potential of vetiver (*Vetiveria zizanioides* L. Nash) for phytoremediation of hydrocarbon contaminated soils in Venezuela. *International Journal of Phytoremediation*,(8),273-284.
- Brito, C. & Rodella, R. (2002). Caracterização morfo-anatômica da folha e do caule de *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf eB.humidicola (Rendle) Schweick.(Poaceae). *Revista Brasil. Bot.*, 25, (2), 221-228.
- Brundrett, M. (2002).Coevolution of roots and mycorrhizas of land plants. *New Phytol.* 154, 275-304.
- Camargo, S. (2002). Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, 71: 33-44.
- Camelo M. & Vera, P. & Bonilla, R. (2011). Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal *Revista Corpoica - Ciencia y Tecnología Agropecuaria*, 12, (2), 159-166.
- Cardoso Navarro & M. Noguera. (2003). Asorção e traslocação de manganês por plantas de soja micorrizadas, sob doses crecentes deste nutriente. *R. Brass.Ci.Solo*, (26),125-134.
- Clark, F. (1965). Agar plate method for total microbial count.In: Black, C.A. (ed.). *Methods of soil analysis. Agronomy 9.Part 2.American Society Agronomy. Madison, WI pp. 1460-1466.*
- Caproni, A. & Franco, A. & Berbara, R. & Truferri, S. & De Oliveira, J. & Monteiro, A.(2003). Ocorrência de fungos micorrizicos arbusculares en áreas revegetadas após mineração de bauxita en Porto Trombetas, Pará. *Pesq.Agropec.Bras.Brasilia* 38, (12), 1409-1418.
- Cerniglia, C. & Sutherland, J. (2001). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by ligninolytic and nonligninolytic fungi. In *Fungi in Bioremediation* Cambridge University Press, UK. ed. G. M. Gadd.

- Cerón, L. & Melgarejo, L. (2005). Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana*, 10 (1), 5-18.
- Chacín, F. (2000). Diseño y análisis de experimentos Ediciones del Vicerrectorado Académico Universidad Central de Venezuela.
- Chen, B. & Zhu, Y. & Smith F. (2006). Effects of arbuscular mycorrhizal inoculation on uranium and arsenic accumulation by Chinese brake fern (*Pteris vittata* L.) from a uranium mining-impacted soil. *Chemosphere* (62), 1464–1473.
- Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Microbiología de suelos . (1985). En: Programa de pastos tropicales, informe anual. Cali, Colombia, 1983.
- Coppotelli, B. & Morelli, I. & Corti, L. (2007). Estudio de propiedades promotoras de la biodisponibilidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA. XI Congreso Argentino de Microbiología – Posters Universidad de Oldenburg, Revista Argentina de Microbiología. 39, (Supl.1). Oldenburg, Alemania.
- Córdova, A. & Infante, C & Lugo, P. & López L. (2011). Comparación de la eficiencia de extracción con solventes de diferente polaridad, para un crudo mediano a dos concentraciones en un suelo sometido a biorremediación. Paper presented at the biannual meeting of Venezuelan Society of Chemistry, Vargas, Venezuela.
- Cordiki, L. & Rowland, D. & Jhonson, N. & Allen, E. (2002). Nitrogen fertilization alters the functioning of arbuscular mycorrhizas at two semiarid grasslands, (240), 299-310.
- Cornejo, P. & Meier, S. & Borie, F. (2008). Utilización de hongos micorrizicos arbusculares como alternativa para la recuperación de suelos contaminados por actividades mineras. *Gestión Ambiental*, (16), 13–26.
- Cuenca, G. & Cáceres, A. & Oirdobro, G. & Hasmy, Z. & Urdaneta, C. (2007). Las micorrizas arbusculares como alternativa para una agricultura sustentable en áreas tropicales. *Interciencia*. (32), 23-29.
- Cunningham, S.& Shann, J.& Crowley, D.& Anderson T.(1997). Phytoremediation of contaminated soil and water. In: *Phytoremediation of Soil and Water contaminants* (E. L. Kruger, T. A. Anderson y J. R. Coats, Eds.) Am.Chem. Soc (2-17). Washington DC.

- Daane, L. & Harjono, I. & Zylstra, G. & Häggblom, M. (2001). Isolation and characterization of polycyclic Aromatic hydrocarbon degrading bacteria associated with the Rhizosphere of saltmarsh plants. *Appl Environ Microbiol.* 67(6), 2683–2691.
- De Boer, W. & Verheggen, P & Gunnewick, K. & Kowalchuk, G. & Veen, J. (2003). Microbial Community Composition Affects Soil Fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, (2), 835-844.
- Decreto 2635 República de Venezuela. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. *Gaceta Oficial de la República de Venezuela*, no. 5212. 1998.
- Demaneche, S. & Kay, E. & Gourbiere, F. & Simonet, P. (2001). Natural transformation of *Pseudomonas fluorescens* and *Agrobacterium tumefaciens* in soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 67,(6), 2617-2621.
- Delon, F. (2001). Hidrocarburos origen y acumulación. *Petróleos de Venezuela, SA. Programa de educación petrolera. Litografía Beta.* pág. 14.
- De la rosa & Ferrera, R. & Alarcón A, & Sánchez, M, & Franco, A. (2012). Aislamiento de consorcios de hongos micorrízicos arbusculares de plantas medicinales y su efecto en el crecimiento de vinca (*Catharanthus roseus*). *Revista Chilena de Historia Natural* 85: 187-198.
- Dezseo, N. & Flores, S. & Zambrano, S. & Rodgers, L. & Ochoa, E. (2008). Estructura y composición florística de bosques secos y sabanas en los Llanos Orientales del Orinoco, Venezuela. *Interciencia*, (33),733-740.
- Diaz, I. & Escalante, E. & Favela, E. & Gutierrez, M. & Ramirez, H. (2008). Design of bacterial defined mixed cultures for biodegradation of specific crude oil fractions, using population dynamics analysis by DGGE. *Int Biodet Biodeg*, (62),21-30.
- Dushenkov, S. Trends in phytoremediation of radionuclides. (2003). *Plant and Soil.* (249),167 – 175.
- Dorn P, Salanitro J. (2000) Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation *Chemosphere*,40, 419-426.
- EPA. Environmental Protection Agency, Washington, DC; EPA 236-R-01-001. (2001). Web:
<http://www.epa.gov/globalwarming/emissions/national/download.htm>

- Escalante, E. & Gallegos M. & Favela, E. & Gutiérrez, M. (2005). Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*, (59): 405-413.
- EISOPQAM (Environmental investigations standard operating procedures and quality Assurance Manual". (2001). Disponible en la web: <http://www.epa.gov/region4/sesd/fbqstp/>. Consulta 2008.
- Fahy A. & Lethbridge G. & Ball As & Timmis K & Mc Genty. (2005). Effect of long-terms benzene pollution on bacterial diversidad and community structure in ground water. *Environ Microbial* (7):1192-1199.
- Fatima, B. & Flavio A. & Oliveira, C. & Benedict, O. & William, T. (2003). Bioremediation of soil contaminated by diesel oil. *Brazilian Journal Microbiology*, 34,(1), 65-68
- Fardón, J. (2008). *El petróleo*. (ed SM). Madrid.
- Fen, G. & Zhang, F. & Li, X. & Tian, C. & Tang, C. (2002). Improve tolerance of maize plants to salt stress by arbuscular mycorrhizal is related to higher accumulation of soluble sugars in roots. *Mycorrhiza*,(12),185-190.
- Ferrol, N. & González, M. & Valderas, A. & Benabdellah, K. & Azcón, C. (2009). Survival strategies of arbuscular mycorrhizal fungi in Cu-polluted environments. *Phytochemistry Reviews*, 8,(3). 551-559.
- Fester, T. & Hause G. (2005). Accumulation of reactive oxygen species in arbuscular mycorrhizal roots. *Mycorrhiza*,15,(5), 373-379.
- Fitter, A. & Garbaye, J. (1994). Interactions between micorrhizal fungi and others soil organism. *Plant and Soil*. 159, 123 - 132.
- Franco, A. & Ferrera, R. & Varela, L. & Pérez, J. & Alarcón, A. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically petroleum-contaminated soils in Mexico and the effects of petroleum hydrocarbons on spore germination. *Journal of Basic Microbiology*, (47),378-383.
- Frey, P. & Garbaye, J. & Tarkka, M. (2007). The mycorrhiza helper bacteria revisited. *New Phytologist*, (176), 22-36.
- Fonturbel, F & Ibanez C. (2004). Fuentes de energía biológica: empleo del metabolismo microbiano para la descontaminación de aguas. *Biología org*. 17, (5),1-6.

- Gábor, M. & Tímea, B. & Zsolt, P. (2007). Molecular study of arbuscular mycorrhizal fungi colonizing the sporophyte of the eusporangiate rattlesnake fern (*Botrychium virginianum*, Ophioglossaceae). *Mycorrhiza* 17,597–605.
- Gamarra, R. (1999). Ontogenia de la simbiosis hongo micorrízico- parchita amarilla (*Passiflora edulis* Sim f *flavicarpa* Degener y su efecto sobre el desarrollo de la plántula. Trabajo para el ascenso a la categoría de profesor asistente de la UCLA.
- Gamal, R. (2005). Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Phytoremediation of Soil Rhizosphere Spiked with Poly Aromatic Hydrocarbons. *Mycobiology* 33,(1), 41-50.
- Gallego, L. & Loredó, J. & Llamas, J. & Vázquez, F. & Sánchez, J. (2001). Bioremediation of diesel-contaminated soils: Evaluation of potential in situ techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation*. (12): 325-335.
- Gálan, A. & Linares, E. (2008). “Datos sobre la vegetación de los humedales de América del Sur. De las sabanas bolivianas a los Llanos del Orinoco (Venezuela)”. *Acta Botánica Malacitana* 33. Web: <http://webdeptos.uma.es/biolveg/03Rev/00HRev/01Rev.html>) Revisado en 2013.
- García, G. & Ferrera, R. & Almaráz, J. & Rodríguez R. (2000). Colonización micorrízica en gramíneas creciendo en un suelo contaminado con hidrocarburos. *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Alarcón Ed.; pp.221-227. México.
- García G. & Infante C. & López L. (2012). Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferentes texturas con y sin agente estructurante. *Bioagro*, 24,(2):93-102.
- Gao, Y. & Zhu, L. (2004). Plant uptake, accumulation and translocation of phenanthrene and pyrene in soils. *Chemosphere*.55, 1169–1178.
- Gerdeman, J. & Nicolson, T. (1963). Spores of Mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* (46),235-244.
- Giovannetti, M. & B. Mosse (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular and arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytologist.*, 84: 489-500.

- Giri, B. & Mukerji, G. (2004). Mycorrhizal inoculate alleviates salt stress in *Sesbania aegyptiaca* and *Sesbania grandiflora* under field conditions: evidence for reduced sodium and improved magnesium uptake. *Mycorrhiza*, (14),307-312.
- Goddard, M. & Hernández R. & Rojas N. (2010). Identificación Molecular de Microorganismos Capaces de Remover Bifenilo Provenientes de Suelos Contaminados. *Tecnología*. 3, (2), 27-51.
- González V. (2003). Delta del Orinoco. En Aguilera M.; Azocar A. y E González. Biodiversidad Venezuela. Tomo II Fundación Polar. Ministerio de Ciencia y Tecnología y FONACIT. Caracas, Venezuela p 900-917.
- González, P. & Pérez, G. & Medina, N. & Crespo, J. & Ramírez, J. & Arzola, J. (2012). Coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) y su efecto en kudúz (*Puerariaphaseoloides*). Nota técnica. *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*, Tomo 46, Número 3.
- Govindarajulu, M. & Pfeffer, P. & Jim, H. & Abudaker, J. (2005). Nitrogen transfer in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Nature*, (435), 819.
- Harrison, M. (2005). Signaling in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu Rev Microbiol.* (59),19-42.
- Hernández, I. & Mager, D. (2003). Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*, 15 ,(3), 149-155.
- Hernández, L & Castillo, S.& Guadarrama P. & Martínez Y.& Romero M.& Sánchez I. (2003). Hongos micorrizógenos arbusculares del Pedregal de San Ángel. 1° Edición. Coordinación de servicios editoriales. Impreso y hecho en México. p 13.
- Hernández, E. & Ferrera, R. & Fernandez, L. & Rodriguez, R. (2000). Ocurrencia de la micorriza arbuscular y bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico en suelos contaminados por hidrocarburos. *Ecología, fisiología y biotecnología de la micorriza arbuscular*. Alarcón ediciones. Colegio de postgraduados México. 213-220.
- Heinonsalo, J. & Hurme, K. & Sen, R. (2004). Recent C-14 labelled assimilate allocation to Scots pine seedling root and mycorrhizosphere compartments developed on reconstructed podzol humus, E- and B- mineral horizons. *Plant and Soil* 259, 111-121.

- Helgason, T. & Mearryweather, J. & Denison J. & Wilson, P. & Young, J. & Fitter, A. (2002). Selectivity and functional diversity in arbuscular mycorrhizas of co-occurring fungi and plants from a temperate deciduous woodland. *J. Ecol.* 90, 371-384.
- Helgason, T. & Fitter, A. (2009). Natural selection and the evolutionary ecology of the arbuscular mycorrhizal fungi (Phylum Glomeromycota). *Journal of Experimental Botany*: 1-16.
- Heylen, K. & Lebbe, L. & De Vos, P. (2008). *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol* .(58),73–77.
- Hoshino, T. & Terahara, T. & Tsuneda, S. & Hirata, A. & Inamori, Y. (2005). Molecular analysis of microbial population transition associated with the start denitrification in a wastewater treatment process. *J Appl Microbiol* (99),1165–1175.
- Hou, F. & Milke, M. & Leung, D. & Macpherson, D. (2001). Variations in phytoremediation performance with diesel-contaminated soil. *Environmental Technology*, 22(2), 215-222.
- Huang, X. & El-Alawi Y. & Gurska J. & Glick B. & Greenberg B. (2005). A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal*. 81 (1),139-147.
- Hughes, K. & Bridge, P. & Clark, M. (2007). Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment* (372): 539–548.
- Husband, R. & Herre, E. & Young, J. (2002). Temporal variation in the arbuscular mycorrhizal communities colonizing seedlings in a tropical forest. *FEMS Microbiology Ecology* .(42),131-136.
- Infante, C. (2007). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos. Guía de apoyo de Curso UCV. Postgrado de Ciencias del Suelo.
- Infante C. & Morales F. & Ehrmann E. & Hernández I. & León N (2010) Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. En Plaza G (Ed.) Trends in Bioremediation and Phytoremediation Research Signpost. Kerala, India. pp. 429-451.
- Infante, C. & Hernández, I. & López, L. & Toro, M. (2012). Petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. In: *Phytotechnologies*. Edited by Anjun N.; Pereira M.; Ahamad I.; Duarte A.; Umar S.; Khan N. SRC Press

- Infante c. & Morales f. (2012). Evaluación de la toxicidad en desechos y suelos petrolizados empleando se millas de *Lactuca sativa* L. *Interciencia*. 3 (10). 782- 188.
- INVAM (International Culture Collection of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal) Fungi. <http://invam.wvu.edu/the-fungi/species-descriptions>. 2013.
- Jacques, R. & Okeke, C.& Benedict; F. & Bento M. & Peralba, C. & Camargo, F.(2007). Characterization of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Microbial Consortium From a Petrochemical Sludge Landfarming Site. *Bioremediation Journal*. Web: <http://www.redorbit.com/news/science>.
- Jansa, J. & Mozafar, A. & Kuhn, G. & Anken, T. & Ruh, R. & Sandersl,R. & Frossard, E. (2003). Soil tillage affects the community structure of mycorrhizal fungi in maize roots. *Ecol. Appl.* (13), 1164-1176.
- Jansa, J. & Andrew, S & Sally, S. (2008). Are there benefits of simultaneous root colonization by different arbuscular mycorrhizal fungi? *New Phytologist* 177:779-789.
- Jeffries, P. & Gianinazzi, S. & Perotto, S. & Turnau, K. & Barea, JM. (2003). The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi in sustainable maintenance of plant health and soil fertility. *Biol Fertil Soils*; 37(1),1-16.
- Johansson, J. & Leslie, P. & Roger F. (2004). Microbial interactions in the mycorrhizosphere and their significance for sustainable agricultura. *Fems Microbiology, Ecology*.48, (1),13.
- Joner, E. & Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza*. (10) ,155–159.
- Joner E. & Leyval C. (2003). Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science Technology*. (37): 2371-2375.
- Joner, E. & Leyval C.& Colpaert J. (2006). Ectomycorrhizas impede phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) both within and beyond the rhizosphere. *Environmental Pollution*,(142), 34-38.
- Kernaghan, G. (2005). Mycorrhizal diversity: Cause and effect? *Pedobiologia* 49:511_520. Consultado el 12 Octubre de 2012. Web: http://faculty.msvu.ca/fungal_ecology/Publi_Pdf/Mycorrhizal%20diversity-%20Cause%20and%20effect.pdf.

- Klauber, O. & Siqueira, J. & Moreira, F. (2002). Fungos micorrizicos arbusculares em solos de área polida com metais pesados. R. Brass. Ci. Solo. (26), 125-134.
- Krüger, M. & Stockinger, H. & Krüger, C. & Schübler, A. (2009). DNA-based species level detection of *Glomeromycota*: one PCR primer set for all arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist*, 183, 212–223.
- Kosuta, S. & Chabaud, M. & Loughon, G. & Gough, C. & Dénarié, J. (2003). A diffusible factor from arbuscular mycorrhizal fungi induces symbiosis-specific Mtenod expression in roots of *Medicago trunculata*. *Plant Physiol*, 131, 952–962.
- Ladwerhr, M. & Hildebrandt, U. & Wilde, P. & Nawrath, K. & Tóht, T. & Biró, B. & Bothe, H. (2002). The arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus geosporum* in European saline, sodic and gypsum soils. *Mycorrhiza*. (12), 199-211.
- La Grega, M. & Buckingham, P. & Evans, J. (2002). "Gestión de residuos tóxicos. Tratamiento, eliminación y recuperación de suelos", Volumen II. Editorial Mc.Graw Hill, Madrid, España.
- Leyval, C. & Joner, E. & del Val, C. & Haselwandter, K. (2002). Potential of arbuscular mycorrhizal fungi for bioremediation. In: Gianinazzi, S., Schu"epp, H., Barea, J.M., Haselwandter, K. (Eds.), *Mycorrhizal Technology in Agriculture*. Birkha"user Verlag, Basel, Switzerland, pp. 175–186.
- Liste, H. & Alexander M. (2000). Plant – promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere*. (40), 7-10.
- Lindström, K. & Minna, M & Hintsa, H, & Kaksonen, A, & Mokolke, L. & Mäkeläinen, K. & Pitkäjärvi, J & Suominen, L. (2003). Potential of *Galega-Rhizobium galegae* System for Bioremediation of Oil-contaminated soil. *Food Technol. Biotechnol.* (41), 11–16.
- Lioussanne, L. (2010). Review. The role of the arbuscular mycorrhiza-associated rhizobacteria in the biocontrol of soil borne phytopathogens. *Spanish Journal of Agricultural Research* 8 (S1), S51-S61.
- López, S. & Gallegos, M & Laura, J. & Pérez J. & Gutiérrez, M. (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21(2), 91-100.
- López, J. & Quintero G. & Guevara, A. & Jaimes, D. & Gutiérrez, S. & García, J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova - publicación científica* ISSN:4 (5), 1794-2470.

- López F. (2011). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento en cuatro especies leñosas de selva baja caducifolia. Trabajo de grado. Universidad Veracruzana. Facultad de Ciencias Agrícolas. Mexico
- Lovera, M. & Cuenca G. (2007). Diversidad de hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y potencial micorrízico del suelo de una sabana natural y una sabana perturbada de la gran sabana, Venezuela. *Interciencia*, 32(2). 108-114.
- Machado, A. (2012 Febrero 23). Consecuencias ambientales de derrame petrolero en Monagas sin precedentes en la historia del país. Prensa CDCHT-UCV.
- Madigan, M. & Martinko, J. & Parker, M. & Brock, T. (2004). *Biología de los microorganismos*; 10º Ed., Pearson Educación. pp 369- 380. Madrid.
- Madigan, M. & Martinko, J. & Clark, D. (2010). *Brock Biology of Microorganisms* (13th Edition)
- Madrid M. y A. Cataldi. (2002). Caracterización de fosas petroleras y sitios contaminados por crudo a través de métodos geofísicos y sensores geoquímicas in situ. XI Congreso venezolano de geofísica, Noviembre 17-20, Sociedad venezolana de ingenieros geofísicos.
- Małachowska, a. & Kalka J. (2010). Influence of mycorrhizal fungi on remediation of soil contaminated by petroleum hydrocarbons. *Fresenius Environmental Bulletin*, 19,(12b), 3217-3223.
- Malcova R. & Vosátka, M. & Gryndler, M. (2003). Effect of inoculation with *Glomus intraradices* on lead uptake by *Zea mays* S. L. and *Agrostis capillaries* L. *Appl. Soil Ecol.* (23), 55-67.
- Mancera, L. & Esparza, G. & Chavez, G. & Rodríguez, V. & Saucedo, C. & Barrera C. (2008). Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *Int. Biodeter. Biodegr.* (61), 151-160.
- Marcano R. (2012). Evaluación de micorrizas arbusculares en dos sistemas de producción, agrícola y pecuario, en la granja "La Esperanza" en el sector Tarabacoa, Municipio Bolívar del Estado Sucre. Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar al título de licenciada en biología. Universidad de Oriente Núcleo de Sucre Escuela de Ciencias Departamento de Biología. Cumaná.

- Margesin, R. & Walder, G. & Schinner, F. (2000). The impact of hydrocarbon remediation (diesel oil and polycyclic aromatic hydrocarbons) on enzyme activities and microbial properties of soil. *Acta Biotechnologica*.(20), 313-333.
- Martinez, V. & López, F.(2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*.(19):9-17.
- Matteucci, D. & Colma, A. (1982). Metodología para el estudio de la vegetación. Washington, D. C., Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. 168.
- Mattina, M. & Dykas, L. (2000).Chlordane uptake and its translocation in food crops.*Journal Agriculture Food and Chemical*, 48, 1909–1915.
- Martín, C. & González, A. & Blanco M. (2004). Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Rev Iberoam Micol*,(21), 103-120.
- Melo, E. & Saggin, J. & Ribeiro, E. (2008).Selection of arbuscular mycorrhizal fungi for the forage peanut intercropped with signal grass. *Pesq. Agropec. Bras.* (43),11- 85-91.
- Merkl N. & Schultze R.& Infante C. (2004).Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics- pre-selection of plant species from eastern Venezuela. *Journal of Applied Botany and Food Quality*,(78),185-192.
- Merkl, N. & Schultze, R.& Infante, C. (2005).Phytoremediation in the tropics- influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids.*Environmental Pollution* 138 (1), 86-91.
- Merkl, N. & Schultze, R. & Ariasb, M. (2006). Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil *Microbiological Research*.(161),80—91.
- Meyer, J. & Linderman, R. (1986). Selective influence on populations of rhizosphere or rhizoplane bacteria and actinomycetes by mycorrhizae formed by *Glomus fasciculatum*. *Soil. Biochem.* 18,101–196.
- Moreno, F. & Corseuil, H. (1999). Fitorremediación de acuíferos contaminados por benceno y etanol utilizando sauce llorón (*Salix babylonica*). *Ingeniería sanitaria y ambiental.* (43), 60-65.

- Morton, J. & Benny, L. (1991). Revised classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Zygomycetes): a new order, Glomales, two new suborders, Glominae and Gigasporineae, and two new families, Acaulosporaceae and Gigasporaceae, with an emendation of Glomaceae. *Mycotaxon*. 37, 471 – 491.
- Morton, J. & Redecker, D. (2001). Two new families of Glomales, Archeosporaceae and Paraglomaceae, with two new genera Archeospora and Paraglomus, based on cocondant molecular and morphological characters. *Mycologia* 93 (1), 181-195.
- Morton, J. & Msiska, Z. (2010) Phylogenies from genetic and morphological characters do not support a revision of *Gigasporaceae* (*Glomeromycota*) into four families and five genera. *Mycorrhiza*, 20: 483–496.
- Munns, R. (1979). Brady, and W. Barlow. Solute accumulation in the apex and leaves of wheat during water stress. *Aust. J. Plant Physiol.* (6), 379-389.
- Muthukumar, T. & Udaiyan, K. & Shanmughavel, P. (2004). Mycorrhiza in sedges—an overview. *Mycorrhiza*. (4), 65–77.
- Muratova, A. & Thorsten H. & Neeru, N. & Helmut, W. & Turkovskaya, O. & Kuschik, P. & Jahn, R. (2003). Moder M. Plant-rhizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *Int. J. Phytoremediation* 5, 137-151.
- Nelson, B. & Weinel, C. & Paulsen, I. & Dodson, R. & Hilber, H. & Martins dos Santos & Fouts, D. & Gil S. & Pop, M. & Holmes, M. (2002). Complete genome sequence and comparative analysis of metabolically versatile *Pseudomonas putida* KT2440. *Environmental Microbiology*. (4), 799-813.
- Olsen, S. & Sommers, L. (1982). Phosphorus. In: Page A. L. (Ed.) *Methods of Soil Analysis*. Part 2. *Agron.* 9, 403-430.
- Olsson, P & Van, A. & Allaway, W. & Ashford, A. & Rouhier, H. (2005). Phosphorus effects on metabolic processes in monoxenic arbuscular micorrizal cultures. *Plant Physiol* (130), 1162- 1171.
- Orozco, M. & Gutiérrez, M. & Peralta, M. (2014). Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *buteloua curtispindula michx. torr.* en cultivos in vitro. *Polibotánica*, 38, 159-172.
- Pawlowska, T. & Charvat, I. (2004). Heavy-metal stress and developmental patterns of arbuscular mycorrhizal fungi. *Applied and Environmental Microbiology*. (8), 6623-6649.

- Peña, P. & Cardona, G. & Arguelles, J. & Arcos, A. (2007). Micorrizas arbusculares del sur de la amazonia colombiana y su relación con algunos factores fisicoquímicos y biológicos del Acta Amaz.37,(3),327-326.
- Pérez, V. & Poggi, H & Calva, G. & Ríos, E. & Rodríguez, R. & Ferrera, R. & Esparza, F. (2000). Nitrogen-fixing bacteria capable of utilizing kerosene hydrocarbon as a sole carbon source. *Water Sci. Technol*, 42,407-410.
- Pérez J., & García E., & Esparza F. (2002). Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva*, 21.297- 300.
- Pérez, A. & García, M. & Enríquez, Q. & Quero, C. & Pérez, P. & Hernández, G. A. (2004). "Análisis de crecimiento, área foliar específica y concentración de nitrógeno en hojas de pasto 'Mulato' (Brachiaria híbrido)." *Téc. Pec. Méx.* 42,(3),447-458.
- Pérez, A. & Rojas, J. & Montes, D. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe colombiano. *Rev. Colombiana Cienc. Anim.* 3, (2). 366-385.
- Peters, K. & Walters, C. & Moldovan . (2005). *The biomarker guide. Biomarkers and isotopes in the environment and human history.* Cambridge. University Press Cambridge.
- Peterson, R. & Massicotte, H. & Melville, H. (2004). *Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology.* Monograph publishing Canada 173p
- Pittier, H. (1978). *Manual de plantas usuales en Venezuela.* Fundación Eugenio Mendoza. Caracas. 620.
- Phillips, M. & Hayman D. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society* (55),157-160.
- Pilon, E. (2005). Phytoremediation. *Ann Rev.Plant Biol.* 56, 15-39.
- Pla I. (1983). Metodología para la caracterización física con fines de diagnóstico de problemas de manejo y conservación de suelos en condiciones tropicales. *Universidad Central de Venezuela Alcance revista de la Facultad de Agronomía UCV- Maracay.* N°32.
- Podila, G. & Zheng, J. & Balasubramanian, S. & Sundaram, & Hiremath, S. & Brand, J. & Hymes, M. (2002). Fungal Gene Expression in Early Symbiotic Interactions between *Laccaria bicolor* y Red Pine... En: *Diversity and*

Integration in Mycorrhizas. ICOM 3. Ed. S. E. Smith y F. A. Smith.. Kluwer Acad. Holanda 117-128.

Potin, O. & Veignie, E. & Rafin, C. (2004). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *Microbiology Ecology* (51), 71–78.

Portal Web PDVSA. En:
http://www.pdv.com/index.php?tpl=interface.sp/design/salaprensa/readnew.tpl.html&newsid_obj_id=3344&newsid_temas=1 2006.

PDVSA. Web:
http://www.pdvsa.com/PESP/Pages_pesp/aspectostecnicos/produccion/tipos_crudos.html 20013.

Pozo, M. & Azcón, C. (2007). Unraveling mycorrhiza-induced resistance. *Plant Biology* (10), 393–398.

Pucci, G. & Acuña A. & Tonin N. & Tiedemann M. & Pucci O. (2010). Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de Caleta Córdova, Argentina. *Rev. peru biol.*, (17): 2. 237 – 244.

Purushothaman, A. & Meenatchi, P. & Saravanan N. (2010). Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (toluene and xylene) by a bacterial strain isolated from petroleum contaminated site in Chennai. *Asian J. Biol. Sci.* (5), 206-210.

Rich, J. & Heichen, R. & Bottomley, P. & Cromack, J. & Myrold, D. (2000) Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soil. *Applied and Environmental Microbiology*. 69,(10), 5974-5982.

Rivera, M. & Ferrera, R. & Volke, V. & Rodríguez, R. & Fernández L. (2000). Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.

Rojas, S, (2006). Tratamiento de crudo proveniente de fosas de desecho haciendo uso de tecnologías aplicadas para el mejoramiento de crudos pesados. Trabajo especial de grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas

Ruiz, L, & Collados C. & Porcel, R. & Azcón, R. & Barea, J. (2002). Identification of a cDNA from the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* that is expressed during mycorrhizal symbiosis and up-regulated by N fertilization. *MPMI*. 15,(4), 360-267.

- Salas, E. & Blanco, A. (2000). Selección de plantas hospederas y el efecto del fósforo para la producción de inóculos de hongos formadores de micorrizas arbusculara (MA) por el método del cultivo en macetas. *Agronomía Costaricense*, 23 (1), 11-17.
- Sarand, I. & Haario, H. & Jorgensen, K. & Romantschuk, M. (2000). Effect of inoculation of a TOL plasmid containing mycorrhizosphere bacterium on development of Scots pine seedlings, their mycorrhizosphere and the microbial flora in m mtoluate-amended soil. *Microbiology Ecology* (31),127–141.
- Schaad, N. & Jones, J. & Chun, W. (1980). Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria, St. paul: phytopathological Society press. 373 pp. 2001.
- Schaad, N. & Jones, J. & Chun, W. (2001). Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic Bacteria. The American Phytopathological Society Press. St. Paul, Minnesota, USA. 373 p.
- Shanker, A. & Ravichandran, V. & Pathmanabhan, G. (2005). Phytoaccumulation of chromium by some multipurpose-tree seedlings. *Agroforest. Syst.* (64), 83-87.
- Scheffknecht, S. & Mammerler, R. & Steinkellner, S. & Vierheilig, H. (2006). Root exudates of mycorrhizal tomato plants exhibit a different effect on microconidia germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* than root exudates from non-mycorrhizal tomato plants. *Mycorrhiza*. (16), 365–370.
- Schenee L. (1984). Plantas comunes de Venezuela. Ediciones de la Biblioteca. Universidad Central de Venezuela. Caracas – Venezuela.
- Schüßler, A. & Schwarzott. & Walker, C. (2001). new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycol. Res.* 105 (12), 1413-1421
- Schüßler, A. & Walker, C. (2010). The *Glomeromycota*. A species list with new families and new genera. Web: www.amf-phylogeny.com.
- Schweitzer, B. & Huber, I. & Amann, R. & Ludwig, W. & Simon, M. (2001). b-proteobacteria control the consumption and release of amino acids on Lake Snow aggregates. *Appl Environ Microbiol* (67),632–645.
- Severeyn, H. & Delgado, J. & Godoy, A. & García, Y.(2003). Efecto del derrame de petróleo del buque nissos amorgos sobre la fauna macro invertebrada bentónica del golfo de venezuela cinco años después. *Ecotropicos* 16(2),83-90.

- Siciliano, S. & Fortin, N. & Mihoc, A. & Wisse, G. & Labelle, S. & Beaumier, D. & Oullette, D. & Roy, R. & White, L. & Banks, M. & Schwab, P. & Lee, K. & Greer, C. (2001). Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol*, 67, 2469-2475.
- Siciliano, S. & Germida, J. & Banks K. & Creer C. (2003). Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon. *Appl. Environ. Microbiol.* (69): 483-489.
- Siva, S. & Brett R. & Tessa, M. & Vogeler, I. & Clothier, B. & Grant, L. Northcott & Mcnaughton, D. (2004). Bioremediation of soils contaminated with organic compounds. Web: <http://www.regional.org.au/ass/super/soil/pdf/>.
- Sieverding, E. (1991). Vesicular–Arbuscular Mycorrhiza Management in Tropical Agrosystems. Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit (GTZ) GmbH, Eschborn, Germany.
- Smith, S. & Read, D. (2008). *Mycorrhizal Symbiosis*, Elsevier Edition. Third Edition. London, Academic Press. 785p.
- Spagnoletta, F. & Fernandez, A. & Tovar, N. & Chiochio, V. (2013). Las micorrizas arbusculares y Rhizobium: una simbiosis dual de interés. *Rev. Argent Microbiol.* 45 (2), 131-132.
- Sylvia, D. (1999). Mycorrhizal symbioses. In: Sylvia, D. & Fuhrmann, J. & Hartel, P. & Zuberer, D. (eds). *Principles and applications of soil microbiology*. Upper Saddle River, NJ: Prentice Hall. p. 408-426.
- Soto, J. (2001). Química orgánica ii: hidrocarburos y sus derivados halógenos. Editorial Síntesis. Madrid. 544p.
- Soto M. & Gutierrez M. & Peralta M. (2010). Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr en cultivos in vitro. *Polibotánica* [online]. 2014, n.38 [citado 2014-01-06], pp. 159-172 .Web: <http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-27682014000200009&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1405-2768.
- Strong, D. & Phillips, D. (2001). «Notes from the underground. Communication and control in the rhizosphere». *Plant physiology* .127, 727–30
- Suárez, P. & Reyes, R (2002) La incorporación de metales pesados en las bacterias y su importancia para el ambiente. *Interciencia* 27: 160-164.

- Sun, W. & Lo J. & Robert, F. & Ray, C. & Tang, C. (2004). Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils I. Selection of promising woody plants. *Environ. Sci. Pollut. Res*, (11), 260-266.
- Tarache A. (2011) Estudio de la Evolución de Toxicidad de Suelos Petrolizados durante un Proceso de Biorremediación. Tesis. Universidad Simón Bolívar. Venezuela.
- Tapia, J. (2010). Infectividad y efectividad de hongos micorrízicos arbusculares nativos de suelos salinos en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa*). *Rev. Mex. Mic.* Ferrera R. & Varela, L. & Rodriguez J. Soria, J. & Tiscareño, M. & Loredó, Alcala, J. & Villar, C. (31), 69-74.
- Telysheva, G. & Dizhbite, T. & Lebedeva, G. & Rossinskaja, G. & Jurkijane, V. & Treikale, O. & Yiesturs, U. & Daugavietis M. (2002). Lignin- based products stimulating soil phytoremediation. *Acta Biotechnol*, (22), 167-173.
- Toro, M. Micorrizas arbusculares en ecosistemas de sabana venezolanos. Arbuscular mycorrhizae in Venezuelan savanna ecosystems. (pgs 243-267). In Montaña NM, Camargo-Ricalde SL, García-Sánchez R, A. Monroy-Ata (Eds.) 2007. Micorrizas arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos (Arbuscular mycorrhizae in arid and semiarid ecosystems). Mundi-Prensa SA of CV, Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, UAM-Iztapalapa, FES-Zaragoza-UNAM. Distrito Federal, México. 460 pp.
- Torres, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, 12, (2), 1-5.
- USDA. (2006). Claves para la Taxonomía de Suelos Departamento de Agricultura de los Estados Unidos Servicio de Conservación de Recursos Naturales. Décima Edición. Montecillo, Texcoco, Estado de México. p 97.
- USEPA (United States Environmental Protection Agency). Introduction to phytoremediation. Cincinnati, OH, USA. pp 105. (1996). [Homepage]. Consultado Octubre 2012 Web: <http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/30003T7G.txt?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995%20Thru%201999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&T>.
- Valero, J. & Benezra, M. & Camacaro, S. & Chong, L. & Guenni O. (2005) Identificación botánica y producción de frutos en un bosque decíduo del asentamiento Las Peñitas, al sur del estado Aragua, Venezuela. *Zoot. Trop.* 23,(2), 121-140.

- Van, J. & Singh, A. & Ward, O. (2003). Recent Advances in Petroleum Microbiology Microbiology Molecular and Biology, (67),503-549.
- Vandenkoornhuyse, P. & Husband, R. & Daniell, T. & Watson, I. & Duck, J. & Fitter, A. & Young, P. (2002). Arbuscular mycorrhizal community composition associated with two plant species in a grassland ecosystem. *Mol. Ecol*, (11), 1555-1564.
- Van der, M. (2002). Arbuscular mycorrhizal fungi as a determinant of plant diversity: in search of underlying mechanisms and general principles. *Ecological Studies*, 157: 243-265.
- Verdin, A. & Sahraoui, L. & Fontaine, J. & Grandmougin, & Durand, R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*, (16), 397–405.
- Vierheilig, H. & Piché, Y. (2002). Signaling in arbuscular mycorrhiza: facts and hypotheses. In: Manthey J, Buslig B, eds. *Flavonoids in the living system*. New York: Plenum Press.
- Villar, R. & Ruiz, J. & Quero, L. & Poorter, H. & Valladares, F. & Marañón, T. (2004). Tasas de crecimiento en especies leñosas: aspectos funcionales e implicaciones ecológicas. En: Valladares. *Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante*. Páginas 191-227. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., (Madrid). ISBN: (84), 8014-8552.
- Volante A. & Lingua G. & Cesaro P. & Cresta A. & Puppo M. & Ariati L. & Berta G. (2005). Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*, (16): 43–50.
- Walkley, A. & Black, I. (1934). An examination of the Degjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *J. Amer. Soc. Agron.* (24): 256-275.
- Wang, F. & Liu, R. & Lin, X. (2004). Arbuscular mycorrhizal status of wild plants in saline-alkaline soils of the yellow river delta. *Mycorrhiza*, (12): 93-96.
- Wehner, J. & Antunes, PM. & Powell, J. & Mazukatow, J. & Rillig, M. (2010). Plant pathogen protection by arbuscular mycorrhizas: A role for fungal diversity? *Pedobiologia*, (53):197-201

- Wenger, L. & Isaksen, G. (2002). Control of hydrocarbon seepage intensity on level of biodegradation in sea bottom sediments. *Organic Geochemistry*, 33,(12),1277-1292.
- White, J.& Parrish, Z. & Iseleyen, M. & Gent, M. & Iannucci, W. & Eitzer, B. Kelsey, J.& Mattina, M. (2000).Influence of citric acid amendments on the availability of weathered PCBs to plant and earthworm species. *Int. J. Phytoremed*, 8, 63–79.
- White, J.& Wang, X.& Gent,P.& Iannucci, W.& Eitzer,B. & Schultes,N.& Arienzo,M.&Mattina, M. (2003). Subspecies-level variation in the phytoextraction of weathered *p,p*-DDE by *Cucurbita pepo*, *Environmental Science Technology*, 37, 4368–4373.
- White, J. & Ross, I.& Martin, P. & Brian, P. & Eitzer, D. & Mattina, M. (2006). Effect of mycorrhizal fungi on the phytoextraction of weathered *p,p*-DDE by *Cucurbita pepo**Journal of Hazardous Materials* Volume 137, Issue 3, 11 October 1750-1757.
- Whipps, J. (2004). Prospects and limitations for mycorrhizas in biocontrol of root pathogens. *Canadian Journal of Botany*, (82), 1198–1227.
- Willems, A. & Falsen, E. & Pot, B. & Jantzen, E. & Hoste, B. & Vandamme, P.,Gillis, M. & Kersters, K. & De Ley, J. (1990). *Acidovorax*, a new genus for *Pseudomonas facilis*, *Pseudomonas delafieldii*, E. Falsen (EF) Group 13, EF Group 16, and several clinical isolates, with the species *Acidovorax facilis* comb. nov., *Acidovorax delafieldii* comb. nov., and *Acidovorax temperans* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 40, 384–398.
- Xu, J. & Johnson, R. (1995). Identification of genes negatively regulated by Fis: Fis and RpoS comodulate growth-phase-dependent gene expression in *Escherichia coli*. *J.Bacteriol*, (177), 938-947.
- Yi, H. & Shu, T. & You, C. (2005). The role of mycorrhiza on chance of heavy metal speciation in rhizosphere of maize in wastewater irrigated agriculture soil. *Environmental Sciences*,17, (2), 276-280.