

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA



Evaluación de la capacidad fitorremediadora de *Panicum maximum* en un suelo de sabana contaminado con un hidrocarburo de petróleo extrapesado

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO
Presentado ante la Ilustre Universidad
Central de Venezuela, por la bachiller
Gabriela E. Navas Armas como requisito
parcial para optar por el título
de Licenciada en Biología

Tutor: Dr. Ismael Hernández-Valencia

Caracas, Octubre 2012

Dedicatoria

A mis amados padres,

Por hacer de mí una persona
crítica, sensible y honesta.

Por lograr conmigo esta meta tan esperada
guiándome siempre y enseñándome
a tomar las mejores decisiones de mi vida.

Por hacer lo imposible para que yo logre mis objetivos.

... Aquí comienzan mis grandes logros, en retribución a sus esfuerzos

Agradecimientos

Gracias a la UCV y la Facultad de Ciencias por abrir sus puertas de conocimientos y transferirlos a todos nosotros, quienes ahora tenemos el compromiso de hacerlos llegar a cada rincón posible.

Gracias a mi madre, mi confidente, por el apoyo de siempre, por enseñarme a ser constante y responsable; por mostrarme el lado positivo de las diversas situaciones que pasamos en la vida, y hacerme ver lo importante de la sencillez y la tolerancia... Gracias por tu amor infinito y tu confianza en mí.

A mi padre, por estar conmigo en todas las etapas de mi vida enseñándome, con amor y paciencia, a estudiar y mejorar cada día. Por creer en mí siempre y apoyarme. Gracias por aquel “castigo” que jamás olvidé y que me convirtió en una mujer responsable y dedicada... Gracias por tu sensibilidad que me estremece el alma.

A mis hermosas abuelas, que aún estando ausentes me motivaron y me guiaron desde el corazón hacia el camino correcto. Gracias por el amor que dejaron en mi memoria. Zoila, gracias por tu sencillez inmensa, que me enseñó a valorar las cosas realmente importantes. Aracelis, gracias por ese sentimiento tan especial y profundo que siempre sentiste hacia mí y demostraste en todo momento. Igualmente gracias a mi tío Vicente, por su especial existencia y por su apoyo increíble durante mi infancia y parte de mi adolescencia.

A Eduardo, mi compañero para toda la vida, gracias por atreverte a recorrer junto a mí este largo camino, sosteniendo siempre las bases de la relación más hermosa del mundo. Gracias por tolerar y comprender mis tristezas, rabias y por disfrutar mis alegrías... Tu eres una de mis más grandes alegrías.

A mis hermanos, porque sin saberlo, son parte de este proceso y estuvieron atentos para apoyarme en todo momento. Mary, gracias por tu inmenso cariño y por hacerme reír con cada locura.

A mis sobrinos, mis niños lindos. Yher, no te imaginas lo útil de tus consejos y cuanto me llena tener el amor de una sobrina tan inteligente y bella. Chui, eres y siempre serás mi niño consentido. Ambos me motivaron a lograr cerrar este ciclo.

A Milagros, mi tía querida, por estar tan pendiente de mí y mostrar su alegría y satisfacción cuando logro mis metas.

A mi tío Angel Zenón, por estar en todos mis logros y compartir todas las dichas a mi lado.

A mi primo Goyo, quien me impondrá la medalla. Gracias por tu gran apoyo.

A Mised, mi mejor amiga. Gracias por el apoyo en todas las etapas de mi vida, por tus consejos y por comprender mis, a veces tontas, decisiones. Te quiero como a mi hermana menor.

Gracias a Elizabeth, por construir conmigo una amistad duradera y hermosa.

Gracias al mejor tutor de la facultad, Ismael Hernández, quien confió en mí y me enseñó a ser independiente y consecuente, además de hacerme ver que tengo las herramientas para aprender cualquier área que me interese.

A la profesora Carmen Infante, por vincularse al proyecto con sus conocimientos y experiencia. Por estar siempre a la orden y hacer grandes aportes a la investigación.

A la profesora Nancy, a Lenny y Yomel, del Laboratorio de Plantas Acuáticas, por ofrecerme sus conocimientos y su amistad, sin ningún tipo de prejuicios.

Gracias a la profesora Marcia, por estar dispuesta a ayudar en lo que necesité e incluirme en su grupo de estudiantes del laboratorio.

A la profesora Nora Malaver, por comprender mi situación y aceptar ayudarme.

A todos los amigos y panas de la universidad, Eliana, Karla, Inés, Dileyvic, Arianna, Isabel, Miguel, Alberto, Lorena C., Lorena R., Daniel G., Daniel L., Grace, Ximena, Marcos, Yeznareth, Ismael, Eliecer, Verónica, Joxmer, José O., José M. Alexander, Enrique, por compartir distintas épocas y espacios en el transcurso del tiempo vivido en la universidad.

En fin, gracias a todos los que de alguna manera hicieron posible el cumplimiento de una de las metas más importantes.

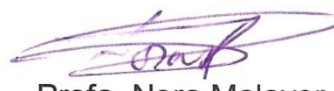



**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL DE
GRADO DE LA Br. Gabriela Eugenia Navas Armas**

Quienes suscriben, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado de la Br. Gabriela Eugenia Navas Armas, C.I.: V-18033987, titulado "**Evaluación de la capacidad de *Panicum maximum* para fitorremediar un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo extrapesado**", para optar al título de Licenciada en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos, lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello, se levanta la presente acta en Caracas, a los veintiséis días del mes de Octubre del año 2012, dejando constar que el Prof. Ismael Hernández Valencia actuó como coordinador del jurado examinador.


Profa. Marcia Toro
Jurado


Profa. Nora Malaver
Jurado


Prof. Ismael Hernández
Tutor

Resumen

Las sabanas venezolanas representan uno de los ecosistemas más fuertemente afectados por la actividad petrolera debido a su gran extensión y por ser albergue de yacimientos e instalaciones asociadas a la exploración y producción de petróleo. Desde el siglo pasado se han desarrollado varias tecnologías para remediar suelos contaminados con petróleo, como la fitorremediación, que es el uso de plantas y su microbiota asociada para remover, retener o reducir a niveles inofensivos sustancias contaminantes.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad fitorremediadora de una especie comercial, de alta productividad comprobada y adaptada a las condiciones de sabana, *Panicum maximum*.

Para ello se realizaron ensayos de umbráculo en donde se estudió la disminución en el contenido de aceites y grasas, así como los cambios en otros indicadores de actividad microbiológica en suelos contaminados con hidrocarburo de petróleo extrapesado (concentración 5%) en presencia y ausencia de la especie antes mencionada. Los resultados mostraron que luego de 120 en presencia de *P. maximum*, el contenido de crudo es ligeramente menor, principalmente asociado a una disminución en el contenido de compuestos aromáticos. Por su parte, la actividad microbiológica fue diferente durante el período del ensayo entre los suelos contaminados con plantas y sin plantas, siendo esta actividad mayor en los suelos contaminados. Sin embargo, no se obtuvo una relación entre la actividad de la enzima deshidrogenasa el C microbiano y la respiración basal.

Palabras clave: Hidrocarburos de petróleo extrapesado, fitorremediación, sabanas venezolanas, *Panicum maximum*.

ÍNDICE

Introducción	1
Antecedentes	8
Hipótesis y Objetivos	18
Objetivo General	18
Objetivos Específicos	18
Métodos	19
Metodología de campo	19
Metodología de laboratorio	19
Material botánico	19
Caracterización del suelo	19
a) Análisis físico de las muestras de suelo	19
Textura	19
Capacidad de campo	20
b) Análisis químico de las muestras de suelo	20
Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (%S.B) y bases intercambiables	21
Fósforo disponible	21
Nitrógeno total	21

pH	22
Contenido de materia orgánica	22
Efecto de las gramíneas sobre los niveles de contaminación del suelo	22
Contenido de aceites y grasas	23
Fraccionamiento del hidrocarburo (SARA)	24
Respiración basal	24
Carbono de la biomasa microbiana	25
Coeficiente metabólico	26
Actividad de la enzima deshidrogenasa	26
Biomasa vegetal total	26
Análisis estadísticos	27
Resultados y discusión	28
Caracterización del suelo	28
a) Análisis físico de las muestras del suelo	28
Textura y capacidad de campo	28
b) Análisis químico de las muestras de suelo	29
Capacidad de intercambio catiónico efectiva (C.I.C.E), aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases (%S.B), bases intercambiables, pH, contenido de materia orgánica, fósforo disponible y nitrógeno total	29

Efecto de la gramínea sobre los niveles de contaminación del suelo	30
Contenido de aceites y grasas	30
Fraccionamiento del hidrocarburo (SARA)	34
Respiración basal	37
Carbono de la biomasa microbiana	39
Coeficiente metabólico	42
Actividad de la enzima deshidrogenasa	43
Biomasa vegetal total	47
Estudio con <i>Trachypogon spicatus</i>	51
Consideraciones finales	53
Conclusiones	57
Recomendaciones	59
Referencias Bibliográficas	60
Anexo	64

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1: Variación de la concentración del Carbono de la Biomasa Microbiana (Mager, 2002)	12
Cuadro 2: Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa (Mager, 2002)	12
Cuadro 3: Emergencia de plántulas (%). Adaptado de Merkl <i>et al.</i> (2004)	14
Cuadro 4. Proporción de las fracciones minerales del suelo	29
Cuadro 5. Capacidad de campo del suelo contaminado y no contaminado	29
Cuadro 6. Propiedades químicas de las muestras de suelo	30
Cuadro 7. Diferencias significativas entre tratamientos de actividad de la enzima deshidrogenasa (valores p)	45
Cuadro 8. Correlación entre parámetros microbiológicos estimados para el suelo con <i>Panicum maximum</i>	55
Cuadro 9. Correlación entre parámetros microbiológicos estimados para el suelo control	55

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Variación en el contenido de aceites y grasas del hidrocarburo de petróleo extrapesado en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 32
- Figura 2:** Variación en el contenido de cada una de las fracciones (SARA) del hidrocarburo de petróleo extrapesado en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 35
- Figura 3:** Variación de la respiración basal en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 38
- Figura 4:** Variación del carbono de la biomasa microbiana en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 40
- Figura 5:** Variación del coeficiente metabólico en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 43
- Figura 6:** Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas 45
- Figura 7:** Biomasa aérea (vástago) de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado 49
- Figura 8:** Biomasa radical de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado 49
- Figura 9:** Biomasa total de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado 50

INTRODUCCIÓN

La industria petrolera representa una de las principales actividades económicas a nivel mundial. Su desarrollo constituye un soporte energético para los países industrializados y una fuente de ingresos fundamental para los países exportadores como Rusia, México y los agrupados en la Organización de Países Exportadores de Petróleo (OPEP), entre ellos Venezuela. Su gran significación económica le ha dado a la industria de los hidrocarburos de petróleo un alto nivel de desarrollo; sin embargo, vinculado a los procesos de exploración, extracción, transporte y refinación se pueden generar daños ambientales ocasionados por derrames y manejo inadecuado de sustancias con hidrocarburos.

La remediación de suelos contaminados con sustancias orgánicas es un asunto de interés global (Cunningham y col., 1996). Desde finales del siglo pasado se han desarrollado diversas tecnologías para remediar suelos contaminados con petróleo, que van desde técnicas de ingeniería hasta manipulaciones de procesos biológicos para incrementar la atenuación natural (Frick y col., 1999).

Algunas técnicas de ingeniería funcionan para extraer contaminantes peligrosos mediante la aplicación de calor, adición de sustancias como surfactantes y ácidos, o a través de manipulación física (Cunningham y col., 1996). Estas técnicas por lo general resultan ser muy costosas, difíciles de aplicar y en algunos casos solo representan soluciones provisionales al no ser capaces de destruir el contaminante (Vidali, 2001).

Una de las tecnologías de remediación de mas uso en las últimas décadas es la biorremediación, la cual se refiere al aprovechamiento de las capacidades de sistemas biológicos, principalmente microorganismos (bacterias, protozoarios y hongos), para eliminar, disminuir, transformar o estabilizar contaminantes orgánicos e inorgánicos depositados en los suelos, reduciendo así su impacto ambiental (Frick y col., 1999; Vidali, 2001; Margesin y Schinner, 2001).

Los compuestos orgánicos en el suelo son disminuidos naturalmente mediante la volatilización, adsorción y gracias a la actividad de la biota, especialmente los microorganismos y sus enzimas asociadas. Este proceso se conoce como atenuación natural. Sin embargo, cuando se dispone sobre el suelo un compuesto orgánico en cantidades inusualmente altas, la degradación del mismo puede verse afectada por condiciones ambientales, como son un pH inadecuado y/o la baja disponibilidad de nutrimentos, agua y/o oxígeno, las cuales limitan la actividad microbiana. La biorremediación de compuestos orgánicos se basa en incrementar la actividad de los microorganismos capaces de degradar los compuestos contaminantes mediante la manipulación de las condiciones del medio; es decir, es un proceso de atenuación natural alterado que permite obtener una degradación del compuesto orgánico en menor tiempo, con la aplicación de prácticas simples (p.e. encalado, fertilización, aireación y riego) y de fácil aceptación por el público en general. Sin embargo, algunos contaminantes son resistentes al ataque microbiano o no se encuentran en formas biodisponibles, por lo tanto, es difícil predecir las tasas de limpieza del sitio contaminado (Vidali, 2001).

Una variante de la biorremediación es el uso de plantas tanto *in situ* como *ex situ* y su microbiota asociada para remover, retener o reducir a niveles inofensivos los contaminantes presentes en el ambiente, denominada fitorremediación (Cunningham y col., 1996). Las especies empleadas en el proceso pueden ser nativas de la zona contaminada o trasladadas desde sitios no contaminados (Vidali, 2001); es decir, pueden encontrarse sitios con vegetación adaptada a las condiciones y con potencial remediador o lugares desprovistos de plantas que requieren el trasplante de especies tolerantes a los contaminantes.

Al igual que la biorremediación, con la fitorremediación se estimula la actividad microbiana en los sitios contaminados. Ello se puede lograr con el establecimiento de comunidades apropiadas de plantas-microorganismos y el uso de técnicas agronómicas como la adición de fertilizantes (Frick y col., 1999).

Ciertos factores ambientales deben ser tomados en cuenta para aplicar esta técnica, como son: la humedad, aireación, temperatura, contenido de nutrimentos, estructura y pH del suelo. Condiciones favorables de dichos factores, favorecen el crecimiento de las plantas y microorganismos. Por el contrario, baja o excesiva disponibilidad de agua y nutrimentos, déficit de oxígeno, y temperaturas extremas (altas o bajas) reducen la actividad biológica (Brady y Weil, 2002).

Existen una variedad de procesos específicos asociados a la fitorremediación que pueden ocurrir paralelamente en las zonas contaminadas según las condiciones presentes en el suelo y las características de los contaminantes y las plantas (Pivetz, 2001). Entre éstos se encuentran los que descontaminan la matriz (fitodescontaminación) y los que estabilizan al contaminante en el suelo (fitoestabilización) mediante su inmovilización para reducir futuros daños ambientales (Cunningham y col., 1996).

Entre los procesos de fitodescontaminación se encuentran la fitoextracción, la fitodegradación, la fitovolatilización y la rizodegradación (Cunningham y col., 1996).

La fitoextracción se refiere a la absorción del contaminante a través de las raíces seguida de su acumulación en la biomasa aérea de la planta, la cual posteriormente es cosechada (Pivetz, 2001). La fitodegradación es la incorporación, metabolización y transformación del contaminante mediante enzimas internas de la planta (Pilon-Smits y Freeman, 2006; Pivetz, 2001). La fitovolatilización consiste en el aumento de la tasa de volatilización de un contaminante por medio de las plantas y su microbiota asociada, en donde la liberación de compuestos volátiles puede ser desde las raíces, vástago o superficie del suelo (Cunningham y col., 1996). Por último la rizodegradación es el incremento de la biodegradación que ocurre en los suelos debido a la influencia de las raíces y su microbiota asociada, dando como resultado la transformación o destoxificación del contaminante en la rizósfera (Cunningham y col., 1996; Pivetz, 2001).

Por su parte, la fitoestabilización consiste en el uso de vegetación para retener o inmovilizar *in situ* los contaminantes, a través de la modificación química, física y biológica de las condiciones del suelo mediante exudados del sistema radical, causando una reducción en la biodisponibilidad de la sustancia (Pivetz, 2001).

Los procesos que involucra la fitoestabilización son: la humificación, lignificación y enlace irreversible (Cunningham y col., 1996). La humificación ocurre cuando los contaminantes son incorporados al humus del suelo, reduciendo su biodisponibilidad debido a la alta estabilidad de éste compuesto orgánico. Por su parte, la lignificación se refiere a la incorporación irreversible de los compuestos tóxicos de los contaminantes en constituyentes de las paredes celulares de las plantas y que por la lenta descomposición de éstas últimas, mantienen una baja biodisponibilidad de los compuestos tóxicos. Cuando los compuestos del contaminante forman enlaces con partículas del suelo ocurre el proceso denominado enlace irreversible, en el cual los compuestos químicos formados son altamente estables y por lo tanto la disponibilidad del contaminante también es disminuida (Cunningham y col., 1996). De todos los mecanismos antes mencionados, la rizodegradación ha sido señalada como el principal mecanismo de disipación de hidrocarburos de petróleo, mientras que los restantes han mostrado tener una contribución menor (Frick y col., 1999).

Las principales ventajas que presenta la fitorremediación sobre otras tecnologías de remediación son: a) aplicación *in situ*, b) aplicable a diversos contaminantes orgánicos e inorgánicos, c) es relativamente fácil de aplicar y estéticamente agradable, permitiendo que sea ampliamente aceptada por el público (Frick y col., 1999) y d) optimiza las condiciones del suelo y mejora su estructura, reduce y/o previene la erosión (Pivetz, 2001), incrementa la porosidad y por lo tanto la infiltración del agua, acelera el ciclaje de nutrientes e incrementa el contenido de carbono orgánico del suelo (Cunningham y col., 1996). Frick y col. (1999) señalan el gran potencial que existe para sembrar diversas especies en un mismo sitio con la finalidad de degradar varios contaminantes simultáneamente.

Además no solo es capaz de limpiar ambientes contaminados, sino también de restaurar ecosistemas (Pilon-Smits y Freeman, 2006).

En vista de las ventajas antes mencionadas, la fitorremediación cumple con los parámetros señalados por Cunningham y col. (1996) para el desarrollo de un sistema efectivo de remediación basado en plantas, los cuales son: ser técnicamente posible, económicamente viable y socialmente responsable.

La fitorremediación también presenta algunas limitaciones. Entre las más importantes se encuentran: a) la contaminación debe estar restringida a capas superficiales del suelo, debido a que a grandes profundidades el sistema radical es reducido o inexistente y en general la actividad biológica es pobre (Cunningham y col., 1996; Frick y col., 1999; Pilon-Smits y Freeman, 2006), b) por tratarse del empleo de especies vegetales solo pueden remediarse sitios con baja concentración de contaminantes debido a que altas concentraciones afectan la supervivencia de las plantas (Pivetz, 2001) y c) las condiciones ambientales deben ser adecuadas para permitir el crecimiento de las especies (Frick y col., 1999). Además, esta técnica usualmente requiere más tiempo, años o hasta décadas, que los métodos convencionales para lograr resultados satisfactorios (Pilon-Smits y Freeman, 2006).

Las sabanas bien drenadas son uno de los ecosistemas más ampliamente distribuidos del país. Estas sabanas se caracterizan por el predominio de gramíneas y ciperáceas y baja o ausente cobertura de leñosas. Se desarrollan bajo un clima estacional, con suelos ácidos, pobres en nutrimentos y en donde la quema es una práctica usual para remover el material seco y lignificado y favorecer el crecimiento de nuevos brotes más palatables para el ganado (Hernández-Valencia y López-Hernández 2002). *Trachypogon spicatus*, una gramínea perenne, es la especie más común de las sabanas estacionales y de ello deriva que a estas sabanas también se les conozca como sabanas de *Trachypogon* (Ramia, 1967).

En Venezuela, la mayoría de las sabanas de *Trachypogon* se desarrollan en cuencas sedimentarias, como son los Llanos Venezolanos, región que actualmente concentra una buena parte de la producción petrolera. También es en esta región en donde se ubica la Faja Petrolífera del Orinoco, una de las mayores reservas mundiales de crudos pesados (Infante y col., 2010) y extra-pesados (Mommer, 2004). Ya que las sabanas estacionales son vulnerables por el impacto que puede producir la actividad petrolera, especialmente por derrames y disposición inadecuada de hidrocarburos, se hace necesario estudiar alternativas de rehabilitación de las áreas degradadas, especialmente el potencial de las especies más abundantes para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos pesados y extrapesados que son nuestras principales reservas de petróleo.

El petróleo es clasificado según su gravedad API, en livianos (30-40° API), medianos (22-30° API), pesados (10-22° API) y extrapesados (<10° API). Este parámetro usa como referencia la gravedad específica del agua destilada, cuyo valor expresado en API es 10°, por lo tanto, el petróleo extrapesado es el único más pesado que el agua.

Con base en lo antes expuesto, en el presente trabajo se evaluó la capacidad fitorremediadora de *Panicum maximun* sobre un suelo de sabana contaminado con hidrocarburo de petróleo extrapesado. Esta especie fue escogida gracias que es una planta adaptada a ambientes tropicales, de rápido crecimiento y establecimiento; sus semillas se expenden comercialmente y por lo tanto pueden conseguirse en suficiente cantidad (Mager, 2002); son conocidos sus requerimientos agronómicos en cuanto a la temperatura, fertilización y riego óptimos. Adicionalmente, estudios anteriores (Mager, 2002; Hernández-Valencia y Mager, 2003) han reportado que sus semillas son colonizadoras de ambientes perturbados, pudiendo entonces suponer que resisten condiciones de contaminación con petróleo.

Este estudio representará un aporte de información sobre la capacidad de las especies naturalizadas propias de áreas perturbadas para recuperar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo extrapesados, debido a que dentro

de la línea de investigación que se ha venido desarrollando desde hace una década en el país, se han estudiado únicamente los efectos de crudos livianos y pesados sobre el crecimiento de plantas y la influencia que éstas pueden tener en la degradación de dichos contaminantes.

ANTECEDENTES

A nivel internacional se han realizado numerosas experiencias de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburo, principalmente en condiciones controladas de umbráculo e invernadero. En el trópico las investigaciones sobre fitorremediación han sido más escasas, pese a que esta región presenta condiciones favorables para el empleo de tecnologías basadas en sistemas biológicos como son las altas temperaturas y casi constantes durante todo el año en las tierras bajas en donde principalmente se concentra la actividad petrolera. A continuación se destacan algunos trabajos realizados en el trópico y en Venezuela.

Njoku y col. (2009) investigaron el efecto del crecimiento de *Glicine max* (soya) sobre ciertas características fisicoquímicas y el contenido de crudo de un suelo contaminado en Nigeria. Para ello establecieron tres ensayos con diferentes concentraciones de crudo mediano (25, 50 y 75g/4kg de suelo) por un período de 110 días, utilizando como control plantas sembradas en suelo sin crudo.

Las características fisicoquímicas evaluadas fueron afectadas significativamente en presencia de la planta. El pH aumentó, lo que puede estar relacionado, según los autores, con una mayor degradación de petróleo que se alcanza en suelos plantados con *G. max* en comparación con los suelos no plantados. Por otro lado, el contenido de humedad se redujo en los suelos con 25g de crudo/4 kg de suelo e incremento en los demás tratamientos, posiblemente porque a bajas cantidades de crudo el crecimiento de las raíces es favorecido y por lo tanto pudo haber mayor absorción de agua en dicho tratamiento respecto a los demás. Por último, la materia orgánica disminuyó en todos los tratamientos en los primeros 42 días para luego mostrar un aumento a partir de los 63 días; la reducción inicial es relacionada con su utilización por las plantas en crecimiento, mientras que el incremento con el alcance de la madurez, momento en el cual las hojas de las plantas son depositadas en el suelo y descompuestas.

En cuanto a la concentración de crudo, al término del ensayo obtuvieron que en los suelos con 25g de crudo/4kg de suelo la pérdida fue mayor con la presencia de la planta respecto al control (55% vs 50%), mientras que en el resto de los tratamientos (50g y 75g de crudo/4kg de suelo) la cantidad de crudo degradada fue mayor en los suelos sin vegetación. Sin embargo, en los suelos con 50 y 75g de crudo/4kg de suelo, observaron brotes de otras hierbas en las muestras con la planta presente, por lo que los autores sugieren que la especie estudiada es capaz de reducir la toxicidad del contaminante.

Cuando se realizan experimentos de fitorremediación con compuestos orgánicos se espera que la planta utilizada mantenga o reduzca la concentración del contaminante respecto a suelos sin vegetación, suponiendo que la rizodegradación es el mecanismo predominante, debido a que la presencia de la rizósfera permite el aumento de las poblaciones y la actividad de los microorganismos capaces de degradar sustancias peligrosas en el suelo. Sin embargo, en este estudio los autores no justificaron la razón del incremento de la degradación del contaminante en suelos sin vegetación respecto a los suelos con *G. max* para los tratamientos con 50g y 75g de crudo/4kg suelo.

Rivera-Cruz y col. (2004) evaluaron la descontaminación de suelos con 0,0098% (contaminación basal de suelo), 5% y 10% de crudo, conjugando la presencia y ausencia de la rizósfera del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) y la asociación de poblaciones autóctonas de bacterias y hongos rizosféricos realizando un experimento en invernadero durante 120 días. En los tratamientos con rizósfera y 5% de crudo, las bacterias al término del ensayo, y los hongos a los 60 días alcanzaron las poblaciones más grandes (16×10^7 y 170×10^3 UFC/g de suelo seco), debido a la gran disponibilidad de carbono y nitrógeno que son fuentes energéticas para el metabolismo. Por su parte concentraciones de 10% de hidrocarburo inhibieron las poblaciones debido a los efectos restrictivos que puede originar el crudo en los procesos de aclimatación de las bacterias, causando estrés.

Como se mencionó, las poblaciones de hongos fueron mayores en los tratamientos con rizósfera debido al beneficio que éstos obtienen mediante el parasitismo o depredación de bacterias. A los 120 días dichas poblaciones disminuyeron en todos los tratamientos, entre un 50 y 80%, indicando que su grado de sensibilidad al petróleo puede variar a través del tiempo debido, por ejemplo, a la ausencia de bacterias para restablecer las poblaciones a través de las relaciones de parasitismo y depredación.

En cuanto a la degradación del crudo, la asociación bacterias-hongos tuvo mayor capacidad degradadora debido a que la dificultad de las bacterias para atacar grandes moléculas de hidrocarburos es compensada por la maquinaria enzimática más efectiva de los hongos; las concentraciones de 5% de crudo disminuyeron en un 62% a los 120 días de ensayo, mientras que los 10% de crudo fueron degradados en un 48%. Sin embargo, a dichas concentraciones la biomasa total (aérea y radical) fue restringida en un 51% y 53% para los suelos contaminados con 5% y 10% del contaminante, respectivamente.

Los autores concluyen que la asociación bacterias-hongos nativos y pastos forrajeros es una alternativa viable para restaurar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo eficazmente, aunque se reduce la producción de biomasa vegetal. Sin embargo, es necesario realizar los experimentos con todos los tipos de hidrocarburos para concluir lo antes mencionado, ya que los resultados obtenidos indican que únicamente el suelo tratado con el contaminante encontrado puede descontaminarse eficazmente utilizando el pasto alemán (no cualquier pasto forrajero) y la asociación bacterias-hongos nativos.

Además, no es señalado el tipo de hidrocarburo degradado (liviano, mediano, pesado o extrapesado) y por lo tanto no es posible saber la dificultad que presentaron las plantas al degradar el contaminante, debido a que en los hidrocarburos livianos predominan saturados y aromáticos, las cuales son las fracciones biodegradables del crudo (Atlas y Bartha, 1998; McMillen y col., 2004) pero poseen gran toxicidad (Brandt y col. 2006), mientras que los pesados y

extrapesados contienen en mayor proporción resinas y asfaltenos que presentan mayor resistencia a la degradación por ser compuestos reaclitrantes (McMillen y col., 2004).

En Venezuela, durante la última década se han realizado diversos estudios relacionados con la fitorremediación de suelos de sabana contaminados con hidrocarburos de petróleo. El primero de estos fue la evaluación de la germinación, sobrevivencia de plántulas y producción de biomasa de seis especies de gramíneas (*Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumbens*, *Brachiaria dyctioneura*, *Bachiaria humidicola*, *Cynodon dactylon* y *Panicum maximum*) con el fin de determinar cuáles especies tenían mayor potencial para ser empleadas en la fitorremediación de suelos contaminados con crudo liviano a concentraciones bajas (3%) (Mager 2002). Adicionalmente, este trabajo determinó el contenido de carbono de la biomasa microbiana y la actividad de la enzima deshidrogenasa en los suelos, como indicadores del papel de los microorganismos en la fitorremediación.

Pasados 45 días, la germinación de las especies de gramíneas plantadas en suelos contaminados no varió respecto al control (suelos no contaminados). Por su parte, la sobrevivencia de plántulas y la producción de biomasa total, aérea y radical disminuyó significativamente para todas las especies. *B. brizantha* y *P. maximum* alcanzaron las mayores tasas de germinación, mientras que la mayor biomasa aérea y radical, así como la máxima longitud de las raíces la obtuvo *B. brizantha*. Mager (2002) concluyó que estas dos especies, en comparación con las restantes, poseen mayor potencial para fitorremediar suelos contaminados con crudo liviano a bajas concentraciones.

En cuanto al contenido de carbono de la biomasa microbiana, realizado para los tratamientos con *B. brizantha*, *P. maximum* y el control, la autora encontró la misma tendencia en las tres unidades experimentales (Cuadro 1), la cual es un incremento progresivo del contenido de carbono microbiano hasta los 60 días y una reducción hasta el término del ensayo. Mager (2002) sugiere que el aumento

obtenido a los 60 días se debe a la adición del hidrocarburo de petróleo, ya que representa una nueva fuente de carbono para los microorganismos. Por su parte la disminución obtenida hasta los 120 días, se debe a la reducción de los compuestos biodegradables del crudo (Cuadro 1).

Cuadro 1: Variación de la concentración del Carbono de la Biomasa Microbiana (Mager, 2002)

	µgC/g suelo día 0	µgC/g suelo día 30	µgC/g suelo día 60	µgC/g suelo día 120
<i>B. brizantha</i>	1445,307	2171,974	9097,385	2650,965
<i>P. maximum</i>	1445,307	2232,097	6775,361	2050,193
Control	1445,307	2132,58	4868,857	3747,815

Respecto a la actividad deshidrogenasa, la conducta general en todos los tratamientos fue el incremento de la actividad entre los 30 y 60 días y la posterior disminución al final del ensayo (Cuadro 2). Sin embargo, los resultados obtenidos para la actividad deshidrogenasa a los 30 y 60 días del ensayo no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, mientras que al final del ensayo si lo hicieron. La autora atribuye el aumento de la actividad deshidrogenasa al incremento en la degradación del contaminante en el suelo y posteriormente la actividad decae en la medida que se reduce el sustrato carbonado (hidrocarburo de petróleo), el cual ha sido metabolizado por los microorganismos para formar CO₂.

Cuadro 2: Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa (Mager, 2002)

	µgTPF/g suelo día 0	µgTPF/g suelo día 30	µgTPF/g suelo día 60	µgTPF/g suelo día 120
<i>B. brizantha</i>	17,14	196,2	85,97	0,7
<i>P. maximum</i>	17,14	157,77	119,71	19,81
Control	17,14	73,23	138,03	42,09

Mager (2002) concluye que la determinación del contenido de C de la biomasa microbiana y la actividad deshidrogenasa no fueron buenos indicadores de la actividad microbiológica y del papel de los microorganismos durante el proceso de fitorremediación debido a la ausencia de diferencias significativas consistentes entre los tratamientos en algunos períodos del ensayo.

Luego, Hernández-Valencia y Mager (2003) evaluaron la capacidad de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con crudo liviano (concentración de 3%) basándose en la conclusión del trabajo anterior referente a las especies con mayor potencial fitorremediador. Al término del ensayo (240 días) el contenido de aceites y grasas en el suelo disminuyó en los tratamientos con plantas respecto al control (suelo sin vegetación). La presencia de *Panicum maximum* redujo el contenido inicial de aceites y grasas en un 63% y en los tratamientos con *Brachiaria brizantha* disminuyó en un 55%, mientras que el control presentó una reducción del 40%, siendo estadísticamente diferentes todos los tratamientos.

Merkl y col. (2004) realizaron un estudio referente a la influencia de los hidrocarburos de petróleo pesado (3 y 5% de concentración) sobre el crecimiento de plantas tropicales, como base para identificar las especies con potencial fitorremediador. Para la realización de este trabajo emplearon dos gramíneas (*Brachiaria brizantha* y *Panicum maximum*) y seis leguminosas (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Desmodium glabrum*, *Mimosa orthocarpa*, *M. camporum* y *Stylosanthes capitata*). Los indicadores evaluados fueron la emergencia y sobrevivencia de plántulas, la longitud del vástago y raíz, y la producción de biomasa en suelos contaminados y no contaminados, determinados luego de cuatro semanas de experimento.

Al finalizar las cuatro semanas de ensayo, obtuvieron que la influencia del crudo sobre la emergencia de plántulas no fue estadísticamente significativa (Cuadro 3), excepto para *D. glabrum* que mostró una disminución de 89% y 88%

para las concentraciones de 3 y 5% respectivamente, en comparación con su control.

Cuadro 3: Emergencia de plántulas (%). Los valores de las medias no mostraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$), excepto para *M. orthocarpa* y *D. glabrum* (las letras iguales en la misma fila indican que no hay diferencias significativas). Adaptado de Merkl *et al.* (2004)

Especies	%Emergencia de plántulas \pm D.S		
	Concentración de crudo		
	0%	3%	5%
<i>C. brasilianum</i>	72.7 \pm 4.7	77.7 \pm 4.0	77.3 \pm 4.0
<i>C. mucunoides</i>	49.3 \pm 3.1	35.7 \pm 9.3	34.7 \pm 9.1
<i>B. brizantha</i>	48.7 \pm 8.5	55.7 \pm 10.3	48.7 \pm 3.2
<i>M. orthocarpa</i>	41.7 ab \pm 6.0	33.0 a \pm 13.0	55.0 b \pm 9.5
<i>P. maximum</i>	26.3 \pm 10.0	10.3 \pm 11.2	17.0 \pm 5.3
<i>D. glabrum</i>	13.7 a \pm 1.0	1.5 b \pm 0.0	1.7 b \pm 2.1
<i>S. capitata</i>	5.7 \pm 1.5	6.0 \pm 3.6	7.0 \pm 2.6
<i>M. camporum</i>	0.7 \pm 0.6	2.0 \pm 2.6	0.7 \pm 0.6

La longitud del vástago se redujo significativamente en presencia del contaminante para la mayoría de las especies pero la variación en la concentración de hidrocarburos no varió significativamente en presencia de las plantas. La longitud radical disminuyó significativamente para todas las leguminosas excepto para *D. glabrum*, *M. camporum* y *C. brasilianum*, ésta última mostró mayor reducción en suelos con concentraciones de 5%. En el caso de las gramíneas, este parámetro no fue determinado.

Para todas las especies la producción de biomasa (vástago y raíz) disminuyó significativamente en los suelos contaminados, exceptuando la biomasa radical de *C. brasilianum*, cuya tendencia fue a reducirse pero no se encontraron diferencias significativas. Según los autores, la gramínea *B. brizantha* y las leguminosas *C. brasilianum* y *C. mucunoides* poseen potencial para

fitorremediar suelos contaminados con crudo pesado, debido a que combinan la mayor emergencia de plántulas y la menor pérdida de producción de biomasa.

Profundizando esta línea de investigación, Merkl y col. (2005a) evaluaron la capacidad de tres gramíneas (*Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus*, *Eleusine indica*) y tres leguminosas (*Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Stylosanthes capitata*) para reducir las concentraciones de crudo de petróleo pesado (5%) de suelos de sabana; a los 90 y 180 días de ensayos determinaron el contenido de aceites y grasas totales y la composición de fracciones (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos), además de la producción de biomasa de las especies antes mencionadas. En contraste con el trabajo antes presentado, las leguminosas empleadas en este estudio no sobrevivieron al tratamiento luego de ocho semanas.

El contenido de aceites y grasas totales de los suelos contaminados disminuyó significativamente en los suelos plantados con *B. brizantha* y *C. aggregatus*, siendo *B. brizantha* la especie más efectiva. *E. indica* no mostró diferencias significativas. Aún cuando los saturados y aromáticos disminuyeron tanto en suelos plantados como en los no plantados, los primeros fueron reducidos en un 50% para *B. brizantha* y en un 30% para *C. aggregatus* respecto a los suelos no plantados, mientras que los aromáticos decrecieron un 15% más para *B. brizantha*. Las demás fracciones (resinas y asfaltenos) no fueron degradadas en ningún caso.

Debido a su importancia en la fitorremediación de suelos contaminados, Merkl y col. (2005b) evaluaron el sistema radicular de *B. brizantha*, *C. aggregatus* y *E. indica*, comparando su crecimiento en suelos contaminados con crudo pesado (5%) y suelos no contaminados. Utilizando el software WinRHIZO™ 2000, analizaron la longitud radical, superficie de área, volumen y diámetro promedio. Adicionalmente, a partir del peso seco de las raíces determinaron la longitud específica de la raíz, superficie de área específica y volumen específico de la raíz. *B. brizantha* y *C. aggregatus* mostraron disminución de la longitud específica e

incremento del diámetro promedio en los suelos contaminados respecto al control, mientras que *E. indica* no mostró cambios significativos en la morfología de las raíces. Esto indica que los suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo pesado pueden ocasionar un crecimiento de raíces más gruesas y cortas en comparación con los suelos no contaminados. Otro detalle observado fue que para *B. brizantha*, las raíces más gruesas son generalmente las más largas (mayor longitud), y para *C. aggregatus*, la mayor longitud y superficie de área las obtuvieron en las raíces más finas de los suelos sin crudo en comparación con los suelos contaminados. En el caso de *E. indica* no encontraron diferencias significativas.

Aunque *E. indica* parece ser menos susceptible a los efectos tóxicos del contaminante, muestra una plasticidad limitada ante cambios en las condiciones ambientales causados por el crudo como baja disponibilidad de agua y nutrientes y aumento de temperatura, hecho contrario al encontrado en las otras especies, las cuales, además de mostrar alta adaptabilidad, fueron capaces de disminuir los niveles de hidrocarburos del suelo, mientras que los suelos plantados con *E. indica* no mostraron diferencias significativas. Finalmente, los resultados de este estudio muestran que los hidrocarburos de petróleo además de afectar la biomasa radical de las especies, puede modificar la estructura de las raíces.

Brandt y col. (2006) evaluaron el desempeño de *Vetiveria zizanioides* (L.) Nash sobre la concentración de hidrocarburos de petróleo pesado al 5% en un suelo de sabana del Edo. Monagas. Para tal fin establecieron cinco tratamientos conjugando la presencia y ausencia del contaminante, presencia y ausencia de plantas y niveles altos, bajos o básicos de fertilizantes. Al determinar el contenido de aceites y grasas para cada tratamiento encontraron una disminución en todos los casos, sin embargo, no obtuvieron diferencias significativas entre el suelo con vegetación y el control luego de 6 meses de estudio. Los autores sugieren que posiblemente el período de ensayos debe alargarse para obtener un efecto fitorremediador. En cuanto a la biomasa, durante todo el experimento fue menor en las plantas sembradas en suelos contaminados respecto al control.

Los individuos trasplantados al suelo contaminado fueron afectados por la presencia del hidrocarburo de petróleo pesado, alcanzando un índice de mortalidad de 25% para el tratamiento con nivel bajo de fertilizante y 40% para altas dosis del mismo. Los autores argumentan que la fitotoxicidad causada por el contaminante se debe a la alta concentración aplicada al suelo además del alto contenido de hidrocarburos aromáticos (40%) que presenta el crudo empleado, debida a que dicha fracción contiene sustancias tóxicas para las plantas. Adicionalmente la textura del suelo, con bajo contenido de arcillas, limo y materia orgánica, permitió la elevada biodisponibilidad de los componentes del crudo durante todo el ensayo por la poca o ninguna absorción de estos.

HIPÓTESIS

La especie *Panicum maximum* posee capacidad para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo extrapesado.

OBJETIVO GENERAL

Probar la capacidad fitorremediadora de *Panicum maximum* en un suelo de sabana contaminado con petróleo extrapesado al 5%.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar la capacidad de *Panicum maximum* para reducir el contenido de aceites y grasas en un suelo contaminado con hidrocarburos extrapesados al 5%.
2. Evaluar cómo cambian las diferentes fracciones del hidrocarburo debido al establecimiento de *Panicum maximum*.
3. Evaluar los cambios en indicadores de la actividad microbiana, como son la actividad de la enzima deshidrogenasa, la respiración basal y el carbono de la biomasa microbiana, por el uso de *Panicum maximum* para descontaminar suelos con petróleo extrapesado al 5%.

MÉTODOS

Metodología de campo:

Se tomó una muestra de aproximadamente 40 Kg del horizonte A de un suelo proveniente de la localidad de El Sombrero, Estado Guárico, identificado como Typic Haplustox; posteriormente, en las cercanías de Facultad de Ciencias se colectaron 8 plantas de altura similar (25-30 cm de alto) pertenecientes a la especie *Panicum maximum*.

Metodología de laboratorio:

Material botánico

Panicum maximum Jacq. (nombre común: gamelote) es una gramínea perenne y de rápido crecimiento, perteneciente a la familia Poaceae. Forma macollas que pueden alcanzar hasta 3 metros de altura y de 1 a 1,5 metros de diámetro; sus tallos son erectos y ascendentes con una vena central pronunciada; sus raíces fibrosas y largas forman rizomas ocasionalmente, por lo que soporta niveles moderados de sequía. La inflorescencia es una espiga abierta con ramificaciones laterales (Cook y col. 2005).

Caracterización del suelo:

Las muestras de suelo se analizaron por triplicado para obtener información acerca de sus características físicas y químicas utilizando la metodología descrita por Anderson e Ingram (1992).

a) Análisis físico de las muestras de suelo

Textura:

Se estimó el contenido de arenas, limos y arcillas de acuerdo a la velocidad de sedimentación diferencial de cada grupo de partículas, utilizando método de

Bouyoucos. Se emplearon 50g de suelo seco y tamizado (partículas < 2mm), los cuales se mezclaron con 125 ml de agua destilada y 50 ml de solución de pirofosfato de sodio 0,02N. Se agitó la mezcla en una batidora eléctrica durante 10 minutos y se trasvasó a un cilindro graduado de 1 L de capacidad, enraizando con agua destilada. El cilindro tapado, se agitó cuidadosamente para suspender las partículas del suelo. Transcurridos 40 segundos y 5 horas en reposo se realizaron mediciones de temperatura y densidad de la suspensión, utilizando un termómetro y un hidrómetro de suelos previamente calibrado. La proporción de partículas se obtuvo a través de las siguientes ecuaciones:

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

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

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

Capacidad de campo:

Se estimó por gravedad tanto para suelo no contaminado como para el contaminado. En el primer caso, se tomó una muestra de 20 g de suelo seco y tamizado (partículas < 2mm) colocada sobre un papel de filtro Wattman #2 previamente saturado con agua. Se agregaron lenta y homogéneamente 30 ml de agua destilada sobre el suelo y se colectó el agua excedente en un cilindro graduado. La cantidad de agua retenida por el suelo constituye su capacidad de campo, la cual fue expresada como el volumen de agua retenida en 100g de suelo.

En cuanto a la determinación de la capacidad de campo para el suelo contaminado, se preparó una mezcla de 85% de suelo, 10% de cáscara de arroz y 5% de crudo; se tomó una muestra de 20 g de la mezcla seca y se procedió de igual manera que con el suelo sin contaminante.

b) Análisis químico de las muestras de suelo

Capacidad de intercambio catiónico efectiva, aluminio intercambiable, porcentaje de saturación de bases y bases intercambiables

Se determinaron los cationes intercambiables utilizando el método de extracción con acetato 1M a pH 7,0 y su concentración se determinó mediante espectrofotometría de absorción atómica. El contenido de aluminio intercambiable se determinó por titulación con una solución de hidróxido de sodio 0,1M, previa lixiviación del aluminio de la muestra con cloruro de potasio 1M. Los resultados se expresaron en cmol / Kg suelo. A partir de dichos resultados, se obtuvo la capacidad de intercambio catiónico efectiva (CICE) y el porcentaje de saturación de bases (SB), mediante las ecuaciones:

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

$$\text{SB} = ((\Sigma \text{cationes básicos})/\text{CICE}) * 100$$

Fósforo disponible

Se estimó la cantidad de fósforo disponible mediante el método vanadato-molibdato realizando su extracción con bicarbonato de sodio (NaHCO_3) 0,5M a un pH 8,5 a 2 g de suelo seco y tamizado (< 2mm), y agitando durante 30 minutos. Se transfirieron 6 ml del extracto a un balón aforado de 50 ml, se agregó una gota de p- nitrofenol y se ajustó el pH con HCl y NaOH 5N. Posteriormente, se añadieron 8 ml del reactivo B y se completó con agua destilada hasta 50 ml. Al desarrollar el color se midió la absorbancia a 880 nm.

Nitrógeno total

Empleando la técnica de oxidación de Kjeldahl, se determinó el nitrógeno presente en las muestras de suelo. Se tomó una muestra de suelo seco de 0,2 g previamente tamizado (< 0,15 mm) y se procedió a digerir con H_2SO_4 concentrado y H_2O_2 a 360 °C durante 2 horas. Se destiló el extracto y se valoró con HCl 0,01 N,

utilizando como indicador una mezcla de rojo metilo y verde bromocresol. Se obtuvo el porcentaje de N total empleando la siguiente fórmula:

$$\%N = \frac{(\text{valoración del destilado} - \text{valoración del blanco}) \times \text{Molaridad del HCl} \times 1,4}{\text{peso de la muestra}}$$

pH

Se preparó una suspensión suelo: agua en una relación 1:2,5, empleando 6g de suelo seco y tamizado (< 2mm) y 15 ml de agua destilada. Se agitó la suspensión durante 30 minutos, luego de 30 minutos de reposo se determinó el pH con un electrodo de vidrio.

Contenido de materia orgánica

Se empleó el método colorimétrico para determinar el contenido de carbono orgánico del suelo, realizando una digestión húmeda de 0,5 g de suelo seco y tamizado (< 0,15 mm) con 2 ml de dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) al 8% y 3 ml de H_2SO_4 concentrado, a 150 °C durante 30 minutos. Al enfriarse la muestra, se añadieron 10 ml de agua destilada y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos. Se trasvasaron las muestras a celdas de cuarzo para medir su absorbancia a 650 nm. Por medio del factor de Van Bemmelen (1,724) se expresaron los valores de CO a materia orgánica, mediante la siguiente ecuación:

$$\%MOS = \%CO \times 1,724$$

Efecto de la *Panicum maximum* sobre el contenido de aceites y grasas del suelo:

El efecto de *Panicum maximum* sobre la concentración de hidrocarburos de petróleo en el suelo fue evaluado mediante la siembra de cada planta en una mezcla de 2500g constituida por 85% de suelo, 5% de petróleo extrapesado y 10% de cáscara de arroz utilizada como acondicionador del suelo, empleando envases cilíndricos de PVC de aproximadamente 30 cm de alto y 10 cm de

diámetro. Como control se establecieron envases con suelo contaminado sin vegetación y sometidos a las mismas condiciones que los tratamientos con plantas (Anexo 1). Adicionalmente se crearon controles de plantas sembradas en suelo no contaminado, únicamente para evaluar el cambio en la producción de biomasa total, aérea y radical, con el fin de obtener información acerca del efecto que ejerce el contaminante sobre el crecimiento de la gramínea.

Debido a la deficiencia de nitrógeno y fósforo que suelen presentar los suelos de sabanas y los contaminados (Cauwenberghe y Roote, 1998), el suelo de cada tratamiento recibió fertilización de C:N:P en una relación 100:2:0,2 (Hutchinson y col., 2001), utilizando como fuentes de nutrimentos N:P:K: (15:15:15) y sulfato de amonio. La fertilización se incorporó un 50% al inicio del ensayo, 25% a los 30 días y 25% a los 60 días. Las plantas fueron regadas cada 5 días manteniendo el suelo a 50% de su capacidad de campo.

Para cada tratamiento se establecieron 5 réplicas, obteniendo un total de 15 unidades experimentales. Se colectaron muestras de suelo al inicio, 15, 30, 60 y 120 días de iniciado el ensayo, sólo para los tratamientos con suelo contaminado. Los análisis realizados sobre estas muestras de suelo fueron los siguientes:

Contenido de aceites y grasas

Se siguió el protocolo según el método EPA 3540 (EPA 1986) empleando como agente extractante diclorometano. Se pesaron 20 g de suelo (peso seco) por triplicado para cada serie de tiempo y se colocaron en un dedal de fibra de vidrio, luego se colocó la muestra en un extractor de solvente con 80 ml del extractante. Finalmente en el extracto obtenido se permitió la evaporación del diclorometano, siendo el residuo remanente los aceites y grasas extraídos de la muestra de suelo. El tiempo de la extracción fue de 60 minutos. Se determinó el contenido de aceites y grasas mediante la siguiente fórmula:

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

Donde,

Pf: Peso final del envase colector

Po: Peso inicial del envase colector

Pm: Peso de la muestra de suelo contaminado

Fraccionamiento del hidrocarburo

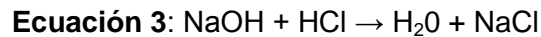
Al inicio y al término del ensayo se tomaron muestras de 10 g de suelo para determinar el contenido de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) de acuerdo al método 5520 (APHA, 1992). La muestra se colocó en un extractor de solventes con 80ml de n-heptano por 30 minutos, para separar los saturados, aromáticos y resinas (SAR), se permitió la evaporación del n-heptano, se pesó el extracto obtenido y se procedió a empacar una columna con sílica gel y hexano; se sembró la muestra en la columna y se separaron con tolueno los aromáticos y con metanol las resinas. Cada extracción se realizó en envases separados que luego fueron pesados, calculando los saturados por diferencia de peso (sabiendo de antemano el peso de SAR). Por último, se extrajeron en 30 minutos los asfaltenos de la muestra con diclorometano en el extractor, dejando evaporar el extractante y pesando el envase.

Para los análisis relacionados con la actividad biológica (Respiración basal C microbiano y actividad de deshidrogenasa), las muestras colectadas fueron refrigeradas (<4 °C) hasta su posterior análisis.

Respiración basal

El CO₂ liberado por los microorganismos al degradar los hidrocarburos de petróleo fue estimado mediante el protocolo establecido por Alef y Nannipieri (1995). Para cada tiempo de colección de muestras se utilizaron 25 g (peso seco) de suelo refrigerado y a 50% de capacidad de campo, colocados en un envase de plástico de 50 ml de capacidad. En envases de igual dimensión se colocaron 10 ml de NaOH 0,5 M. Ambos envases se colocaron en un recipiente de vidrio herméticamente cerrado y se incubó en oscuridad a 27 °C durante 48 horas, para permitir la captura de CO₂ por el álcali (expresado en la **ecuación 1**).

Transcurrido el tiempo de incubación se añadió a cada envase 1 ml de BaCl₂ para obtener el carbonato proporcional al CO₂ fijado (**ecuación 2**) y el NaOH restante se valoró con HCl 0,5 M, utilizando como indicador fenolftaleína (**ecuación 3**).



Para calcular el CO₂ fijado se empleó la siguiente fórmula:

$$\text{mgCO}_2 / \text{Kgsuelo}\cdot\text{h} = (\text{mL HClblanco} - \text{mL HClmuestra}) \times \text{Molaridad} \times 22 \times (10/2) \times (100/25) \times (\text{Kg suelo seco} / \text{Kg suelo humedo}) / \text{horas}$$

Carbono de la biomasa microbiana

Se empleó el método de fumigación-extracción según Vance y col. (1987). Se utilizaron muestras de 5 g de suelo (peso seco) a 50% de su capacidad de campo, por triplicado para cada serie de tiempo. Se fumigó la muestra con cloroformo libre de etanol, provocando la muerte de las células microbianas con lo que el contenido citoplasmático es vertido al suelo, el cual se extrajo con 40 ml de K₂SO₄ 0,5 M agitando durante 1 hora. Posteriormente se tomaron 8 ml del extracto y se añadió 15 ml de una mezcla ácida (2/3 partes de H₂SO₄ y 1/3 de H₃PO₄), 2 ml de K₂Cr₂O₇ 66,7 mM y 70 mg de HgO. La mezcla se colocó a digestión durante 30 minutos a 150°C, luego se valoró con sulfato amónico ferroso 33 mM empleando como indicador 1,10fenantrolina-ferrosa 25 mM. Se determinó la cantidad de carbono de la biomasa microbiana mediante la fórmula:

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

Donde K_{ec} =0,38, es una constante calculada a partir de la correlación de los resultados obtenidos en doce suelos con el método de fumigación incubación y método de fumigación y extracción.

Las muestras permanecieron 5 días en cámara de fumigación con cloroformo.

Coeficiente metabólico

Una vez obtenidos los resultados de respiración basal (RB) y carbono de la biomasa microbiana (Cmic) se calculó el coeficiente metabólico (qCO₂) mediante la siguiente fórmula:

$$qCO_2 = RB / Cmic \cdot \text{día}$$

Actividad de la enzima deshidrogenasa

Se llevo a cabo el método basado en la tasa de reducción del TTC (cloruro de trifeniltetrazolium) por la acción de la enzima deshidrogenasa, a TPF (trifenil formazan), un precipitado de color rojo insoluble en agua pero soluble en solventes orgánicos (según Casida y col. (1964, modificada en 1977)).

Se emplearon 1,5 g de suelo (peso seco) colocados en tubos de ensayo junto a 0,25 ml de TTC al 3%, 0,05 g de CaCO₃ y 2,5 ml de agua destilada. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se añadieron 2,5 ml de CH₃OH agitando durante 1 minuto, se filtró la muestra y se midió la absorbancia a 485 nm. Los patrones fueron preparados con una solución estándar de TPF (1mg/L). Se empleó la siguiente fórmula para determinar la actividad de la enzima:

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

Biomasa vegetal total

Adicional a las 5 réplicas del tratamiento con suelo contaminado y *P. maximum*, se establecieron otras cinco réplicas con la misma especie de planta sembrada en suelo no contaminado, bajo iguales condiciones que el anterior, con 10% de cáscara de arroz, fertilización seriada y riego cada 5 días.

Al término del ensayo (120 días) se cosecharon las plantas sembradas en suelo contaminado y en suelo no contaminado (control), se limpiaron cuidadosamente las raíces separándolas entre sí para eliminar el suelo adherido, posteriormente se separaron del vástago. Cada fracción (vástago y raíz) se secó en una estufa a 80 °C por 2 días para la posterior estimación de su peso y del peso total en gramos.

Análisis estadísticos

Las pruebas estadísticas realizadas para comparar el tratamiento con *Panicum maximum* vs. el suelo sin vegetación, fueron el análisis de varianza de dos factores, y la prueba a posteriori Fisher LSD (Least Significant Difference), con un nivel de significancia del 0,05 empleando el software Statistica 8.0.

Para el caso de la producción de biomasa, se compararon los tratamientos con suelo contaminado vs. suelo no contaminado, ambos plantados con *P. maximum*, mediante el análisis de varianza de un factor.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización del suelo:

a) Análisis físico de las muestras de suelo:

Textura y capacidad de campo:

La textura de un suelo se refiere a la proporción relativa de arena, limo y arcilla expresados como porcentajes en peso. A diferencia de otras propiedades físicas, la textura es una característica permanente de los suelos (Casanova, 2005) y determina la capacidad de absorción y almacenamiento de agua y diversos compuestos presentes, incluyendo los contaminantes (Deuel y Holliday, 1997), así como el contenido y composición del oxígeno disponible (Brady y Weil, 1996).

Los suelos arenosos permiten una mayor penetración de los hidrocarburos de petróleo en menor tiempo (Deuel y Holliday, 1997) pero aún cuando aumentan rápidamente el radio de contaminación también incrementan la disponibilidad del contaminante para los microorganismos degradadores (Cauwenberghe y Roote, 1998; Frick y col. 1999).

Es por esta razón que los suelos franco-arenosos, que no solamente contienen altos porcentajes de arena sino también de limo, ayudando a limitar la propagación del compuesto contaminante, son los recomendados para las prácticas de biorremediación (Deuel y Holliday, 1997; República de Venezuela 1998).

En concordancia con la teoría, el suelo empleado para el presente estudio es franco arenoso (Cuadro 4) y posee una capacidad de retención de agua de 41,6%, considerada como moderada a alta, permitiendo una disponibilidad de agua y oxígeno suficiente para el establecimiento de plantas y la supervivencia de microorganismos.

Cuadro 4. Proporción de las fracciones minerales del suelo

Fracciones	%
Arena	74
Arcilla	5,2
Limo	20,8

Al añadir el contaminante se obtuvo que la capacidad de campo del suelo aumentó (Cuadro 5) debido posiblemente a que al realizar la mezcla y añadir el acondicionador (cáscara de arroz) incrementó la porosidad del suelo y por lo tanto los espacios de acumulación de agua. Adicionalmente, la materia orgánica adicionada como cáscara de arroz absorbió parte del agua adicionada por su características hidrofílicas (Brady y Weil, 1996).

Cuadro 5. Capacidad de campo del suelo contaminado y no contaminado

	Capacidad de campo (%)
Suelo no contaminado	41,6
Suelo contaminado	53,7

b) Análisis químico de las muestras de suelo:

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

En Venezuela, los suelos ácidos se ubican principalmente en los llanos centrales y orientales, así como también en la región sur del país (Casanova, 2005). El suelo empleado en este estudio pertenece al Edo. Guárico y cumple con lo anteriormente mencionado.

En el cuadro 6 se presentan los valores obtenidos en el análisis químico del suelo, los cuales evidencian la poca fertilidad del suelo, debido a la baja

concentración de N, P, materia orgánica, bases cambiables y capacidad de intercambio catiónico. Además, el pH obtenido (4,9) muestra la condición ácida característica de los suelos de sabana con bajo contenido de nutrientes, lo que afecta el crecimiento de las plantas y la actividad biológica (Cauwenberghe y Roote, 1998).

Cuadro 6. Propiedades químicas de las muestras de suelo.

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

Debido a la baja disponibilidad de nutrientes se realizó la adición de fertilizantes para crear condiciones que permitan un mejor desempeño de las plantas y los microorganismos y así asegurar que su actividad pueda influir en el contenido de hidrocarburos de petróleo añadido. Por otro lado, no fue necesario aumentar el pH mediante la técnica de encalado porque en suelos ácidos la degradación de este tipo de contaminantes es posible (Stapleton, 1998).

Efecto de la gramínea sobre los niveles de contaminación del suelo:

Contenido de aceites y grasas:

Como primer aspecto debe destacarse que la recuperación del crudo no fue total, de la mezcla originalmente preparada al 5% se obtuvo una concentración inicial con el diclorometano del 3,75%, lo que indica una recuperación del 75% aproximadamente. Este porcentaje de recuperación es cónsono con otros

resultados en la literatura (Infante y col. 2012) y se asocia con que los extractantes no logran la extracción total del crudo y que parte del mismo se volatiliza durante los procesos de mezcla, especialmente aquellas sustancias más volátiles como saturados y aromáticos.

La evaluación de la tasa de cambio del contenido de aceites y grasas en el suelo contaminado corresponde al parámetro más importante de este estudio para determinar la tasa de biodegradación del crudo, debido a que representa una de las medidas más directas del contenido de crudo en el suelo (Infante y col., 2010) y es uno de los métodos estandarizados de mayor uso (Deuel y Holliday, 1997). Sin embargo, debe destacarse que la metodología no discrimina los aceites y grasas de origen mineral de aquellas de origen vegetal; no obstante, se presume que estas últimas se encuentran en concentraciones muy bajas. La legislación venezolana establece en el Decreto 2635 (República de Venezuela 1998): a) Para que en un suelo contaminado se pueda aplicar el biotratamiento, el contenido de hidrocarburos biodegradables (saturados y aromáticos) no debe exceder el 10% (Artículo 53) y b) la meta de limpieza de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en el suelo se alcanzará cuando el contenido de aceites y grasas sea menor al 1% (Artículo 50).

En la figura 1 se muestra la cinética de disminución obtenida tras la determinación del contenido de aceites y grasas del suelo con *P. maximum* y el control a lo largo del período de estudio. El valor absoluto al inicio del ensayo para el suelo con plantas y control fue de 3,745%, el cual disminuyó en promedio a 3,11% en el suelo con *P. maximum* y 3,38% en el control al finalizar el estudio (120 días), siendo estadísticamente diferentes entre sí y respecto al inicio del ensayo (Anova de dos factores), demostrando el efecto positivo de la planta. También, en el caso del tratamiento con *P. maximum*, se encontraron diferencias significativas entre dicho valor del día 120 y los resultados obtenidos para el resto de los días.

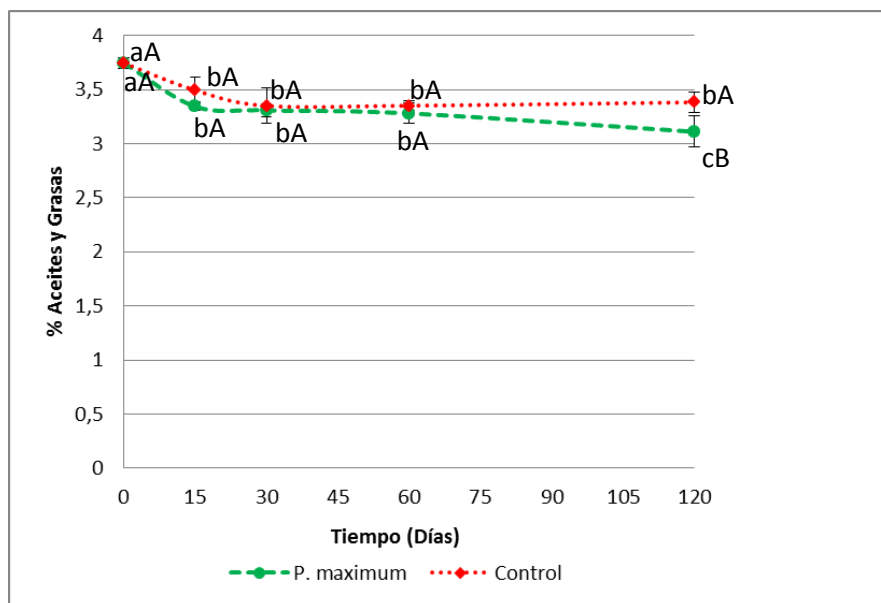


Figura 1: Variación en el contenido de aceites y grasas del hidrocarburo de petróleo extrapesado en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo; Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo).

La baja disminución en el contenido de aceites y grasas obtenida al finalizar el ensayo puede explicarse a través de la relación existente entre este parámetro y la gravedad API ó °API del crudo reportada por McMillen y col. (2004), la cual es directamente proporcional. El crudo empleado en este estudio posee una gravedad API de 9,3°, considerada como baja, lo que clasifica al contaminante como un hidrocarburo de petróleo extrapesado. Los hidrocarburos de petróleo con baja gravedad API contienen, en mayor proporción, compuestos de alto peso molecular como las resinas y asfaltenos, cuya resistencia a la biodegradación es mayor respecto a los compuestos más lábiles como los saturados y aromáticos.

Adicionalmente, los compuestos de bajo peso molecular tienen un efecto tóxico importante sobre las plantas y microorganismos, que aunado a la resistencia de los compuestos con alto peso molecular, influyen en la capacidad fitorremediadora de la planta, atenuando su efecto (Baker, 1970).

Cabe destacar que desde el inicio hasta los 15 días de muestreo se obtuvo una rápida disminución de los aceites y grasas (10,7% de reducción para *P. maximum* y 6,71% para el control), cuyos resultados son estadísticamente diferentes al inicio del ensayo, pero semejantes a los dos períodos siguientes (30 y 60 días).

Posiblemente en las etapas iniciales del ensayo ocurrieron los procesos de adsorción, volatilización y descomposición de los componentes más lábiles presentes en el contaminante (Simonich y Hites, 1994) como por ejemplo los saturados y aromáticos, lo que explica la disminución obtenida en el día 15. Esto coincide con lo reportado por Mager (2002) quien encontró que desde el inicio hasta los 30 días de experimento el contenido de aceites y grasas disminuyó rápidamente.

Al realizar el anova de dos factores se obtuvo que los tratamientos son diferentes entre sí ($p=0,0059$) al igual que los valores obtenidos en los diversos tiempos de muestreo ($p=0$), sin embargo, al relacionar ambas variables se encontró que no existe sinergia, esto se debe a que el efecto del tiempo es significativamente mayor ($F=25,59$) al efecto de la variable tratamiento ($F= 9,47$) por lo tanto la disminución del contenido de aceites y grasas responde en gran medida al tiempo; no obstante, como ya se mencionó, el efecto de las plantas fue mayor respecto al control al finalizar el estudio.

Del mismo modo, Mager (2002) reportó que *Panicum maximum* posee la capacidad de remediar suelos contaminados con 3% de crudo liviano, disminuyendo su concentración en un 65,7% luego de 120 días.

Al igual que *P. maximum*, existen otras gramíneas que favorecen la descontaminación de suelos con hidrocarburos de petróleo. En este sentido, Mager (2002), obtuvo una disminución del contenido de aceites y grasas de 51% en 120 días con el uso de *B. brizantha* en un suelo con crudo liviano al 3%. Por otro lado, Merkl y col. (2005a) lograron disminuir significativamente la contaminación de un suelo con crudo pesado al 5% empleando *Cyperus*

aggregatus y *B. brizantha*, siendo ésta última la especie más efectiva, disminuyendo los aceites y grasas un 22% más que su control.

Por su parte, la planta *Vetiver zizanioides*, a pesar de mostrar una disminución en el contenido de aceites y grasas en un suelo con petróleo pesado al 5% (Brandt y col., 2006), no se encontraron diferencias estadísticamente significativas luego de 6 meses de ensayo al comparar con el inicio, por lo tanto, los autores sugieren estudiar la capacidad fitorremediadora de la planta en un tiempo más prolongado que permita mostrar con mayor precisión los cambios de este parámetro en el suelo contaminado con crudo pesado.

Del igual manera, debido a que el contenido de aceites y grasas en el presente estudio no cumple con lo establecido en el Decreto 2635, porque excede el 1%, se sugiere que las próximas investigaciones de fitorremediación con crudo extrapesado y *Panicum maximum* establezcan ensayos con mayor duración para conocer el tiempo estimado en el que la planta recupera el suelo contaminado y comprobar su efectividad.

Fraccionamiento del hidrocarburo (SARA):

El análisis de distribución de las distintas fracciones de hidrocarburos de petróleo, saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA), es una metodología ampliamente utilizada en Venezuela para la evaluación de la degradación de estos contaminantes mediante técnicas biológicas (Infante y col., 2010) debido a que se conoce que los hidrocarburos saturados y aromáticos son las fracciones biodegradables del petróleo, mientras que las resinas y asfaltenos son muy resistentes a la degradación (Atlas y Bartha, 1998).

La figura 2 muestra la variación de las cantidades de cada una de las fracciones del hidrocarburo contenidas en el suelo con *P. maximum* y el control.

Al inicio del ensayo se observó que la concentración de aromáticos (5,87%) fue significativamente menor que las cantidades de resinas y asfaltenos (30,37%)

con $p= 0,03$ y $38,06\%$ con $p= 0,0005$, respectivamente), confirmando que el crudo extrapesado, en este caso de $9,3$ °API, contiene en mayor proporción compuestos polares (resinas y asfaltenos) en comparación con los aromáticos de menor peso molecular y menor resistencia a la biodegradación (McMillen y col, 2004; Infante y col., 2010). A pesar de encontrar un menor porcentaje de saturados ($25,68\%$) respecto a los hidrocarburos polares, no hubo diferencias significativas entre éstos.

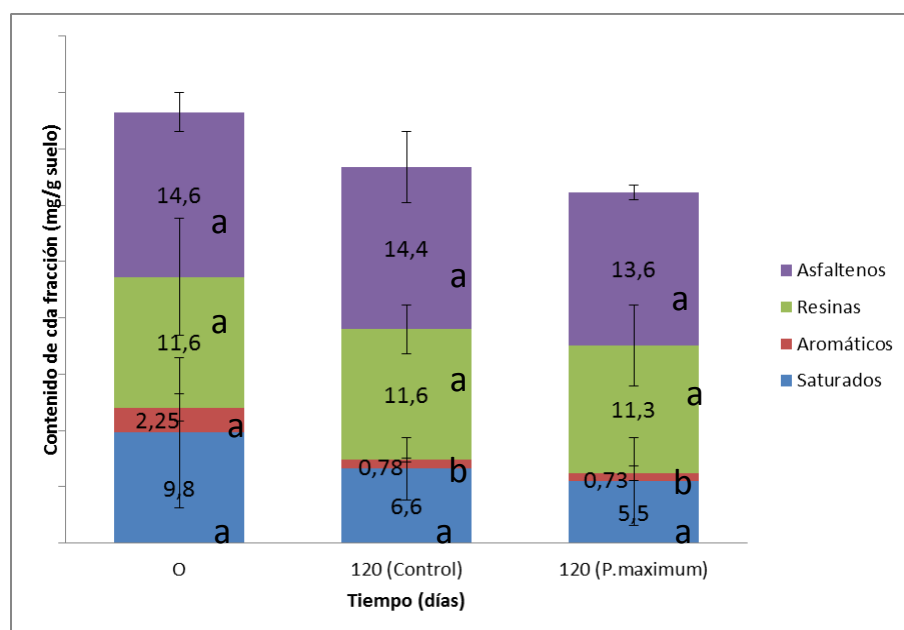


Figura 2: Variación en el contenido de cada una de las fracciones (SARA) del hidrocarburo de petróleo extrapesado en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Las letras iguales indican que no hay diferencia dentro de cada fracción en el tiempo).

Los saturados y aromáticos son consideradas las fracciones más lábiles del crudo y por lo tanto más biodegradables (Atlas y Bartha, 1998; Simonich y Hites, 1994). Para *P. maximum* el contenido de los hidrocarburos saturados disminuyó un $43,6\%$, mientras que el control alcanzó un porcentaje de $33,17\%$ de disminución. Sin embargo, el anova de dos vías no mostró diferencias significativas entre tratamientos, tiempos, ni al relacionar ambas variables.

En cuanto a los aromáticos, la pérdida obtenida fue del 67,42% para el suelo con *P. maximum* y 65,34% para el control. Los resultados mostraron diferencias significativas únicamente respecto al tiempo ($p= 0,024$), es decir, entre tratamientos no se encontraron diferencias significativas, lo que indica que el tiempo es el factor que influye en la pérdida de este hidrocarburo para ambos ensayos.

Como se ha mencionado anteriormente, sobre el grupo de los hidrocarburos lábiles actúan procesos de atenuación natural que influyen en la disminución de su concentración en el suelo; en este caso dichos procesos tuvieron un efecto mayor en comparación con la presencia de la planta, cuyo tratamiento no favoreció significativamente la descontaminación del suelo respecto al control.

La disminución de las resinas para *P. maximum* fue de 2,78% y para el control 0,37% respecto al inicio del ensayo; no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre tratamientos ni tiempos, así mismo no se encontró relación significativa entre las variables.

Por su parte, los asfaltenos presentaron una disminución de 6,43% y 1,42% para *P. maximum* y el control, respectivamente. Estadísticamente los resultados no presentaron diferencias.

Los resultados obtenidos concuerdan con reportes anteriores que señalan que el crudo extrapesado posee mayor cantidad de resinas y asfaltenos respecto al crudo liviano y pesado (McMillen y col., 2004), los cuales son compuestos recalcitrantes difíciles de degradar (Schwendinger, 1968).

Merkl y col. (2005a) encontraron que, luego de 180 días en un suelo contaminado con petróleo pesado al 5%, las fracciones de saturados y aromáticos disminuyeron tanto en los suelos plantados con *Brachiaria brizantha* y *Cyperus aggregatus*, como en sus controles, alcanzando un 15% de disminución de aromáticos con *B. brizantha* respecto al suelo sin vegetación. Por su parte, ni las

plantas por ellos estudiadas, ni sus respectivos controles mostraron degradación de resinas y asfaltenos.

Respiración basal:

Las investigaciones sobre las características biológicas del suelo, como la respiración del mismo, pueden proporcionar información relevante acerca de la presencia de microorganismos así como también de la intensidad, tipo y duración de los efectos de contaminantes sobre el metabolismo del suelo, por lo tanto representan una medida del impacto de la contaminación (Schinner y col., 1996).

La respiración basal, además de ser un indicador del metabolismo del suelo, permite determinar la contribución de la microbiota al flujo de CO₂ (Romero, 2010). En nuestro caso particular, el crudo es un sustrato carbonado que los microorganismos tienen potencial de utilizar como fuente de C y energía y la oxidación del mismo para generar CO₂; de manera que a mayor degradación del crudo mas será la emisión de este gas.

En la figura 3 se muestran los mg de CO₂ emitidos para cada uno de los tiempos evaluados. En el tratamiento con *P. maximum*, a pesar de observar un incremento desde el inicio hasta los 30 días de ensayo, ningún período varió significativamente respecto al inicio del ensayo; por su parte para el tratamiento control se obtuvo una cinética de disminución progresiva a lo largo del período de estudio, sin picos de emisión.

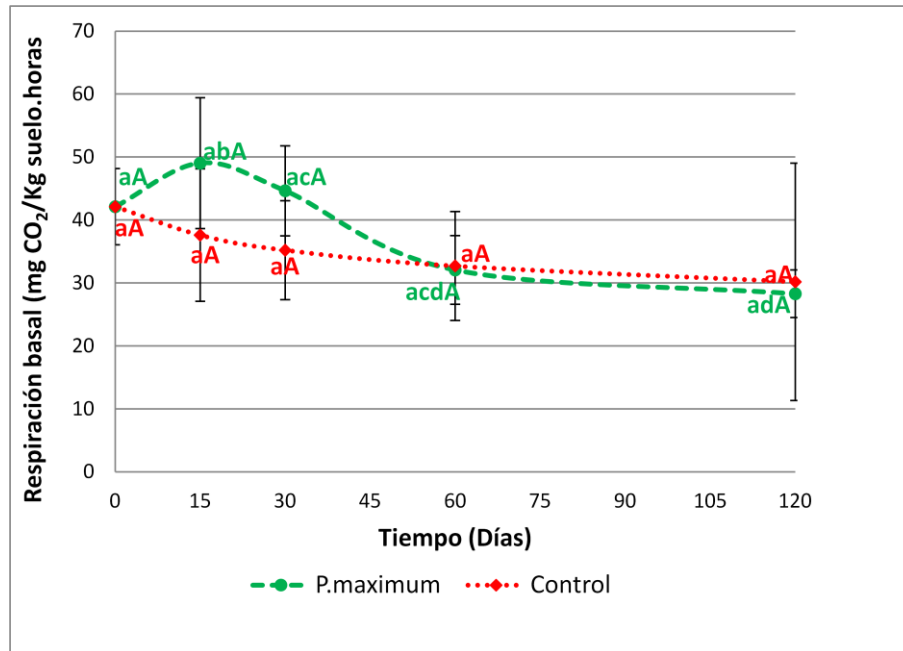


Figura 3: Variación de la respiración basal en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo; Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo).

Al inicio del experimento la respiración basal fue en promedio de 42,75 mg CO₂/Kg de suelo día para ambos tratamientos. El máximo valor promedio obtenido fue de 49,04 mg CO₂/Kg de suelo día encontrado en el suelo con *P. maximum* a los 15 días de experimento, el cual es estadísticamente diferente a los valores hallados para el mismo tratamiento a los 60 ($p= 0,038$) y 120 ($p= 0,013$) días, así como también para los 60 ($p= 0,045$) y 120 ($p= 0,023$) días del control.

Adicionalmente, se encontraron diferencias significativas entre los 30 y 120 días del tratamiento con *P. maximum* ($p= 0,045$).

Por otro lado, el control no mostró cambios de este parámetro a lo largo del tiempo.

En el gráfico correspondiente (Fig. 3) se observa que la media de los valores obtenidos para el suelo con *P. maximum* a los 120 días es menor que los

días 15 y 30 del mismo tratamiento (diferentes significativamente), lo que puede estar indicando que la actividad de los microorganismos tiende a disminuir una vez que la concentración del hidrocarburo de petróleo extrapesado añadido ha disminuido, especialmente aquellas fracciones más lábiles como lo demuestra el análisis del contenido de aceites y grasas y el SARA.

Sin embargo, la ausencia de diferencias significativas entre el inicio del ensayo y los períodos restantes, tanto en el tratamiento con la planta como en el control, sugiere que la respiración basal no fue un buen indicador de la actividad microbiana por su baja sensibilidad ante los cambios entre tratamientos y tiempos.

En el estudio de biorremediación realizado por Margesin y col. (1999), empleando hidrocarburos de petróleo liviano se reportó que los microorganismos del suelo parecen tolerar y utilizar rápidamente las nuevas fuentes de carbono añadidas, debido al incremento encontrado especialmente durante la primera semana del ensayo en diversos parámetros, entre los que se encuentran, respiración basal, actividades enzimáticas y biomasa microbiana. El posterior decaimiento de los valores encontrados para los parámetros biológicos evaluados, lo atribuyen a la reducción de la biodisponibilidad de las fuentes de carbono y a la posible acumulación de compuestos recalcitrantes y/o tóxicos en el curso de la biodegradación.

Carbono de la biomasa microbiana:

La biomasa microbiana del suelo ha sido definida como la fracción viviente de la materia orgánica menor a $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$, es decir, excluye las raíces de las plantas y los organismos de mayor tamaño (Jenkinson y ladd, 1981), y constituye entre el 1 y 5% del carbono orgánico total (Alef y Nannipieri, 1995).

El método de fumigación-extracción para la estimación de este parámetro fue escogido como indicador de la actividad metabólica del suelo porque la biomasa microbiana juega un doble papel: es un agente de transformación de todos los minerales orgánicos que llegan al suelo y representa un reservorio de

elementos fundamentales entre los que se encuentran el fósforo, nitrógeno y carbono (Jenkinson y Ladd, 1981; Frankenberger y Dick, 1983). Además, este parámetro constituye un indicador sensible a la contaminación del suelo (Alef y Nannipieri, 1995).

En la figura 4 se observan las conductas del carbono de la biomasa microbiana obtenidas para cada tratamiento. El suelo con *P. maximum* mostró un incremento de este parámetro desde el inicio hasta los 60 días del ensayo, luego se obtuvo una estabilización, ya que los valores obtenidos a los 120 días, que parecen mostrar una disminución, no mostraron diferencias significativas con el día 60.

Por su parte, el control no mostró cambios significativos en el contenido de carbono microbiano.

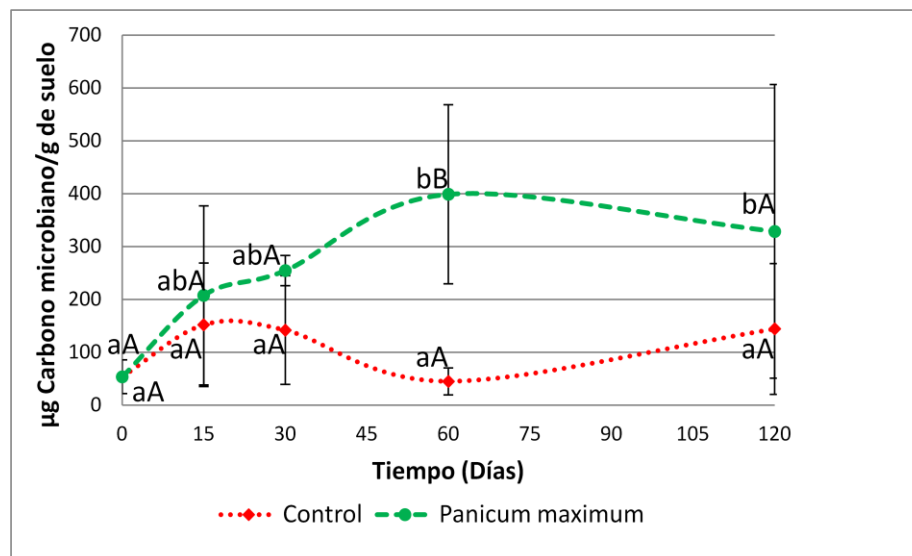


Figura 4: Variación del carbono de la biomasa microbiana en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo; Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo).

Cabe destacar que la estimación del carbono de la biomasa microbiana presenta una gran variabilidad (Alef y Nannipieri, 1995), confirmada en el registro obtenido durante el período de estudio. Es posible que las muestras colectadas presenten diferencias en cuanto a la presencia de raíces (para el tratamiento con la planta), que afectan la estimación de los resultados debido a que éstas son difíciles de distinguir por su tamaño.

El Anova de dos factores mostró diferencias significativas entre ambos tratamientos ($p= 0,0087$), así como también entre el inicio y los 60 ($p= 0,041$) y 120 ($p= 0,027$) días de ensayo.

Al evaluar ambas variables simultáneamente se hallaron diferencias entre los 60 días del suelo con *P. maximum* y los resultados obtenidos al inicio ($p=0,005$), 15, 30, 60 y 120 días del tratamiento control ($p_{15}= 0,035$; $p_{30}= 0,028$; $p_{60}= 0,0039$; $p_{120}= 0,029$); de igual manera, los valores obtenidos en las muestras del suelo con *P. maximum* al día 120 resultaron significativamente distintos a los 60 días del control ($p= 0,017$).

De los resultados obtenidos se desprende que al añadir el hidrocarburo de petróleo, en el tratamiento con plantas comienzan a incrementar las poblaciones de los microorganismos que son capaces de utilizar el contaminante como fuente de carbono.

En cuanto al control, al no encontrar diferencias significativas entre los resultados del mismo ensayo, se asume que no hubo variación en la biomasa microbiana durante el período de estudio. Esto indica que el crecimiento de los microorganismos ocurre con mayor lentitud cuando la planta está ausente; por lo tanto, *P. maximum* disminuye la influencia que el crudo puede tener sobre las poblaciones microbianas mediante los exudados que aporta en la rizósfera.

Por otro lado, Mager (2002), al obtener resultados similares tanto con *P. maximum* como con *B. brizantha*, sugiere que al inicio de la contaminación por hidrocarburos pueden presentarse condiciones tóxicas que las poblaciones de

microorganismos no toleran fácilmente, luego al pasar por el proceso de degradación los compuestos tóxicos disminuyen y se registra un repunte de la biomasa microbiana.

Esta última propuesta concuerda con lo obtenido en el tratamiento control al realizar el análisis de respiración basal, debido a que dicho análisis mostró que los microorganismos no lograron aumentar su actividad metabólica durante todo el ensayo posiblemente debido a la toxicidad presente en el suelo, mientras que en el tratamiento con plantas la respiración aumentó gracias a las mejores condiciones del suelo.

Coeficiente metabólico

El coeficiente metabólico (qCO_2) se refiere a la tasa de respiración de los microorganismos por unidad de biomasa e indica la eficiencia en la adquisición de carbono orgánico y la intensidad de la mineralización del carbono (Dilly y col., 1997).

El valor obtenido para ambos tratamientos al inicio del ensayo fue en promedio 110385,479 mg CO_2 / g CBM·día. En el ensayo con *P. maximum* el qCO_2 desde los 15 hasta los 120 días de experimento fue significativamente diferente al tiempo 0 ($p_{15}= 0,007$; $p_{30}= 0,008$; $p_{60}= 0,006$; $p_{120}= 0,006$), mostrando una disminución en todo el período; asimismo, los resultados obtenidos los días 60 y 120, para el tratamiento con plantas, fueron similares entre sí ($p= 0,99$) y significativamente diferentes a los días 15 ($p_{60}= 0,0005$; $p_{120}= 0,009$) y 30 ($p_{60}= 0,033$; $p_{120}= 0,04$); estos últimos también se asemejan entre sí ($p= 0,8$) (Fig. 9).

Por su parte, el qCO_2 del control mostró una disminución desde el inicio hasta el día 30, un posterior aumento hasta el día 60 y un decaimiento desde éste momento hasta el término del ensayo (Fig. 5). El qCO_2 fue similar para el inicio y los 60 días de muestreo ($p= 0,3$) pero significativamente diferente a los resultados encontrados a los 15 ($p_0= 0,008$; $p_{60}= 0,005$), 30 ($p_0= 0,01$; $p_{60}= 0,008$) y 120 ($p_0=$

0,007; $p_{60} = 0,004$) días; a su vez, el decaimiento registrado a los 120 días fue diferente al obtenido el día 15 ($p = 0,005$).

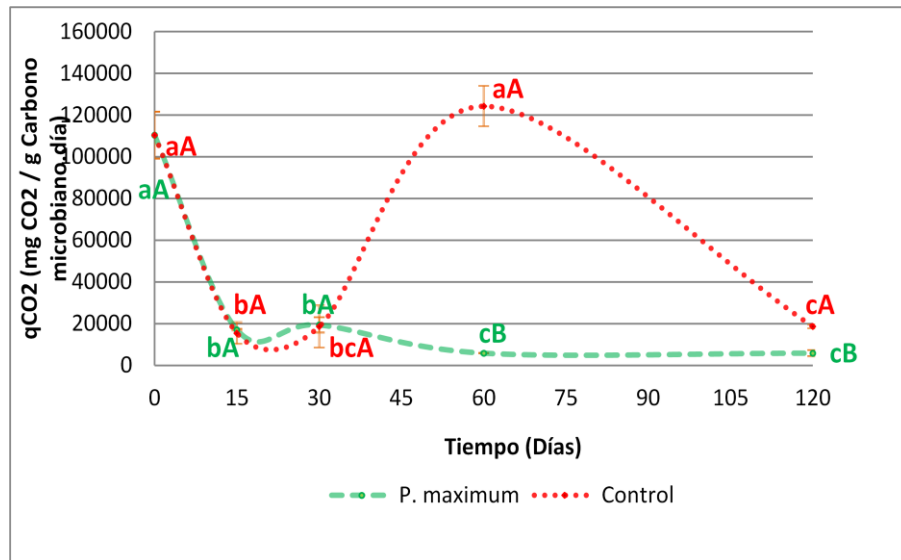


Figura 5: Variación del coeficiente metabólico en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo; Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo).

Entre tratamientos, los resultados fueron significativamente diferentes a los días 60 y 120. Los resultados indican que al inicio los microorganismos presentan una alta tasa de emisión de dióxido de carbono por masa de C microbiano y posteriormente decae en el tiempo, excepto en el tratamiento control que se observa un nuevo pico a los 60 días. Para los días 60 y 120 el qCO_2 fue menor en el tratamiento con plantas, lo que pudiera sugerir una condición ambiental menos estresante.

Actividad de la enzima deshidrogenasa:

Para detectar algún tipo de degradación en los suelos se considera principalmente la evaluación de sus propiedades biológicas y bioquímicas debido a su íntima relación con el ciclo de nutrientes (Visser y Parkinson, 1992), entre

éstas, las actividades enzimáticas son especialmente importantes gracias a su gran contribución en la degradación de materia orgánica del suelo (Frankenberger y Dick, 1983).

Entre las enzimas indicadoras de degradación se encuentra la deshidrogenasa, cuya actividad es considerada un buen exponente de las actividades oxidativas del suelo, debido a que la oxidación de los compuestos orgánicos ocurre generalmente mediante un proceso de deshidrogenación catalizado por esta enzima (Alef y Nannipieri, 1995). Además, la actividad de las enzimas deshidrogenasas representa una medida directa de las actividades microbianas, debido a que son exclusivamente intracelulares y los microorganismos que llevan a cabo esta actividad son los más activos dentro de la comunidad microbiana del suelo (García y Hernández, 1997).

En la figura 6 se muestran los cambios de la actividad de la enzima deshidrogenasa encontrados para ambos tratamientos. En el ensayo con *P. maximum* se obtuvo un incremento de la actividad de la enzima desde el inicio hasta los 30 días y una posterior disminución hasta los 120 días de ensayo. Por su parte, el control no mostró cambios respecto al inicio del ensayo.

El Anova de dos factores mostró que tanto los tratamientos ($p= 0,026$) como la variable tiempo ($p= 0,0009$) son significativamente diferentes, sin embargo, no existe relación o sinergia entre ambas variables.

En cuanto al tiempo, el día 30 resultó ser diferente a los días 0, 60 y 120 (con $p= 0,0056$; $0,022$ y $0,00007$, respectivamente); por su parte el día 15 fue distinto al 120 ($p= 0,0013$) y este último también al día 60 ($p= 0,02$).

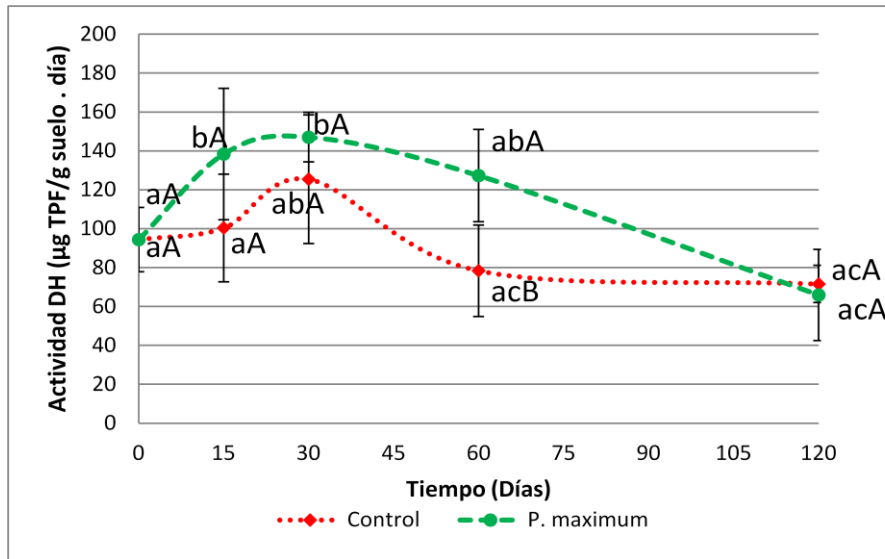


Figura 6: Variación de la actividad de la enzima deshidrogenasa en el suelo con *Panicum maximum* vs. suelo sin plantas (Letras minúsculas iguales indican que no hay diferencias dentro de cada tratamiento para cada tiempo; Letras mayúsculas iguales indican que no hay diferencias entre tratamientos para cada tiempo).

Respecto a los tratamientos, al inicio del ensayo el valor promedio obtenido de actividad de la enzima para ambos ensayos fue de 94,39 µgTPF/g suelo, el cual fue estadísticamente diferente únicamente a los resultados de los días 15 ($p=0,032$) y 30 ($p=0,012$) para el tratamiento con *P. maximum*. Adicionalmente, para el suelo con *P. maximum* los días 15, 30 y 60 fueron estadísticamente diferentes al día 120 ($p=0,011$; 0,000039 y 0,045, respectivamente). Para el suelo control, únicamente el día 30 fue diferente al día 60 ($p=0,023$) y al 120 ($p=0,01$)

Entre tratamientos las diferencias estadísticas para un mismo tiempo solo se encontraron a los 60 días de ensayo ($p=0,018$). Las disimilitudes restantes se resumen en el cuadro 7.

Cuadro 7. Diferencias significativas entre tratamientos de actividad de la enzima deshidrogenasa (valores p)

	<i>P. maximum</i> 15	<i>P. maximum</i> 30	<i>P. maximum</i> 60	<i>P. maximum</i> 120
Control 15		0,023		
Control 30				0,0054
Control 60	0,0051	0,0017	0,018	
Control 120	0,0022	0,00078	0,0084	

La conducta observada indica la influencia del contaminante sobre la actividad microbiológica del suelo. Al inicio del experimento, el hidrocarburo de petróleo extrapesado favoreció el desarrollo de los microorganismos presentes en el tratamiento con la palnta, el cual se ve reflejado en el aumento de la actividad de la enzima deshidrogenasa, porque el contaminante está siendo degradado y metabolizado por la comunidad microbiana para formar CO₂ debido a la permanencia de compuestos biodisponibles del contaminante. Por su parte, el control no mostró un aumento significativo de la actividad de la enzima debido a que la utilización de la fuente de carbono la realizan con mayor lentitud los microorganismos en ausencia de plantas, debido a los beneficios que aporta la planta a nivel rizosférico.

A partir de los 60 días para el ensayo con *P. maximum*, se obtuvo un decaimiento de la actividad de la enzima, posiblemente porque el sustrato carbonado ha disminuido al ser metabolizado y los hidrocarburos restantes no han podido ser utilizados como fuente de carbono debido a que estructuralmente son menos disponibles por su condición recalcitrante (Margesin y Schinner, 1997). Posiblemente, la disminución encontrada a los 30 días en el control, la cual fue diferente estadísticamente al día 15, se deba a la misma explicación, sin embargo, los valores fueron similares al inicio del ensayo, en todos los períodos.

En los resultados encontrados se observa que la actividad de la enzima deshidrogenasa en el tratamiento con *P. maximum* tuvo la tendencia a ser mayor que en el control (Fig. 6), siendo estadísticamente diferentes en el día 60 (Cuadro 7). Lo que indica que efectivamente, la presencia de la planta contribuye a la

estimulación de los microorganismos degradadores del contaminante, ya sea mediante los exudados de nutrientes que proporciona a la rizósfera, o aumentando el transporte de agua y oxígeno a través de los canales radicales (Cunningham y col., 1996).

Adicionalmente, no se encontró correlación entre éste parámetro y el carbono de la biomasa microbiana ni la respiración basal, así como tampoco entre estos últimos. Lo que sugiere la importancia de evaluar numerosos indicadores de la actividad microbiana, como por ejemplo, actividades de enzimas indicadoras de contaminación (ureasa, β -glucosidasa, etc.), conteo de microorganismos y su caracterización, entre otros, para lograr una estimación confiable del comportamiento de la comunidad microbiana.

En el estudio de Margesin y col. (1999), donde evaluaron diversos parámetros del suelo en un suelo contaminado con crudo liviano al 0,5%, encontraron que, en concordancia con esta investigación, la actividad deshidrogenasa aumentó luego de la contaminación y disminuyó al decaer el contenido de hidrocarburos añadidos, cuyo porcentaje de disminución fue de 73 a 88%.

Asimismo, Mager (2002) al evaluar la actividad de esta enzima en un suelo contaminado con 3% de crudo liviano y tratado con *P. maximum* y *B. brizantha*, por separado, obtuvo un incremento de la actividad desde el inicio hasta los 30 días de ensayo y una posterior disminución a los 60 y 120 días. La respuesta fue atribuida al contenido de hidrocarburos disponibles en el suelo, proponiendo su metabolización por los microorganismos del suelo.

Biomasa vegetal total

La estimación de la producción de biomasa radical y aérea de las plantas sembradas en suelos contaminados es un parámetro de gran importancia que indica la magnitud del efecto del contaminante sobre el desarrollo de la especie estudiada, la cual proporciona las condiciones para estimular la actividad

microbiana a nivel de la rizósfera mediante la proporción de nutrientes, aumento del transporte de agua y oxígeno a través de los canales radicales, entre otros (Cunningham y col., 1996).

La biomasa aérea de *Panicum maximum* (Fig. 7) se redujo en el suelo contaminado un 21,11% respecto al suelo no contaminado, mientras que la biomasa radical (Fig. 8) disminuyó un 38,52%. En cuanto a la biomasa total (Fig. 9), la disminución fue de 28,18%. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre ambos tratamientos, lo que se explica por la alta variabilidad de las determinaciones de biomasa y el empleo de plantas ya establecidas y bien desarrolladas que luego fueron trasplantadas a las condiciones de contaminación. También la naturaleza del crudo pudo influir en los resultados obtenidos. Al emplear hidrocarburo de petróleo extrapesado, los componentes recalcitrantes se encuentran en mayor proporción, mientras que los biodegradables, como los saturados y aromáticos que contienen compuestos fitotóxicos (Baker y col., 1970), están menos concentrados (McMillen y col., 2004), aportando un efecto inhibitorio menor en el crecimiento de las plantas respecto al que puede aportar un hidrocarburo más liviano.

Como se mencionó anteriormente, el crudo utilizado en este estudio contiene 5,87% de aromáticos, 25,68% de saturados, 30,37% de resinas y 38,06% de asfaltenos.

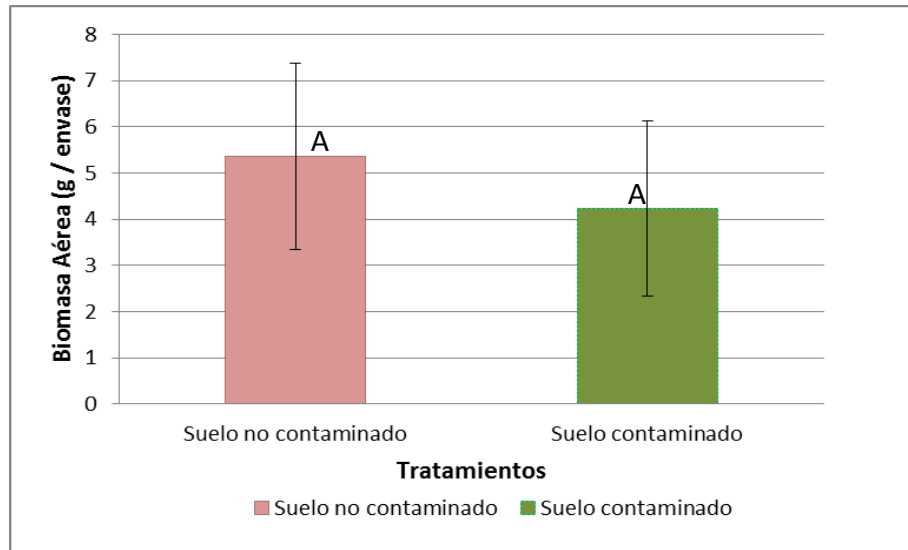


Figura 7: Biomasa aérea (vástago) de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado (Letras mayúsculas iguales: similitud entre tratamientos).

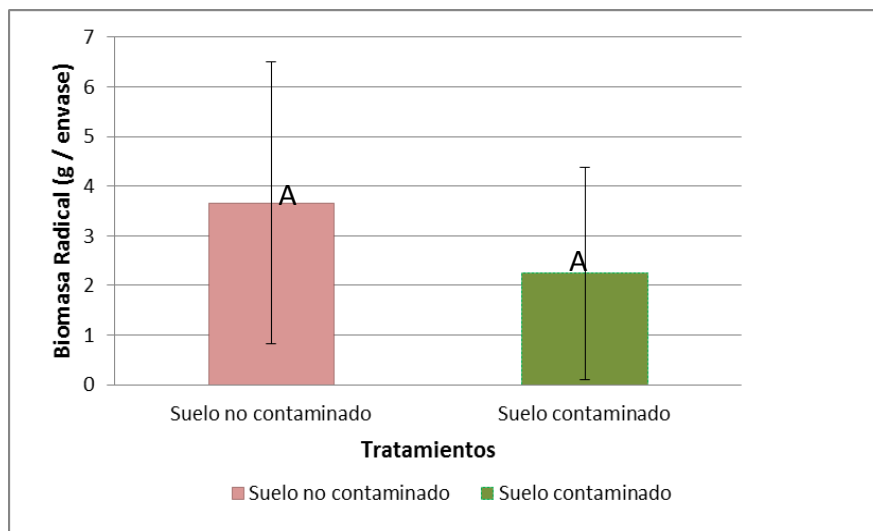


Figura 8: Biomasa radical de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado (Letras mayúsculas iguales: similitud entre tratamientos).

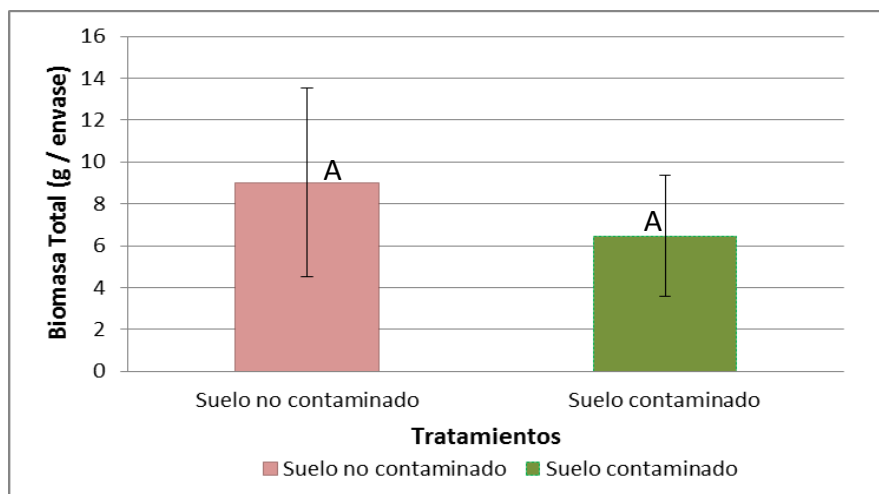


Figura 9: Biomasa total de las plantas sembradas en suelo contaminado vs. suelo no contaminado (Letras mayúsculas iguales: similitud entre tratamientos).

Diversos estudios realizados con plantas desarrolladas en suelos contaminados muestran que las gramíneas sufren cambios significativos bajo la influencia de los hidrocarburos de petróleo. Merkl y col. (2004) encontraron que debido al alto contenido de aromáticos (40%) presentes en el crudo, la biomasa de todas las gramíneas evaluadas disminuyó luego de 30 días, siendo *Panicum maximum* la más afectada alcanzando únicamente el 15% de la biomasa que obtuvo el control, sin obtener diferencias significativas entre los suelos con 3 y 5% de contaminación.

Hernández-Valencia y Mager (2003) reportaron, luego de 45 días de ensayo, una disminución de biomasa total del 85 y 99% respecto al control para *B. brizantha* y *P. maximum*, respectivamente, en suelo contaminado con hidrocarburo de petróleo liviano, el cual contiene mayor proporción de compuestos con bajo peso molecular y mayor toxicidad (Merkl y col., 2004; Baker, 1970). Por otro lado, Merkl y col. (2005a) evidenciaron que, a los 180 días de experimento, la producción de biomasa aérea y radical fue significativamente baja en suelo contaminado con hidrocarburo de petróleo pesado al 5% para *B. brizantha* y *C. aggregatus* (36,1% y 11,1% del valor encontrado en el control, respectivamente). Sin embargo, estos experimentos se llevaron a cabo empleando semillas, por lo

tanto no son comparables con nuestros resultados; es posible que por el uso de plantas adultas no se encontraran diferencias significativas al evaluar el efecto del crudo sobre la especie.

Por otro lado, Brandt y col. (2006) al estudiar el efecto de hidrocarburos de petróleo pesado al 5% sobre *Vetiveria zizanioides*, empleando plantas ya establecidas, obtuvieron una reducción significativa de 40 a 50% de biomasa total respecto al control, luego de 180 días, utilizando un crudo pesado con 40% de hidrocarburos aromáticos.

Estudio con *Trachypogon spicatus*

Inicialmente, la intención del presente estudio fue realizar una comparación entre las capacidades fitorremediadoras de *Panicum maximum* y *Trachypogon spicatus*, debido a que ésta última es la especie nativa y más común de las sabanas venezolanas, donde se concentra gran parte de la producción petrolera del país. Con fines de remediación y restauración de los ecosistemas perturbados con contaminación, el estudio de las potencialidades de especies nativas es fundamental.

Para tal fin se colectaron 13 ejemplares semejantes en altura (25-30cm de alto) en la localidad de Calabozo, Estado Guárico y se trasladaron al umbráculo de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela, Distrito Capital; durante el traslado se observó un decaimiento en el estado físico de las plantas, por lo tanto, después de su establecimiento en el umbráculo, se espero un período de 15 días para que los individuos se adaptaran a las nuevas condiciones climáticas. Al culminar dicho período no se observaron mejoras en las plantas y se procedió a colocarlas al aire libre con la intención de que recibieran directamente los rayos del sol, sin lograr cambios.

Posteriormente, los ejemplares de *T. spicatus* fueron fertilizados utilizando como fuente de nutrimentos N:P:K 15:15:15 y sulfato de amonio; adicionalmente se podaron las plantas y se esperaron 30 días.

Al no obtener respuestas por parte de las plantas se hicieron traslados de ejemplares desde Sartenejas, Edo. Miranda, en las cercanías de la Universidad Simón Bolívar; luego de aplicar las mismas técnicas mencionadas anteriormente, se obtuvieron los mismos resultados, las plantas no resistieron el cambio de condiciones.

Por tales motivos no fue posible determinar el efecto fitorremediador de *T. spicatus*, su sensibilidad ante los cambios de condiciones ambientales dificulta realizar investigaciones *ex situ*. Es lamentable que el manejo de esta especie limite las posibilidades de estudio sobre su empleo no solamente para remediar suelos de sabana contaminados sino también para restaurarlos, debido a que el escenario de estos ecosistemas indica que serán ambientes fuertemente afectados en el futuro por estar sometidos a actividades petroleras constantemente.

CONSIDERACIONES FINALES

En Venezuela, las reservas de crudo pesado y extrapesado en conjunto con la actividad petrolera intensiva, representan una amenaza ambiental que afecta ecosistemas acuáticos y terrestres, lo que ha incentivado, desde finales del siglo pasado, investigaciones referentes a su remediación como por ejemplo los estudios realizados sobre fitorremediación, en el caso de derrames ocasionados en suelos, los cuales siguen siendo escasos sobre todo en lo que respecta a petróleo extrapesado.

Por esta razón, el presente estudio fue realizado con un suelo contaminado con hidrocarburo de petróleo extrapesado, empleando para su remediación una planta sumamente productiva, de requerimientos agronómicos conocidos y colonizadora de ambientes perturbados, como es *Panicum maximum*.

Debido a que las sabanas venezolanas están sometidas a contaminación petrolera por la ubicación de las reservas de crudos pesados y extrapesados, se empleó un suelo propio de las sabanas, proveniente del estado Guárico. El riego continuo, la adición de fertilizantes y el acondicionamiento mediante cáscara de arroz, proporcionaron al suelo condiciones favorables para el crecimiento y desarrollo de *Panicum maximum* y los microorganismos presentes.

El contenido de humedad es el principal determinante de la productividad de los ecosistemas terrestres y depende de la cantidad de agua y del tamaño de los poros existentes en el suelo, ya que la atracción entre el agua y la superficie de los poros restringe su disponibilidad para las plantas; por tal motivo, se utilizó un suelo franco arenoso, que con su bajo contenido de arcillas permite que el agua presente en el suelo este biodisponible. Dado que el hidrocarburo de petróleo añadido altera la estructura del suelo, se determinó la capacidad máxima de retención de agua del suelo contaminado para luego mantener una condición de 50% de humedad mediante el riego, así como también se añadió cáscara de arroz

como acondicionador de la estructura del suelo, para permitir el intercambio de oxígeno con la atmósfera.

La fertilización artificial fue necesaria para garantizar el desarrollo de *Panicum maximum* y de los microorganismos, debido al bajo contenido de N y P presentes en el suelo.

Al evaluar el contenido de aceites y grasas en el suelo, se obtuvo que en el tratamiento con plantas la disminución (3,38%) fue significativamente mayor que en el control (3,11%), sin embargo, entre un ensayo y otro las diferencias no fueron tan grandes como para sugerir la inversión en remediación con plantas, pudiendo obtener resultados cercanos con la adición de fertilizantes, materia orgánica en forma de cáscara de arroz y manteniendo condiciones óptimas de humedad.

Las mejoras realizadas al suelo junto con la adición del hidrocarburo de petróleo y la presencia de plantas incrementaron la actividad microorganismos presentes en el tratamiento con plantas desde el inicio hasta los 30 días de ensayo expresado en los análisis de respiración basal y actividad de la enzima deshidrogenasa; por su parte la estimación del carbono de la biomasa microbiana indicó que dicha actividad aumentó desde el inicio hasta los 60 días. Luego del período de incremento, todos los indicadores mostraron que la actividad decae junto con la disminución del contenido de aceites y grasas, que fue mayor para el tratamiento con *Panicum maximum*.

De igual manera el análisis de actividad de la enzima deshidrogenasa y el carbono de la biomasa microbiana reflejan que en el ensayo control aumentó la actividad de los microorganismos entre el inicio y los 30 días de experimento, disminuyendo posteriormente; por su parte, la respiración basal disminuyó a lo largo del ensayo indicando que: a) posiblemente la incorporación del contaminante al metabolismo fue más lenta respecto al tratamiento con *P. maximum* o b) la adición del crudo limitó el desarrollo de los microorganismos.

Estadísticamente no existe correlación entre respiración basal, actividad deshidrogenasa ni carbono microbiano (Cuadros 7 y 8) para ninguno de los tratamientos, por lo tanto, es ideal realizar mayor número de estimaciones relacionadas con éste parámetro en estudios posteriores para obtener información más precisa. Pueden incorporarse indicadores de contaminación como las actividades del mayor número de enzimas posibles, conteo de microorganismos, caracterización de la comunidad microbiana, entre otras técnicas microbiológicas pertinentes.

Cuadro 8. Correlación entre parámetros microbiológicos estimados para el suelo con *Panicum maximum*.

Variable	Respiración basal	Actividad Deshidrogenasa	C de la biomasa microbiana
Respiración basal	1		
Actividad Deshidrogenasa	0,67	1	
C de la biomasa microbiana	-0,63	0,07	1

Cuadro 9. Correlación entre parámetros microbiológicos estimados para el suelo control.

Variable	Respiración basal	Actividad Deshidrogenasa	C de la biomasa microbiana
Respiración basal	1		
Actividad Deshidrogenasa	0,44	1	
C de la biomasa microbiana	-0,3	0,33	1

Por otro lado, la presencia del crudo en el suelo no afectó significativamente el crecimiento de las plantas, expresado por la biomasa total, aérea y radical debido posiblemente a la utilización de plantas ya establecidas o al bajo contenido de compuestos tóxicos presentes en el hidrocarburo.

En síntesis, la planta empleada en este estudio para descontaminar el suelo tiene la capacidad de disminuir la concentración de hidrocarburos de petróleo extrapesado, sin embargo, el proceso es lento y el tratamiento control mostró resultados muy cercanos a los obtenidos con *Panicum maximum*. Por tal motivo, es recomendable prolongar el período de experimentos y verificar si la especie, en un momento dado, es capaz de disminuir los aceites y grasas del suelo en proporciones mayores a las encontradas en este estudio respecto al control. Si la respuesta es positiva se sugiere que antes de emplear la fitorremediación, se apliquen técnicas como manipulación física que disminuyan la concentración de dicho contaminante a porcentajes menores de 5%, o también, paralelamente al uso de *Panicum maximum*, inocular el suelo con poblaciones de bacterias y hongos autóctonas, con capacidades biorremediadoras y así acelerar el proceso.

Es importante tomar en cuenta que *Panicum maximum* es considerada como una planta invasora de colonización agresiva y de alta productividad, es por esto que su empleo debe ser cuidadoso para prevenir el desplazamiento de especies nativas. Por otro lado, la especie *Trachypogon spicatus*, nativa de las sabanas venezolanas, mostró gran sensibilidad en cuanto a su manejo, por lo tanto, si se quieren fitorremediar este tipo de ecosistemas es necesario el uso monitoreado de otras plantas, limitando la expansión de las mismas para evitar el desplazamiento de *T. spicatus* mas allá del área degradada y luego poder restaurar la zona remediada con esta especie.

CONCLUSIONES

De acuerdo a los cambios en el contenido de aceites y grasas del suelo, las plantas pertenecientes a la especie *Panicum maximum* tienen capacidad para degradar hidrocarburos de petróleo extrapesado en suelos con un nivel de contaminación de 5%. El porcentaje de disminución a los 120 días fue de 16,92%.

Las fracciones de saturados y aromáticos no mostraron al término del ensayo diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, el contenido de compuestos aromáticos mostró diferencias significativas entre el inicio y el final del ensayo para ambos tratamientos. Sus porcentajes de disminución fueron, para saturados 43,6% y 33,17% en el suelo con *P. maximum* y el control, respectivamente, y en el caso de aromáticos el suelo con plantas obtuvo un valor de 67,42% mientras que el control 65,34%. En cuanto a las resinas y asfaltenos, su disminución tanto para *Panicum maximum* como para el control fue muy baja debido a la condición recalcitrante de estas sustancias.

La respiración basal aumentó en los primeros 15 días del ensayo con plantas, posiblemente por la adición de hidrocarburos que representan una fuente de carbono para los microorganismos. Luego decae junto con la disminución del contenido de aceites y grasas. Por su parte, los valores del tratamiento control tendieron a disminuir a lo largo del tiempo de estudio, indicando que la incorporación de la fuente de carbono a la actividad metabólica de la microbiota ocurre más lentamente en comparación con el tratamiento con plantas. Estos resultados indican que la presencia de plantas parece acelerar la capacidad de los mismos para utilizar y así degradar los hidrocarburos de petróleo extrapesado.

La actividad de la enzima deshidrogenasa, al igual que la respiración basal, aumenta con la adición de hidrocarburos de petróleo y posteriormente disminuye debido a la reducción del contenido de aceites y grasas obtenida en el suelo. En el tratamiento con plantas la actividad tendió a ser mayor que en el control,

demostrando que posiblemente *Panicum maximum* genera condiciones más adecuadas para que los microorganismos aumenten su actividad y degraden más fácilmente el hidrocarburo.

El carbono de la biomasa microbiana incrementa desde el inicio hasta los 60 días del ensayo con *P. maximum* debido a la presencia del contaminante y luego disminuye por la disminución del mismo, expresada en el contenido de aceites y grasas. El hecho de encontrar un repunte a los 60 días y no en los primeros períodos de estudio como ocurrió en los análisis anteriores, indica que posiblemente los efectos tóxicos del contaminante retardaron el efecto esperado. También la variabilidad en los datos que se presenta al emplear este método pudo influir en los resultados obtenidos. El coeficiente metabólico (qCO_2) mostró una alta tasa de emisión de CO_2 por unidad de C microbiano al inicio del experimento, la cual decae en el tiempo para el tratamiento con plantas, mientras que en el control hubo un repunte a los 60 días. En las etapas finales del estudio (60 y 120 días) el qCO_2 en el ensayo con plantas fue menor que en el control, lo que posiblemente sugiere una condición ambiental menos estresante.

Debido a la falta de diferencias significativas encontradas entre ambos tratamientos para un mismo tiempo, los indicadores empleados no fueron los mejores para describir el comportamiento de la actividad de los microorganismos. Adicionalmente, los indicadores no mostraron correlaciones significativas entre sí.

Por último, la contaminación con crudo extrapesado al 5% no produjo diferencias significativas en la biomasa final de plantas respecto a aquellas que crecieron en suelos no contaminados posiblemente por el uso de plantas ya establecidas o por la baja concentración de sustancias tóxicas que presenta este tipo de crudos respecto a los demás.

RECOMENDACIONES

Debido al bajo porcentaje de disminución del contenido de aceites y grasas, se sugiere, para investigaciones posteriores, prolongar el período de estudio para determinar si la planta es capaz de remediar el suelo disminuyendo aún más el contenido de aceites y grasas. Asimismo, se recomienda incorporar análisis como la estimación del mayor número de actividades enzimáticas posibles, las cuales son indicadoras de contaminación, así como también la implementación de técnicas microbiológicas, para aclarar el comportamiento de los microorganismos debido a la discrepancia obtenida entre los indicadores de la actividad microbiana empleados.

Con la finalidad de restaurar los suelos contaminados con crudo extrapesado es necesario investigar cómo reproducir *Trachypogon spicaus* a través de semillas en condiciones de suelos contaminados y no contaminados y evaluar entre otros, el porcentaje de germinación y supervivencia de plántulas.

BIBLIOGRAFÍA

- Alef, K., Nannipieri, P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press. Harcourt Brace & Company, Publishers. Londres, Inglaterra.
- Anderson, J., Ingram, J. 1992. *Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods*. Segunda Edición. C.A.B International.
- APHA. 1992. *Standard Methods for the examination of water and wastewaters*. APHA, AWWA, WEF. Washington DC.
- Atlas, R. M. and Bartha, R.: 1998, *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*, Benjamin Cummings Publ. Co., San Francisco, USA, pp. 393–399. Citado en Merkl y col. 2005a.
- Baker, J.M. 1970. The effect of oils on plants. *Environ. Pollut.* 1: 27–44.
- Brady, N. C., Weil, R. R. 2002. *The Nature and Properties of Soils*. Décima tercera Edición. Prentice Hall. New Jersey, Estados Unidos.
- Brandt, R., Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C., Broll, G. 2006. Potential of Vetiver (*Vetiveria zizanioides* (L.) Nash) for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. *International Journal of Phytoremediation*, 8:273–284.
- Cauwenberghe, L., Roote, D. S. 1998. *In situ* Bioremediation. Technology Overview Report. TO-98-01.
- Cook, B., Pengelly, B., Brown, S., Donnelly, J., Eagles, D., Franco, A., Hanson, J. y colaboradores. 2005. *Tropical forages: An interactive selection tool* [En Línea]. <http://www.tropicalforages.info/Multiproposito/key/Multiproposito/Media/Html/Panicum%20maximum%20Jacq.htm>. [Consulta: 8 octubre 2012]
- Chander, K., Brookes, P.C. (1991). Is the dehydrogenase assay invalid as a method to estimate microbial activity in copper contaminated soils?. *Soil Biology & Biochemistry*, 23: 909-915.

- Cunningham, S.D., Anderson, T.A., Schwab, A.P., Hsu, F.C. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56: 55 – 114.
- Dilly, O., Mogge, B., Kutsh, W.L., Kappen, L., y Munch, J. 1997. Microbial characteristics and emission of carbon dioxide and nitous oxide of arable and grassland soils. *Biogeochemistry* 39: 189-207.
- EPA. 1986. Test Methods for Evaluating Solid Waste. Method 3540. Soxhlet Extraction. EPA SW-846. USEPA . Washington D.C.
- Frankenberger, W.T., Dick, W.A., 1983. Relationship between enzyme activities and microbial growth and activity indices in soil. *Soil Science Society of America Journal* 47, 945–951.
- Frick, C.M., Farrel, R.E., Germida, J.J. 1999. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance Canada. Calgary, Canadá.
- García, C., Hernández, T. 1997. Biological and biochemical indicators in derelict soils subject to erosion. *Soil Biology & Biochemistry*, 29: 171-177.
- Hernández-Valencia, I., López-Hernández, D. 2002. Pérdida de nutrimentos por la quema de la vegetación de una sabana de *Trachypogon*. *Rev. Biol. Trop.* 50 (3/4): 1013-1019
- Hernández-Valencia, I., Mager, D. 2003. Uso de *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*. 15(3): 140 – 155.
- Hutchinson, S. L., Banks, M. K., Schwab, A. P. 2001. Bioremediation an Biodegradation. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
- Infante, C., Morales, F., Ehrmann, E. U., Hernández-Valencia, I., Leon, N. 2010. Hydrocarbons bioremediation and phytoremediation in tropicals soils: Venezuelan study case. *Trends in bioremediation and phytoremediation*. 2010: 429-451.

- Infante, C., Ortega, C., Morales, F., Ehrmann, U., Hernández-Valencia, I., Pérez, R. 2010. Efecto del potasio en la biorremediación de un suelo contaminado con crudo liviano. *Bioagro* 22(2): 145-152.
- Mager, D. 2002. Evaluación de la capacidad de gramíneas tropicales para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Margesin, R., Schinner, F., 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47: 462-468.
- Margesin, R., Zimmerbauer, A., Schinner, F. 1999. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere.* 40: 339-346.
- Margesin, R., Schinner, F. 2001. Bioremediation (Natural Attenuation and Biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine Glacier Skiing Area. *Appl. Environ. Microb.* 67 (7): 3127-3133.
- McMillen, S., Smart, R., Bernier, R. 2004. Seventh SPE International Conference on Health, Safety, and Environment in Oil and Gas Exploration and Production. Alberta, Canada, 29. Citado en Infante y col. 2010.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C.. 2004. Phytoremediation in the tropics- The effect of crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal.* 8(3-4): 177 – 184.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Infante, C. 2005a. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* 165: 195 – 209.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., Arias, M. 2005b. Phytoremediation in the tropics – influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environmental pollution.* 138: 86 – 91.
- Mirás Avalos, J. M., Sande Fouz, P., Vidal Vásquez, E. 2007. Actividad deshidrogenasa en dos posiciones topográficas de un suelo de cultivo. *Cadernos Lab. Xeolóxico de Laxe. Coruña.* 32: 151-163.
- Mommer, B. 2004. La valorización del crudo extrapesado de la Faja Petrolífera del Orinoco. *Rev. Venez. De Econ. Y Ciencias Sociales.* 10 (2): 33-50.

- Njoku, K.L., Akinola, M.O., Oboh, B.O. 2009. Phytoremediation of crude oil contaminated soil: The effect of growth of *Glycine max* on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. *Nature and Science*. 7 (10): 79-87.
- Pilon-Smits, E.A.H., Freeman, J.L. 2006. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. *Front. Ecol. Environ.* 4(4): 203 – 210.
- Ramia, M. 2007. Tipos de sabanas de los Llanos de Venezuela. *Boletín de la Sociedad Venezolana de Ciencias Naturales*. 42: 61-134.
- Romero, Lenny. 2010. Cambios en el carbono del suelo luego de la aforestación con *Acacia Mangium*, en una sabana venezolana. Tesis de Licenciatura. Universidad Central de Venezuela, Caracas.
- Stapleton, R. D., Savage, D. C., Saylor, G. S., Stacey, G. 1998. Biodegradation of aromatic hydrocarbons in a extremely acidic environment. *Applied Environmental Microbiology*. 64 (11): 4180-4184.
- Schinner, F., Ohlinger, R., Kandeler, E., Margesin, R. (Eds.). 1996. *Methods in Soil Biology*. Springer, Heidelberg. Citado en Margesin y col., 1999.
- Schwendinger, R. 1968. Reclamation of soil contaminated with oil. *J. Inst. Petrol.* 54: 182–192.
- Siciliano, S. D., Germida, J.J. 1998. Mechanisms of phytoremediation: Biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Rev.* 6: 6–79. Citado en Merkl, 2004.
- Vance, E. D., Brookes, P. C., Jenkinson, D. S. 1987. An Extraction method of measuring soil microbial biomass C. *Soil Biol. Biochem.* 19 (6): 703-707.
- Vidali, M. 2001. Bioremediation. An overview. *Pure Appl. Chem.* 73 (7): 1163–1172.
- Visser, S., Parkinson, D., 1992. Soil biological criteria as indicators of soil quality: soil microorganisms. *American Journal of Alternative Agriculture*. 7: 33–37.

ANEXO



Anexo 1: Envases con suelo contaminado sin plantas (izquierda) y con plantas (derecha).