



Universidad Central de Venezuela

Facultad de Ciencias

Escuela de Biología

Departamento de Ecología

Efecto de Emulsiones Asfálticas sobre la Estructura Comunitaria Microbiana en microagregados de un suelo de sabana

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por el bachiller UBENCIO ANTONIO REYES FERNÁNDEZ como requisito para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor(es): Dra. Nora Malaver

Dr. Alonso D. Ojeda

Caracas, Venezuela

Septiembre- 2.009

Los miembros del jurado designados por el Consejo de Escuela de Biología, para examinar el Trabajo Especial de Grado del Br. Ubencio Antonio Reyes Fernández, titulado “Efecto de Emulsiones Asfálticas sobre la Estructura Comunitaria Microbiana en Microagregados de un Suelo de Sabana” para optar al título de Licenciado en Biología, consideramos que dicho trabajo cumple con los reglamentos respectivos y por cuanto lo declaramos aprobado.

Caracas, a los 04 días del mes de Septiembre de 2009.

-----  
**Dra. Nora Malaver**

**Tutor(a)**

-----  
**Dr. Alonso D. Ojeda**

**Tutor**

-----  
**Dr. Ismael Hernández**

**Jurado**

-----  
**Lic. Aníbal Hernández**

**Jurado**

## **DEDICATORIA**

A LOS SERES MÁS ESPECIALES DE MI VIDA: MIS PADRES, **LIVIA Y UBENCIO**, POR SU APOYO Y AMOR INCONDICIONAL.

¡¡¡GRACIAS POR TODO LO QUE ME HAN ENSEÑADO!!!

A MIS HERMANOS, **YOLIMAR Y MARCOS**, COMPLEMENTO VIVO DE MI TRANSCURRIR DIARIO...

...Y A TI **UBELIS** (\*26-08-1980/†05-07-2008), DONDE QUIERAS QUE ESTÉS, TE EXTRAÑO MI HERMANA!!!

## AGRADECIMIENTOS

A la de Universidad Central Venezuela, que me formó como profesional, pero ante todo, me formó como ser humano.

A la Facultad de Ciencias, por la cual he derramado unas cuantas gotas de sudor, vaya hacia ti mi mayor agradecimiento, pues reí, salte y hasta lloré en tus pasillos y aulas.

A mis tutores, Nora y Alonso, más que profesores, mis guías y consejeros durante todo este proyecto, su proyecto. Espero seguir aprendiendo de Uds. Gracias por su confianza y apoyo.

A mis jurados de tesis, el profesor Ismael Hernández y al Licenciado Aníbal Hernández, por sus comentarios en la valoración de este trabajo.

A la Dra. Marianela Arias, de INTEVEP, por sus valiosos y oportunos comentarios, además de la prestación de materiales para la ejecución de este trabajo.

A las profesoras Marcia Toro y Guillermina Alonso, por apoyarme y confiar en la culminación satisfactoria de este trabajo.

A todas las personas del Laboratorio de Estudios Ambientales del IZT, especialmente a Maribel Ramos, Irene Matos, las compañeras Fernanda, Livia, Érica y al colega Felipe Madrid, gracias por su tiempo y apoyo.

A todas las personas del Laboratorio de Microbiología Ambiental, especialmente a la Licenciada María del Pino, por sus enseñanzas, sus comentarios, regaños y su forma muy particular de ser; a mis amigas Alejandra Zamora, Diamaris y a ti Yurbis, que con paciencia y mucha energía positiva, me enseñaron gran parte de los métodos aplicados en este trabajo.

A Alicia Barreto, por su amistad incondicional y su apoyo tanto en lo anímico como en lo administrativo.

A la Licenciada Lucrecia Requena, por estar junto a mi en esos momentos de felicidad y tristeza, gracias por tu tiempo.

A mis padres, Livia y Ubencio, por enseñarme que con trabajo y tesón se logran todas las metas que uno se proponga en esta vida.

A mis hermanos, que junto a ellos, crecí y compartí los sacrificios de nuestros viejos por hacernos gente de bien.

Al futbol, disciplina que me enseñó la dedicación, el trabajo en grupo y sobre todo, a conocer muchos lugares y personas de los cuales aprendí que un mundo mejor es posible.

A todos mis amigos de la Gran Familia Dinamo, quienes han estado en los momentos significativos de mi vida universitaria y siempre han sido consecuentes con la facultad y la Universidad. Gracias panas!!

A Janet por su tiempo, compañía, apoyo y cariño en aquellos momentos iniciales cuando comencé mi vida universitaria, de quien aprendí que las personas se valoran más por sus sentimientos que por sus riquezas materiales.

A todo el resto de amigos y personas que no nombré pero que en algún momento, durante la realización de este trabajo, recibí sus palabras de apoyo, palabras de admiración, y palabras de aliento, que me hicieron sumar esfuerzos y lograrlo.

## INDICE GENERAL

### CONTENIDO

|   | Pág. |
|---|------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....  | 1    |
| 1.1 Definición de Suelo.....  | 1    |
| 1.2 Definición e Importancia de los Ecosistemas de Sabana.....                          | 2    |
| 1.3 El Suelo y su Estructura.....   | 3    |
| 1.4 Procesos Biogeoquímicos y Análisis funcional de la Comunidad<br>Microbiológica..... | 5    |
| 1.5 Actividad Enzimática y su papel como indicador de<br>la Calidad del Suelo.....      | 6    |
| 1.6 Las Emulsiones Asfálticas como agentes mejoradores<br>de suelos ácidos.....         | 7    |
| <b>2. ANTECEDENTES</b> .....  | 11   |
| <b>3. HIPÓTESIS</b> .....   | 18   |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....   | 19   |
| 4.1 Objetivos Generales.....  | 19   |
| 4.2 Objetivos Específicos.....  | 19   |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | 20   |
| 5.1 Área de estudio.....  | 20   |
| 5.1.1 Ubicación.....  | 20   |
| 5.1.2 Clima.....  | 21   |
| 5.1.3 Vegetación.....   | 22   |
| 5.1.4 Geología y Suelos.....  | 22   |
| 5.2 Metodología.....  | 23   |

|   |           |
|---|-----------|
| 5.2.1 Etapa de Campo.....   | 23        |
| 5.2.2 Etapa de Laboratorio.....   | 27        |
| 5.3 Caracterización Físico-Química del suelo.....   | 27        |
| 5.4 Caracterización Microbiológica.....   | 35        |
| 5.5 Caracterización Bioquímica.....   | 41        |
| 5.6 Diseño Experimental Fase II.....  | 43        |
| 5.7 Tratamiento Estadístico.....  | 46        |
| 5.8 Montaje de microcosmos y aplicación de emulsión asfáltica.....  | 47        |
| <b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>   | <b>51</b> |
| 6.1 Caracterización Físico-química del suelo.....   | 51        |
| 6.2 Caracterización Microbiológica del suelo.....   | 53        |
| 6.3 Fase II. Determinaciones microbiológicas y físico-químicas del<br>Suelo tratado con Emulsión Asfáltica..... | 76        |
| 6.3.1 Actividad Deshidrogenasa.....   | 77        |
| 6.3.2 Producción de CO <sub>2</sub> .....   | 79        |
| 6.4 Montaje de los microcosmos.....   | 83        |
| 6.5 Análisis Físico-químico del suelo tratado con<br>Emulsión asfáltica aniónica.....                           | 84        |
| 6.5.1 Efecto sobre la agregación del suelo.....   | 84        |
| 6.5.2 Efecto sobre Carbono Orgánico.....  | 88        |
| 6.5.3 Efecto sobre el pH.....   | 91        |
| 6.5.4 Efecto sobre la concentración de fosforo en solución.....   | 92        |
| 6.5.4 Efecto sobre el Nitrógeno Total.....  | 94        |
| 6.5.6 Efecto sobre la Actividad Deshidrogenasa.....   | 96        |

|   |            |
|---|------------|
| 6.6 Análisis Microbiológicos del suelo tratado con      |            |
| Emulsión asfáltica aniónica.....                        | 98         |
| 6.6.1 Efecto sobre la densidad bacteriana.....          | 98         |
| 6.6.2 Efecto sobre la densidad de hongos.....           | 100        |
| 6.6.3 Caracterización macromorfológica de la comunidad  |            |
| Microbiana asociada a microagregados.....               | 103        |
| 6.6.4 Caracterización micro-morfológica de la comunidad |            |
| Microbiana asociada a microagregados.....               | 105        |
| 6.6.5 Caracterización funcional de la comunidad         |            |
| Microbiana asociada a microagregados.....               | 109        |
| 6.6.6 Análisis funcional de las comunidades microbianas |            |
| asociadas a microagregados.....                         | 112        |
| <b>7. CONCLUSIONES.....</b>                             | <b>121</b> |
| <b>8. RECOMENDACIONES.....</b>                          | <b>122</b> |
| <b>9. REFERENCIAS CITADAS.....</b>                      | <b>123</b> |
| <b>10. ANEXOS.....</b>                                  | <b>124</b> |



## INDICE DE FIGURAS

| CONTENIDO   | Pág. |
|---|------|
| <b>1. INTRODUCCIÓN</b>  |      |
| <b>Figura 1.</b> Un agregado típico de suelo.....   | 4    |
| <b>Figura 2.</b> Esquema de tratamiento del petróleo.....   | 8    |
| <b>2. ANTECEDENTES</b>  |      |
| <b>Figura 3.</b> Representación esquemática del modelo de retención y<br>Separación de un elemento.....     | 15   |
| <b>Figura 4.</b> Efecto de la emulsión bituminosa sobre la evaporación en<br>Suelos arenosos y limosos..... | 16   |
| <b>3. MATERIALES Y MÉTODOS</b>  |      |
| <b>Figura 5.</b> Mapa del Edo. Anzoátegui señalando la ubicación relativa<br>del área de muestreo.....      | 20   |
| <b>Figura 6.</b> Aspecto visual del área de muestreo.....   | 24   |
| <b>Figura 7.</b> Disposición de las estacas y las cuerdas en el<br>área de muestreo.....                    | 24   |
| <b>Figura 8.</b> Disposición espacial de los puntos de muestreo en campo....                                | 25   |
| <b>Figura 9.</b> Bolsas plásticas conteniendo una de las muestras compuestas<br>de suelo.....               | 25   |
| <b>Figura 10.</b> Esquema metodológico general de laboratorio.....  | 26   |
| <b>Figura 11.</b> Balones con medios de cultivos para la activación<br>de la comunidad microbiana.....      | 36   |
| <b>Figura 12.</b> Diagrama ilustrativo del procedimiento de agotamiento                                     |      |

|  |    |
|--|----|
| en placas.....   | 39 |
| <b>Figura 13.</b> Reacción de la transformación del TTC a TPF.....   | 43 |
| <b>Figura 14.</b> (a) Bandeja con suelo; (b) Techo cubierto de plástico<br>cubriendo el área de los microcosmos.....   | 45 |
| <b>Figura 15.</b> Disposición espacial de los microcosmos en el vivero,<br>cubiertos por una malla porosa de polietileno, lo que permitió<br>la aireación y protección contra restos vegetales y desechos..... | 46 |
| <b>Figura 16.</b> Frascos tipo Warburg.....  | 49 |
| <b>Figura 17.</b> . Respirometría. Soluciones antes de la titulación<br>(color púrpura) y después de la titulación (sin color).....  | 50 |
| <b>Figura 18.</b> Abundancia de formas celulares bacterianas obtenidas<br>con la técnica de tinción diferencial “Tinción Gram”.....  | 60 |
| <b>Figura 19.</b> Bacterias tipo <i>bastones</i> Gram (-). Se puede observar<br>el color rojo predominante en las células (100x).....  | 61 |
| <b>Figura 20.</b> Bacterias tipo <i>bastones</i> Gram (+). Se puede<br>observar el color púrpura retenido en el exterior<br>de las células (100x).....   | 62 |
| <b>Figura 21.</b> Bacterias tipo <i>cocos</i> Gram (-), de color rojo (100x).....  | 63 |
| <b>Figura 22.</b> Bacterias tipo <i>cocos</i> Gram (+), de color púrpura<br>y forma esféricas (100x).....  | 63 |
| <b>Figura 23.</b> Bacterias tipo <i>bastones</i> esporulados.....  | 64 |
| <b>Figura 24.</b> Montajes semi-permanentes de muestras de hongos.....   | 65 |
| <b>Figura 25.</b> Géneros comunes de hongos del suelo.....   | 65 |
| <b>Figura 26.</b> Estructuras reproductivas (esporangióforos y esporangio)   |    |

de *Mucor sp* (Zygomycetes) (100x).....67

**Figura 27.** Estructuras reproductivas de

*Aspergillus sp* (Hyphomycetes).....68

**Figura 28.** Estructura reproductiva (Esporangióforo y esporangio)

en *Rhizopus sp* .....68

**Figura 29.** Estructura reproductiva (Conidióforo)

en *Trichoderma sp*.....69

## INDICE DE TABLAS

| CONTENIDO  | Pág. |
|--|------|
| <b>2. ANTECEDENTES</b>   |      |
| <b>Tabla 1.</b> Número de plantas por parcela e índices de rendimiento de maní en suelos de Guanipa.....   | 13   |
| <b>Tabla 2.</b> Fechas de crecimiento, precipitación total y datos sobre la producción de Sorgo en 1979, 1980 y 1981 en suelos sin tratar y suelos protegidos con Emulsiones asfálticas..... | 14   |
| <b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b>   |      |
| <b>Tabla 1.</b> Temperatura media mensual.....   | 21   |
| <b>Tabla 2.</b> Precipitación media mensual.....   | 22   |
| <b>Tabla 3.</b> Parámetros físico-químicos evaluados antes y después de la aplicación de emulsiones asfálticas.....  | 27   |
| <b>Tabla 4.</b> Pruebas bioquímicas aplicadas.....   | 41   |
| <b>Tabla 5.</b> Número total de unidades de muestreo en el experimento.....  | 43   |
| <b>Tabla 6.</b> Tratamientos e intervalos de muestreo del suelo tratado con emulsiones...44  |      |
| <b>Tabla 7.</b> Especificaciones técnicas de la emulsión aniónica.....   | 47   |
| <b>6. RESULTADO Y DISCUSIÓN</b>  |      |
| <b>Tabla 8.</b> Características Físico-Químicas del suelo de sabana utilizado  |      |

|  |    |
|--|----|
| en este estudio.....   | 51 |
| <b>Tabla 9.</b> Principales características de los perfiles del suelo observados<br>en la calicata en el área de estudio.....  | 52 |
| <b>Tabla 10.</b> Número inicial de Bacterias y Hongos, aeróbicos y<br>anaeróbicos facultativos, en intervalos de tamaño contrastantes de partículas<br>del suelo.....                | 53 |
| <b>Tabla 11.</b> Algunas características generales aplicadas en microbiología<br>para describir las colonias microbianas sobre medios sólidos.....                                   | 56 |
| <b>Tabla 12.</b> Caracterización macromorfológica de las bacterias aisladas<br>a través de dos métodos diferentes de aislamiento en partículas de<br>tamaño <250 µm y >250 µm.....   | 57 |
| <b>Tabla 13.</b> Caracterización macromorfológica de los hongos<br>aislados a través de dos métodos diferentes de aislamiento en partículas<br>de tamaño contrastante del suelo..... | 58 |
| <b>Tabla 14.</b> Porcentaje de géneros taxonómicos de hongos.....  | 66 |
| <b>Tabla 15.</b> Índice de Diversidad Funcional (IDF) de la comunidad<br>microbiana en suelo sin tratar con emulsión asfáltica.....  | 74 |

## RESUMEN

En las últimas décadas los volúmenes de uso del asfalto en forma de emulsiones asfálticas han sido grandes debido a su bajo costo, a las propiedades de hidrofobicidad y a la relativa resistencia a la intemperie (Talavera *et al*, 2001). Los efectos sobre el ambiente, en particular, los efectos que pueda tener sobre el estado de agregación de las partículas y la comunidad microbiana en suelos de sabana han sido poco estudiados en el ámbito nacional (Casanova, 1991). Sin embargo, investigaciones llevadas a cabo a nivel mundial, han demostrado que las emulsiones asfálticas o bituminosas, como se conocen también, incrementan la temperatura del suelo, preservan la humedad del suelo y mejoran la estructura del suelo (Jiuzhi *et al*, 1985). Mejorar la estructura del suelo significa incrementar la retención de agua, toma de nutrientes, drenaje, aireación y el crecimiento radical (Roldán *et al*, 2006). En Venezuela, cerca de un tercio del territorio nacional, está asociado a los ecosistemas de sabana. Estas se describen como ecosistemas herbáceos tropicales de un estrato más o menos continuo graminoide con o sin formaciones leñosas dispersas con cierto grado de estacionalidad dependiendo de la oferta de agua en suelo y pueden ser inundables o no (Sarmiento, 1990). La alta meteorización, la abundancia de lluvias (1200 a 2000 mm) y bajos pH, han determinado que estos ecosistemas sean de muy baja fertilidad natural (López-Hernández y Ojeda, 1996), ofreciendo pastizales que son aprovechados para la ganadería y agricultura extensiva, sin embargo, en los últimos 35 años, este patrón de uso de la tierra ha cambiado hacia la producción de cultivos a gran escala, con el fin de satisfacer las necesidades nutricionales derivadas del crecimiento demográfico experimentado con el avance de la explotación de recursos naturales, como la minería y la industria petrolera (López-Hernández y Ojeda, 1996).

En el presente trabajo, se evaluó el efecto de las emulsiones asfálticas sobre la estructura comunitaria microbiana asociada a los microagregados de un suelo de sabana. Los resultados obtenidos nos indican que la emulsión asfáltica tuvo un efecto favorable en la estabilización de microagregados, mientras que sobre la estructura comunitaria microbiana en los microagregados, no alteró el patrón funcional de bacterias y hongos. El Índice de Diversidad Funcional (IDF) no cambió significativamente por la aplicación de emulsiones al suelo. Las variaciones del carbono orgánico, el nitrógeno total y el fósforo en solución, mostraron cambios significativos respecto a los controles.

## 1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema complejo, integrado por una variedad de procesos físicos, químicos y biológicos, que están influenciados por factores como la profundidad, el pH y la composición de los horizontes o capas que lo constituyen (Alef y Nannipieri, 1995). Debido a esto, es frecuente observar a lo largo de toda la superficie terrestre, diferencias poco o muy apreciables entre un suelo y otro, así como en áreas relativamente pequeñas (Alexander, 1977).

### 1.1 Definición de Suelo

El Departamento de Agricultura de los Estados Unidos define suelo como un cuerpo natural, constituido de sólidos (minerales y materia orgánica), líquidos y gases, que se encuentra sobre la superficie de la tierra, ocupando un espacio, y está caracterizado por uno o ambos de los siguientes aspectos: horizontes o capas, que son distinguibles del material parental inicial, como resultado de adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia; y la capacidad de soportar plantas con raíces en un ambiente natural (SSS, 2006).

Se reconocen cinco grandes componentes del suelo: material mineral, agua, aire, materia orgánica y organismos vivos. La cantidad de estos componentes no es la misma en todos los suelos. De la porción inanimada, la cantidad de materia mineral y orgánica es relativamente fija en sitios locales, sin embargo, el aire y el agua fluctúan, teniendo gran influencia sobre las poblaciones de organismos y plantas que se desarrollan en el suelo. Es aquí donde la interacción con los factores climáticos, como la temperatura y la precipitación, marcan el patrón de meteorización del material parental, generando efectos sobre la disponibilidad de nutrientes, retención de agua y aireación (Alexander, 1977). Debido a esto, existen suelos asociados a una determinada zona climática. Por ejemplo, los suelos templados tienen características (humedad del suelo, temperatura y mineralogía) frecuentemente diferentes a los suelos tropicales, generando cambios

en las propiedades mencionadas anteriormente en cada tipo de suelo (Six *et al*, 2002). En este sentido, en las zonas tropicales, podemos encontrar desde bosques húmedos hasta vegetación de praderas o herbazales, comúnmente llamadas sabanas o ecosistemas de sabanas. Las sabanas representan el 43 % de la superficie terrestre, constituyendo el primer bioma intertropical ocupando vastas regiones en América del Sur, África, Sureste Asiático y Australia (López-Hernández *et al*, 2005).

## 1.2 Definición e Importancia de los Ecosistemas de Sabana

Las sabanas son caracterizadas por asociaciones de vegetación herbácea con presencia, o no, de árboles esparcidos y con patrones estacionales de disponibilidad de agua determinados por una marcada estación climática seca (Sarmiento, 1990; López-Hernández *et al*, 2005). En Sudamérica, los ecosistemas de sabanas ocupan una superficie de más de  $269 \times 10^6$  ha extendidas entre Brasil, Colombia, Venezuela, Guyana y Bolivia, siendo a escala mundial, una de las mayores extensiones de tierra con predominio de estos ecosistemas, lo cuál le da gran potencialidad para la producción agrícola y silvícola (Rippstein *et al*, 2001 citado por López-Hernández, 2005).

Sin embargo, es conocido que los suelos de sabana tienen baja fertilidad natural, por la pérdida de arcillas, materia orgánica y bases intercambiables, generando suelos ácidos; baja o muy baja productividad, drenaje interno rápido debido a una baja estructuración y en su mayoría, pertenecen a los ordenes ultisoles y oxisoles, que son suelos muy evolucionados, sometidos a profundos cambios de meteorización (Ojeda *et al*, 2006).



### 1.3 El Suelo y su Estructura

Una de las propiedades físicas del suelo afectadas por los regímenes climáticos y por el manejo agrícola, es la estructura del suelo. Rivero (1999) define la estructura del suelo como el arreglo de los componentes sólidos, inorgánicos y orgánicos, en condiciones edafo-climáticas definidas, lo que da origen a la formación de entidades denominadas agregados, que constituyen los elementos estructurales sólidos. La estructura del suelo esta directamente relacionada con la estabilidad estructural, la erodabilidad del suelo, la infiltración, penetración de raíces, aireación, y a la aplicabilidad de técnicas de manejo agrícola (Baver *et al*, 1972),

La mejor estructura es la que permite un balance apropiado entre sus componentes (sólido, líquidos y gas), para el buen desarrollo de los cultivos, plantas y microorganismos (Rivero, 1999). Tisdall y Oades (1982) señalan que los agregados se dividen en macro y microagregados. Los microagregados se consideran menores a 250  $\mu\text{m}$  y los macroagregados mayores a 250  $\mu\text{m}$ . En suelos templados y tropicales, los procesos biológicos son los responsables iniciales de la formación de los agregados, aunque la duración de los macroagregados depende del manejo del suelo, que causan su ruptura, mientras los microagregados, son independientes del manejo del suelo, pues se forman por la interacción de minerales con productos de la actividad microbiana (Six *et al*, 2002). En la Fig. 1 se ilustra un esquema típico de agregado de suelo.

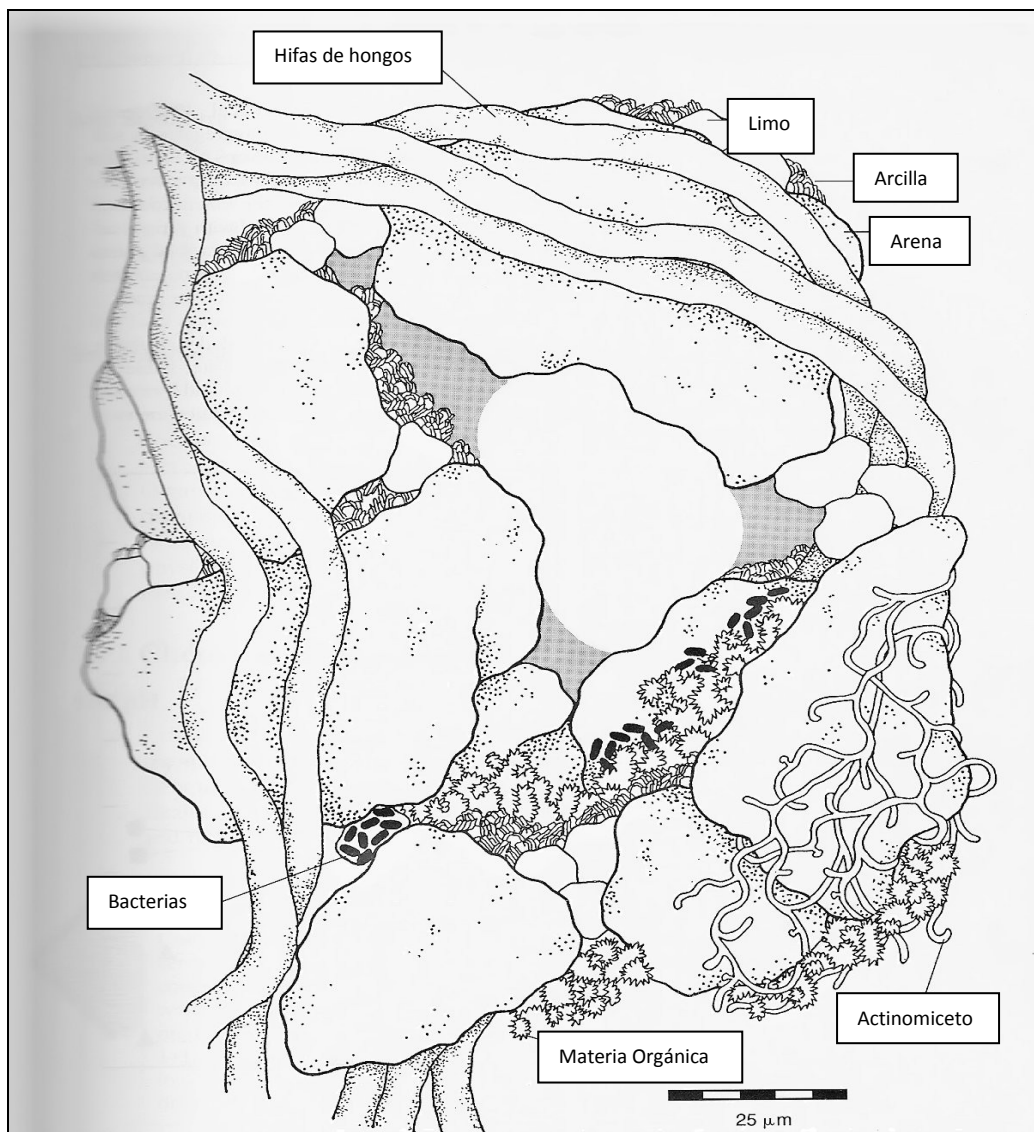


Fig. 1. Un agregado típico de suelo. Las partículas de arena, limo y arcillas, están cementadas por materia orgánica, materiales inorgánicos precipitados y por microorganismos (Sylvia, 1998).

Por lo dicho anteriormente, la estructura del suelo se relaciona con su contenido de materia orgánica (M.O). Ésta determina en gran medida, la estabilidad estructural del suelo, y a su vez, una buena estructura condiciona el mantenimiento de la Materia Orgánica del Suelo (M.O.S) (Hernández y López-Hernández, 2002), debido a la protección física en lugares inaccesibles a la microbiota dentro de los agregados, en pequeños poros. Sin embargo, en suelos arenosos es mayor la degradación microbiana de la (M.O.S) que en suelos arcillosos o limosos porque no ofrece protección física a la M.O (Hassink *et al*, 1992; Sylvia *et al*, 1998).

#### 1.4 Procesos Biogeoquímicos y Análisis funcional de la Comunidad Microbiológica

La mineralización de carbono, nitrógeno y fijación del fósforo es iniciada la mayoría de las veces por las comunidades microbianas que degradan el material vegetal y animal que sobre el suelo llega a depositarse, siendo más rápida en suelos arenosos que en suelos arcillosos. Dependiendo de la textura y el grado estructural del suelo, los nutrientes pueden encontrarse protegidos físicamente dentro de agregados, en microporos, donde solo algunas poblaciones microbianas pueden tener acceso a ellos, originando microhabitats y nichos diferentes en un mismo perfil (Hassink, 1992; Rivero, 1999).

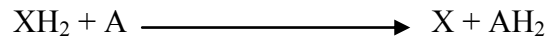
La cantidad y variedad de la cubierta vegetal, la materia orgánica animal, los exudados radicales y partes senescentes de las plantas, ejercen propiedades selectivas en las comunidades microbianas del suelo, determinando la cantidad y tipo de microorganismo, así como también su funcionalidad dentro de dicha comunidad (Atlas y Bartha, 2002).

Estos sustratos diversos utilizados por las comunidades microbianas, generan una estructura funcional de las comunidades microbianas que no resulta fácil de abordar dada su complejidad. Tomando en cuenta que el suelo es un ecosistema complejo, provee una gran cantidad de microambientes habitados por diferentes grupos funcionales de microorganismos (Alexander, 1977; Hernández *et al*, 2006).

El análisis funcional de la comunidad, permite determinar cambios en el patrón de uso de los sustratos y establecer algunos criterios con bases ecológicas para la caracterización de la comunidad tanto de bacterias como de hongos (Hernández *et al*, 2006).

## 1.5 Actividad enzimática y su rol como indicador de la calidad del suelo

La degradación de los diferentes sustratos se lleva a cabo a través de una serie de reacciones bioquímicas mediadas por enzimas. Una enzima es una proteína producida por una célula viva que funciona en la catálisis de una reacción química bajo condiciones favorables de temperatura y pH (Alexander, 1977). Una de las más importantes es la deshidrogenasa, pertenecientes a las oxidorreductasas de tipo intracelular. Esta enzima es la encargada de la oxidación biológica de los compuestos orgánicos a través de la deshidrogenación, el cual procede según la siguiente reacción general:



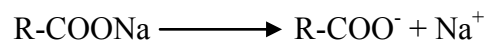
$\text{XH}_2$  es un compuesto orgánico dador de hidrógenos y A es el correspondiente aceptor de los mismos (Acosta y Paolini, 2005). Esta enzima ha sido propuesta como indicador de la actividad biológica de un suelo y del potencial degradativo del suelo (Acosta-Martínez *et al*, 2006). Sin embargo, existen suelos con poca o bajo índice estructural, es decir, tienen muy bajo porcentaje de agregados, especialmente los suelos arenosos, donde el contenido de materia orgánica es bajo y la producción de polisacáridos microbianos de efectos cementantes y acomplejantes disminuye. En este sentido, el hombre ha utilizado enmiendas o agentes mejoradores de suelo, con el propósito de adecuarlos para la explotación agrícola o prevenir procesos erosivos (Fortún y Fortún, 2005).

Los efectos de las enmiendas orgánicas sobre las propiedades físicas, químicas y microbiológicas de los suelos poco estructurados ha sido investigado ampliamente (O'Donnell *et al*, 2001; Pascual *et al*, 2002; López-Hernández *et al*, 2006; Tejada *et al*, 2006; Ratcliff *et al*, 2006; Stark *et al*, 2007). Los abonos, abonos verdes, el compost, las turbas y los lodos son algunos tipos de enmiendas orgánicas estudiadas ampliamente.

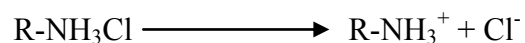
Sin embargo, sobre el uso de emulsiones asfálticas existen pocas investigaciones (Fortún y Fortún, 2005).

### 1.6 Las emulsiones asfálticas como agentes mejoradores de suelos ácidos

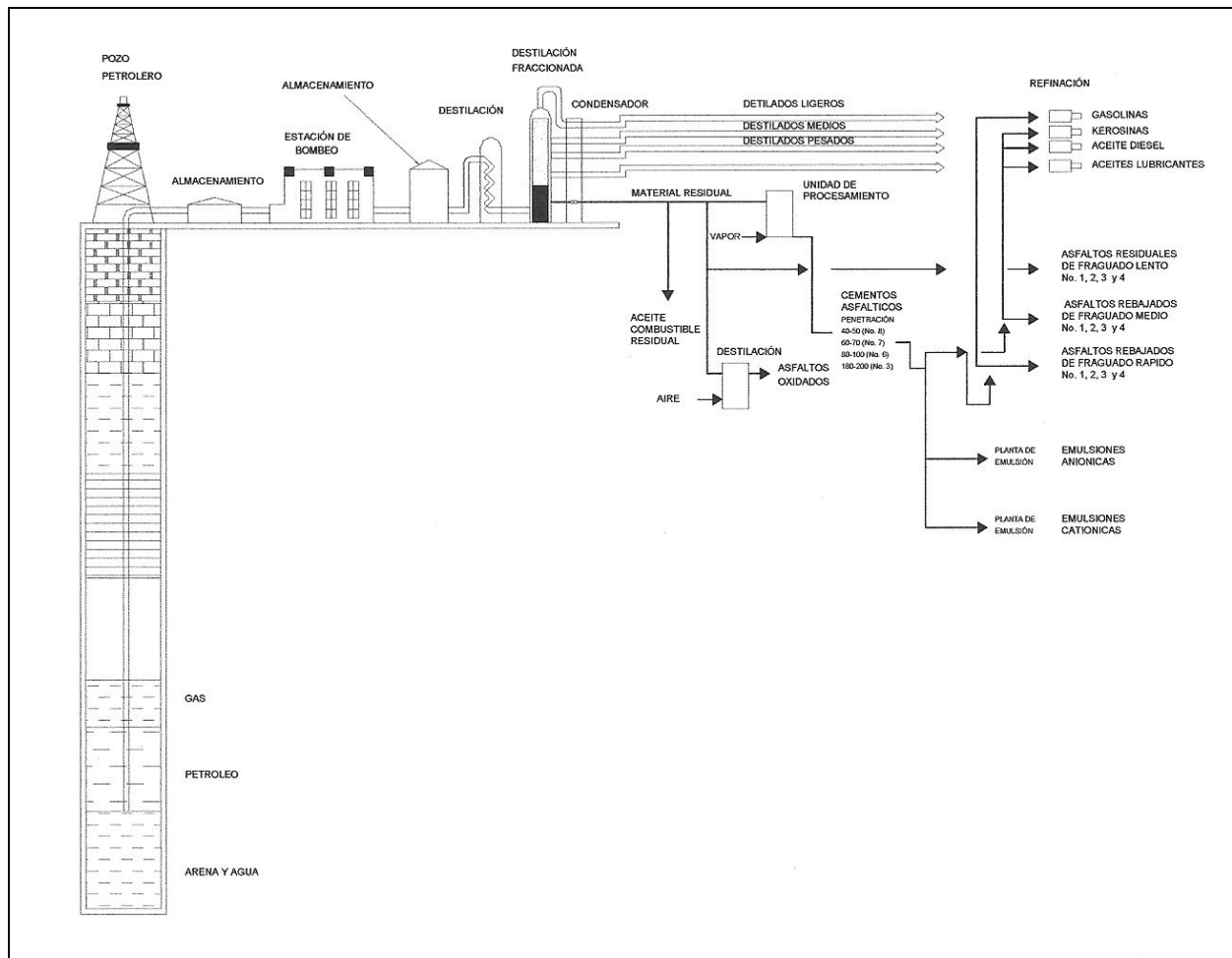
Las emulsiones asfálticas son producidas a partir del asfalto, un producto económico derivado de la refinación petrolera (Fig. 2), en combinación con agua y un agente emulsificante que se deposita en la interface agua-asfalto (Voets *et al*, 1973; Jiuzhi y Bongtong, 1985). Se clasifican en aniónicas y catiónicas según la naturaleza polar del emulsificante. Para las emulsiones aniónicas se emplean compuestos de fórmula general: RCOONa, con un grupo ácido en su parte hidrofílica, con carga negativa. En medio acuoso, ésta se disocia de esta manera:



El grupo carboxilato  $\text{COO}^-$  se va a la parte hidrofílica, mientras que el radical alquilo R, se queda en la parte hidrofóbica. En el caso de las emulsiones catiónicas, son generalmente grupos aminos con carga eléctrica positiva y con fórmula general  $\text{R-NH}_3\text{Cl}$ . Cuando este tipo de emulsificantes actúa en un medio acuoso se disocia resultando:



El grupo amino  $\text{NH}_3^+$  se va a la parte hidrofílica, mientras que el radical alquilo R se queda en la parte hidrofóbica (Talavera *et al*, 2001).



**Fig. 2. Esquema de tratamiento del petróleo para obtener los diversos productos asfálticos (Michaca *et al*, 2001)**

Desde 1930, algunos países comenzaron estudios relacionados con la aplicación de emulsiones asfálticas ó bituminosas, en la agricultura, y en este comienzo, fueron empleadas para la fijación y reforestación de suelos arenosos, mientras que en Norte-América, fueron utilizadas para la plantación de grama tipo césped para prevenir la erosión del suelo (Jiuzhi y Bongtong, 1985). En las décadas siguientes, se llevaron a cabo numerosas investigaciones sobre el uso de emulsiones asfálticas como mejorador de las propiedades físicas del suelo para fines agrícolas, reportando resultados satisfactorios. (Jiuzhi y Bongtong, 1985; Salem et al, 1985; Frede *et al*, 1994; Fortún y Fortún, 2005).

Sin embargo, el efecto de las emulsiones asfálticas sobre la microbiología del suelo solo ha sido reportado por Voets *et al* (1973) quienes evaluaron a corto y largo plazo, la actividad de algunas enzimas, así como también la densidad de los principales grupos microbianos. A dosis entre 1 y 1,5 L/m<sup>2</sup> hubo inhibición mientras que a dosis de 0,5 y 0,75 L/m<sup>2</sup> hubo un incremento en la densidad y actividad bacterias, hongos y organismos celulolíticos. Sus resultados los llevaron a concluir que las emulsiones asfálticas aplicadas a bajas dosis (0,5-0,75 L/m<sup>2</sup>) no produjeron cambios importantes en la densidad y actividad de las poblaciones microbianas estudiadas en comparación con los controles.

En Venezuela, se han investigado los efectos de las emulsiones asfálticas sobre las propiedades físicas del suelo con el fin de mejorar la estructura y la capacidad de retención de humedad en suelos de sabanas cultivados con sorgo, maní, y otros cultivos de secano, en zonas de Los Llanos orientales, occidentales y centrales de país (Pla *et al*, 1981; 1984; Lobo *et al*, 1984).

No existen reportes acerca de los efectos de las emulsiones asfálticas sobre las comunidades microbianas en estos tipos de suelos. Como es sabido, estos suelos tienen una vegetación herbácea: gramíneas y ciperáceas, donde *Trachypogon* sp predomina, ofreciendo pastizales naturales para la ganadería extensiva. No obstante, en los últimos 35 años, el patrón de uso de la tierra ha cambiado hacia la producción de cultivos (Hernández *et al*, 2002), impulsado por el incremento en la demanda de alimentos y productos con el fin de satisfacer el acelerado crecimiento demográfico de los últimos años (López-Hernández y Ojeda, 1996; Hernández *et al*, 2002).

A pesar de existir reportes acerca del efecto de emulsiones asfálticas sobre las propiedades físicas de los suelos de sabana en Venezuela y el resto del mundo, no existen trabajos relacionados del efecto de estas emulsiones sobre la funcionalidad y estructura comunitaria de la microbiota y su

ambiente físico-químico, mucho menos en climas tropicales y sobre suelos de sabanas tropicales. En este trabajo nos proponemos evaluar, bajo condiciones de laboratorio e invernadero, el efecto de emulsiones asfálticas sobre la estructura del suelo, a través de la agregación; y sobre la estructura comunitaria microbiana asociada a microagregados, de un suelo ácido de sabana. Por tal razón, este trabajo pretende contribuir aún más en las investigaciones sobre el uso de las emulsiones asfálticas como alternativa para acondicionar los suelos de sabana con fines agrícolas en el país.



## 2. ANTECEDENTES

Existen numerosos trabajos relacionados con la aplicación de emulsiones asfálticas con el fin de mejorar las propiedades físicas de suelos, por el contrario, existen pocos reportes del efecto de emulsiones asfálticas sobre la actividad enzimática y la microbiología de suelos arenosos de climas áridos, semi-áridos y tropicales, en particular, los de sabana. A continuación una revisión de los más pertinentes.

### ❖ Voets y col, 1973

Estudiaron los efectos a corto y largo plazo, de emulsiones asfálticas o bituminosas sobre la densidad microbiana y la actividad enzimática en suelos de diferentes clases texturales en Bélgica. Aplicaron dosis bajas y altas (0,5; 0,75 y 1; 1,5 L/m<sup>2</sup>)<sup>(1)</sup> antes de cultivar parcelas con hortalizas. Reportaron cambios poco significativos a corto plazo (7 meses) en la densidad microbiana y en la actividad enzimática a bajas dosis, mientras que a altas dosis, hubo inhibición de la densidad microbiana y la actividad enzimática. Por otro lado, a largo plazo (3 a 5 años) excepto las poblaciones desnitrificantes, la densidad microbiana no mostró cambios significativos debido al tratamiento con emulsión, mientras que la actividad fosfatasa, sacarasa y  $\beta$ -glucosidasa se inhibieron cerca de 1/3 respecto al control. Los autores concluyeron que en general, el tratamiento con emulsión asfáltica no generó cambios significativos en la bioquímica y la densidad microbiana de los suelos estudiados.

---

<sup>(1)</sup> 1 L/m<sup>2</sup> emulsión= 0,4 % (p/p) de emulsión

#### ❖ **Pla y col, 1981**

Emplearon emulsiones aniónicas y catiónicas en diferentes suelos agrícolas de Los Llanos venezolanos, de los órdenes Inceptisol, Alfisol y Ultisol con el fin de evaluar el efecto de las emulsiones sobre la regulación del régimen hídrico en cultivos de secano, y sobre la estabilización de agregados, para mejorar la infiltración de agua y la retención de humedad en los agregados del suelo. Alternaron ensayos en invernadero y en campo, aplicando emulsiones con aspersion superficial sobre el suelo diluida 1/6 ó 1/12 en agua. Las dosis variaron entre 0,5 a 1,5 T/ha <sup>(2)</sup> en cada caso. Los resultados mostraron que las tasas de infiltración de agua de lluvia simulada y la retención de humedad fueron significativamente mayores a los controles en suelos con emulsión aniónica y que la pérdida por erosión fue menor debido al tratamiento superficial del suelo con emulsión asfáltica. Además, la pérdida de humedad por evapotranspiración disminuyó en los suelos tratados con emulsión aniónica asfáltica.

#### ❖ **Lobo y col, 1984**

Evaluaron el uso de emulsiones asfálticas con el objetivo de reducir la pérdida de agua por evapotranspiración, en ensayos de campo, y con cultivos de maní, en suelos de la Estación Experimental de Guanipa, en Los Llanos orientales. El ensayo fue montado en parcelas de 10m x 4m, sembrándose maní a razón de 200.000 plantas/ha. La emulsión fue aplicada luego se realizar la siembra, utilizando una dosis de 1 T/ha, con aspersion superficial en capas, a partir de una dilución 1/6 en agua. Observaron que el rendimiento del maní en el suelo con asfalto duplicó al rendimiento del suelo sin tratar. Asimismo, reportaron diferencias en la

---

<sup>(2)</sup> 1 T/ha de emulsión=24752,47 L/ha=0,09 L/m<sup>2</sup>

densidad de plantas por parcela, entre los dos tratamientos, lo cual sería la causa principal de las diferencias en rendimiento (Tabla 1).

Tabla 1. Número de plantas por parcela e índices de rendimiento de maní en suelos de Guanipa.

|                          |                  |           | Rendimientos |             |               |                  |
|--------------------------|------------------|-----------|--------------|-------------|---------------|------------------|
|                          | Plantas/ parcela | cáscara % | semilla %    | Frutos t/ha | Semillas t/ha | Nº Semilla/fruto |
| <b>TRATAMIENTO</b>       |                  |           |              |             |               |                  |
| <b>Suelo sin tratar</b>  | 411              | 31,6      | 68,4         | 1,55        | 1,06          | 1,73             |
| <b>Suelo con asfalto</b> | 597              | 25,1      | 74,9         | 3,24        | 2,43          | 2,04             |

#### ❖ Pla y col, 1984

Presentaron y analizaron los datos obtenidos en ensayos controlados de campo realizados durante tres años (1979-1981) en suelos representativos del Sector Chaguaramas, Edo. Guárico, bajo condiciones de secano. Establecieron parcelas de 4m x 10m, con suelos no tratados (testigo) y suelos tratados con emulsión asfáltica catiónica, equivalente a 1,5 T/ha, diluida 1/6 en agua, aplicada por aspersión superficial después de la siembra. Los resultados señalaron que con el uso de una fina película de emulsión asfáltica sobre el suelo, se favoreció la conservación de agua en el suelo, lo que se tradujo en un incremento de la productividad de sorgo por hectárea de 23 veces comparado con las condiciones donde el suelo no tuvo la aplicación de emulsiones de asfalto (Tabla 2).

Tabla 2. Fechas de crecimiento, precipitación total y datos sobre la producción de sorgo en 1979, 1980 y 1981 en suelos sin tratar y suelos protegido con emulsión asfáltica

|                   |  | Fecha de inicio del crecimiento |        |                      |               |       |
|-------------------|--|---------------------------------|--------|----------------------|---------------|-------|
|                   |  | 1979                            | 1980   |                      | 1981          |       |
| Tratamiento       |  | 1 Junio                         | 3 mayo | 1a. cosecha 13 abril | Soca 15 julio | Total |
|                   | Precipitación total durante el período de crecimiento (mm) | 917                             | 514    | 412                  | 258           | 670   |
| Suelo sin tratar  | Nº panojas/m2  | 10                              | 7      | 9                    | 11            |       |
|                   | g/panoja   | 63                              | 60     | 32                   | 30            | 6,1   |
|                   | t/ha   | 6,3                             | 4,0    | 2,8                  | 3,3           |       |
| Suelo con asfalto | Nº panojas/m2  | 16                              | 14     | 17                   | 16            |       |
|                   | g/panoja   | 70                              | 70     | 41                   | 40            |       |
|                   | t/ha   | 11,3                            | 10,0   | 7,0                  | 6,2           | 13,2  |

### ❖ Jiuzhi y Bongtong, 1985

Evaluaron el efecto de emulsiones bituminosas sobre la humedad, la temperatura y la estructura del suelo en suelos templados agrícolas de China. La aplicación de las emulsiones fue en capas superficiales sobre el suelo. La pérdida de humedad y la retención de agua fue mayor en suelos tratados comparado con el suelo control. La tasa de evaporación disminuyó hasta un 29,7% respecto al control. Las emulsiones bituminosas asperjadas sobre suelos afectados por el congelamiento, disminuyeron la reflexión solar de 35% a 10%, incrementando a su vez, la absorción de energía solar. Aunado a la disminución de la evaporación de humedad, la pérdida de calor latente disminuyó, generando un incremento en la temperatura del suelo en 2,5 °C en promedio, en los primeros 5 cm de profundidad. La estructura del suelo se favoreció, aplicando tasas de 0,1%; 0,2% y 1% <sup>(3)</sup> en peso a suelos limosos, arenosos y ligeramente salinos. Los agregados estables al agua > 5mm en suelos

<sup>3</sup> 1% de emulsión= 24,75 T/ha=2,47 L/m<sup>2</sup>

arenosos, incrementaron en promedio entre 40,9-60%, en suelos arcillosos entre 11,9-15,1% y en suelos ligeramente salinos 8,3% en promedio.

❖ **Salem y col, 1985**

Investigaron por medio de ensayos de laboratorio, el efecto de las emulsiones bituminosas sobre la retención y separación de algunos elementos nutritivos y de metales pesados en dos suelos contrastantes. La emulsión fue aplicada a diferentes tasas, para evaluar la formación de agregados, su estabilidad y su hidrofobicidad. Los resultados mostraron que el uso de emulsión bituminosa aumentó el porcentaje de agregación y la estabilidad de los agregados. Además, disminuyó la cantidad de elementos extraíbles. Estos efectos se incrementaron al aumentar la concentración de emulsión. Por otro lado, la cantidad de nutrientes extraíbles fue mayor en agregados destruidos, que en agregados no destruidos. Así, en esta investigación los autores discutieron y propusieron el mecanismo de separación y retención de nutrientes antes y después de destruir los agregados (Fig. 3).

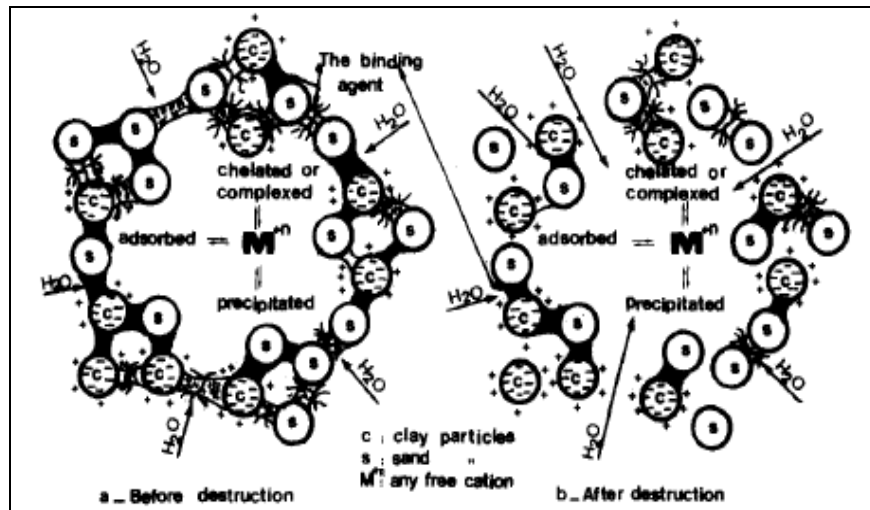


Fig. 3. Representación esquemática del modelo de retención y separación de un elemento ( $M^+$ ) antes y después de destruir los agregados tratados con emulsión bituminosa

❖ Frede y col, 1994

Evaluaron los efectos de dos compuestos sobre el control de la erosión en suelos arenosos en Egipto: las emulsiones bituminosas aniónicas, a una tasa de aplicación equivalente a 1500 Kg/ha<sup>(4)</sup>; y el polydimetilsiloxano, llamado comercialmente “SAREA-Evaporation-Inhibitor” (SEI), mezclado a diferentes concentraciones con emulsiones bituminosas aniónicas. Los resultados indicaron que el uso de acondicionadores en el suelo, no tuvieron efectos negativos sobre la ecología y ambiente del suelo. Después de la aplicación de la emulsión, el intercambio gaseoso entre el suelo y la atmósfera fue inhibido entre un 28 y 36% en suelos arenosos, mientras que en suelos limosos, fue mayor a 50%. Además, los resultados de campo y de laboratorio, indicaron que la emulsión contribuyó a reducir la tasa de evaporación en un 45%. El uso eficiente de agua en cultivos de papa, mostró un incremento de 5,8 a 8,2%. La emulsión esparcida sobre el suelo, formó una película que sello los poros capilares superficiales, reduciendo la evaporación (Fig. 4)

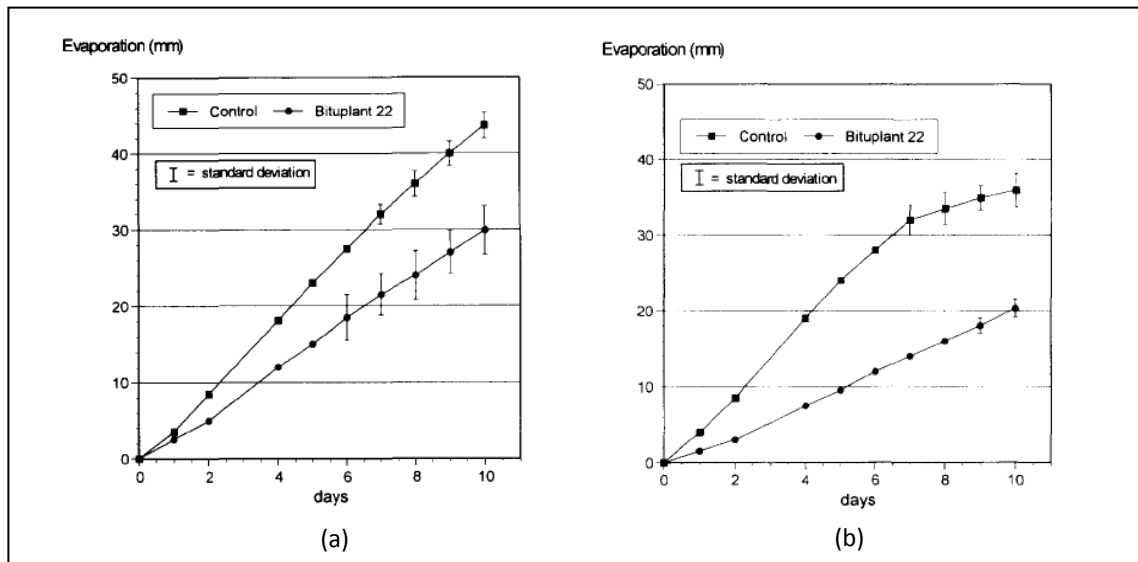


Fig. 4. Efecto de la emulsión bituminosa sobre la evaporación en suelos arenosos (a) y limosos (b)

<sup>(4)</sup> 1500 Kg/ha=1,5 T/ha de emulsión

❖ **Fortún y Fortún, 2005**

Estudiaron los efectos de las emulsiones bituminosas y otras enmiendas orgánicas, en suelos semiáridos de regiones mediterráneas. A diferencia de anteriores trabajos donde se emplearon métodos mecánicos para el estudio de la agregación en el suelo, se utilizó la microscopía electrónica de escaneo para cuantificar los agregados tratados con emulsión bituminosa. Para ello, utilizaron muestras de suelos (0-25 cm de profundidad) arenoso-limosos y arcilloso, y aplicaron emulsiones bituminosas catiónica combinadas con compostaje, en una relación 2:1, 1:1 y 1:2 p/p. En todos los tratamientos, el porcentaje de agregados estables al agua incrementó. Mientras, que la evaluación hecha con SEM (Scanning Electronic Microscopy), mostró que las emulsiones en combinación con las enmiendas orgánicas, incrementó el porcentaje de agregación, en fracciones de pequeño tamaño (100-200  $\mu\text{m}$ ) y en fracciones de mayores tamaños (500-1000  $\mu\text{m}$ ).

### **3. HIPÓTESIS**

Si las emulsiones asfálticas contribuyen a mejorar las propiedades físicas de suelos arenosos, entre ellas, las relacionadas con la agregación y la estructura del suelo, induciendo la formación de microagregados, entonces la comunidad microbiana asociada a estas estructuras en un suelo de sabana, debe reflejar cambios en: la funcionalidad bioquímica de las poblaciones bacterianas y fúngicas de dicha comunidad, y en las propiedades químicas asociadas a microagregados.



## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivos Generales**

- ❖ Determinar el efecto de las emulsiones asfálticas sobre la comunidad microbiana en microagregados de un suelo ácido de Sabana.

### **4.2 Objetivos Específicos**

- ❖ Determinar el efecto de la emulsión asfáltica aniónica sobre la formación de agregados estables al agua de un suelo de sabana.
- ❖ Caracterizar la comunidad microbiana asociada a microagregados (<250  $\mu\text{m}$ ) de un suelo de sabana con emulsión asfáltica.
- ❖ Determinar la estructura funcional de la comunidad microbiana en presencia de emulsiones asfálticas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Área de estudio

**5.1.1 Ubicación:** El suelo empleado en este estudio se colectó en un área de sabana natural localizada específicamente a  $8^{\circ} 48' 50''$  Latitud Norte y  $64^{\circ} 44' 32,61''$  Longitud Oeste, a 229 m.s.n.m, entre las poblaciones de Pariaguán y San Diego de Cabrutica, en el Hato Rancho Grande en el Municipio Miranda del Edo. Anzoátegui. El área corresponde a la región fisiográfica de Los Llanos Orientales.

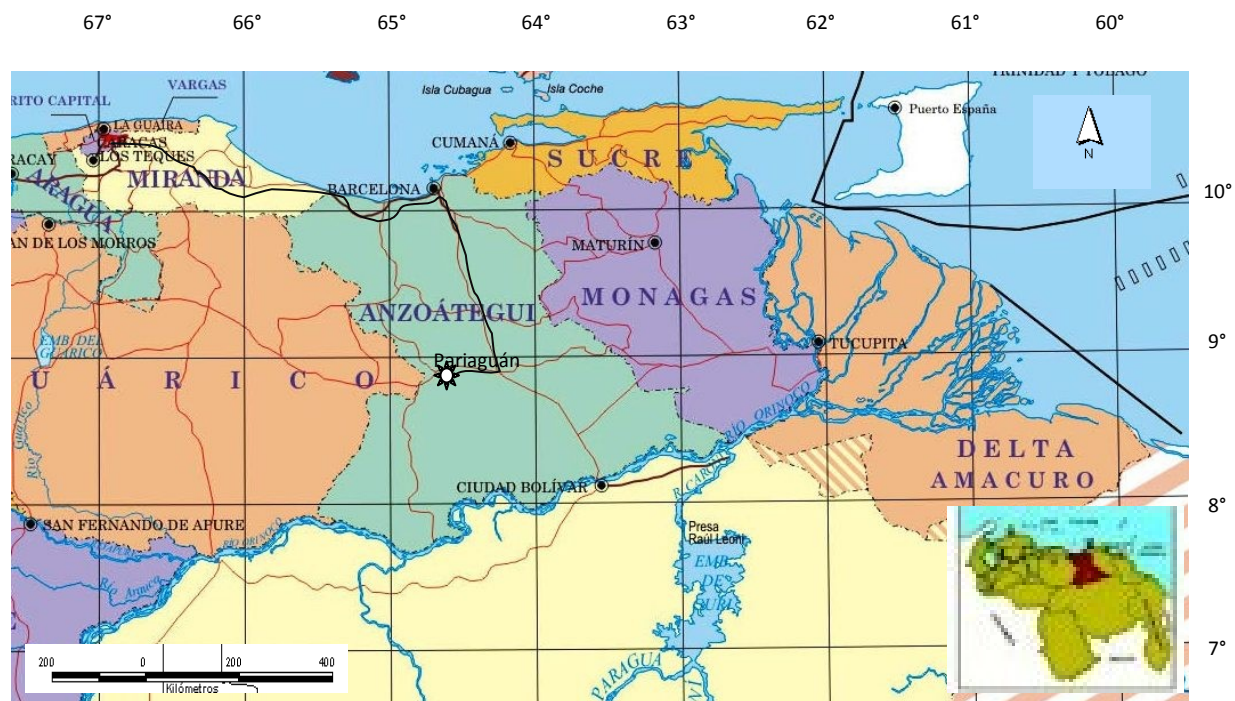


Fig. 5. Mapa del Edo. Anzoátegui señalando la ubicación relativa del área de recolección de las muestras de suelo

(Fuente: <http://www.igvsb.gov.ve/site2007/images/mp/Anzoategui.jpg>)

**5.1.2 Clima:** el área de estudio presenta un clima tropical lluvioso de sabana, influenciado por la zona de Convergencia Intertropical, activa entre Mayo y Noviembre, originando precipitaciones abundantes entre los 920-980 mm, meses en que ocurren el 90 % de todas las precipitaciones del año, mientras que los meses desde Diciembre hasta Abril, ocurren el 10 % de todas las precipitaciones del año, siendo éste período de marcada sequía. El promedio anual de las precipitaciones es de 920- 980 mm, con temperaturas que oscilan entre los 26,2 °C y 28 °C ( $\Delta t= 1,8$  °C) lo que indica que no existen variaciones drásticas de temperatura durante al año, para el período 1972-2002, según datos aportados por la estación meteorológica El Tigre (250 m.s.n.m) (Tabla 1), mientras que los datos aportados por las estaciones meteorológicas mas cercanas al área de estudio tales como: Pariaguán (922 mm anuales), El Manguito (925 mm anuales), San Diego de Cabrutica (890 mm anuales) y Santa Clara (885 mm anuales) muestran los totales anuales para la precipitación (Tabla 2).

Tabla 1 - Temperatura Media Mensual

| Estación | En   | Fe   | Mr   | Ab   | My   | Jn   | Jl   | Ag   | S    | O    | N  | D    | Prom. |
|----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|----|------|-------|
| El Tigre | 26,0 | 25,8 | 27,1 | 27,6 | 27,1 | 25,8 | 25,6 | 26,0 | 25,6 | 26,4 | 26 | 25,5 | 26,2  |

Fuente: IZT (2006)

Tabla 2 - Precipitación Media Mensual (mm)

|                        | ENE | FEB | MAR | ABR | MAY | JUN | JUL | AGO | SEP | OCT | NOV | DIC | ANUAL | My-O | %My-Oc |
|------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|------|--------|
| Pariaguán              | 5   | 5   | 7   | 45  | 66  | 135 | 147 | 167 | 128 | 124 | 73  | 20  | 922   | 840  | 91,2   |
| El Manguito            | 7   | 4   | 7   | 42  | 68  | 119 | 177 | 172 | 141 | 102 | 57  | 28  | 925   | 835  | 90,4   |
| Santa Clara            | 7   | 8   | 10  | 31  | 60  | 149 | 165 | 170 | 115 | 93  | 52  | 24  | 885   | 805  | 90,9   |
| San Diego de Cabrutica | 5   | 7   | 13  | 33  | 90  | 147 | 150 | 148 | 129 | 91  | 55  | 21  | 890   | 810  | 91,0   |

Fuente: IZT (2006)

**5.1.3 Vegetación:** Estas son sabanas arboladas que presentan un estrato gramíneo dominado por *Trachypogon* sp, *Axonopus* sp y *Bulbostylis* sp; mientras que los elementos leñosos predominantes son: Alcornoque (*bowditchia virgilioides*) (Papilianaceae) y Chaparro (*Curatella americana*) (Dilleniaceae) (Fig. 6).

**5.1.4 Geología y Suelos:** El área se encuentra en Los Llanos centro-orientales, donde la altura promedio oscila entre 80 y 150 m. La pendiente general observada oscila entre 1 y 4%, que incluye colinas y formación mesa modeladas en cárcavas, derivadas de substratos ígneos del precámbrico y detríticos del terciario (COPLANARH, 1974). La unidad geomorfológica predominante en el área es la mesa moderadamente desmantelada. El suelo utilizado en este estudio pertenece al orden *Ultisol*, sub-orden *Ustults*, gran grupo *Kandiustults*, predominantemente arenosos (a-aF) en los primeros 40 cm y luego presentan un incremento de arcilla mas allá de los 50 cm de profundidad, con matices 7,5 YR en los horizontes sub-superficiales (marrón y marrón rojizo) (USDA, 2006).

## **5.2 METODOLOGÍA**

### **5.2.1 Metodología en campo**

Se procedió en campo a delimitar un área de 1 ha (10.000 m<sup>2</sup>), y se dividió en 100 parcelas de 10m x 10m (100 m<sup>2</sup>). Se escogió una zona de características homogéneas (pendiente, tipo de suelo, vegetación, etc.) del terreno, donde se ubicaron puntos guías con estacas de maderas colocadas equidistantes cada 100 m (Fig.7). Posteriormente, se colocaron estacas de madera cada 10 m, en las marcas de las cuerdas correspondientes, quedando una disposición espacial final sobre el terreno como se muestra posteriormente (Fig. 8). Previamente se hizo la apertura de una calicata de 80 cm de profundidad para conocer las principales características del suelo adyacente.

Para la toma de muestras, se utilizó un barreno de 20 cm de longitud y 6.9 cm de diámetro y se tomaron 60 sub-muestras de 0-20 cm de profundidad en parcelas seleccionadas aleatoriamente utilizando una tabla para tal fin, con lo que se establecieron tres (3) muestras compuestas formadas por 20 sub-muestras cada una. Cada muestra compuesta fue mezclada a mano en un recipiente de plástico, y colocadas en bolsas de polietileno grandes y almacenadas a 4°C en un refrigerador y luego en cavas con hielo, hasta su llegada al laboratorio, donde permanecieron bajo condiciones de refrigeración (4 °C) hasta su utilización en los ensayos en microcosmos (Fig. 9).



Fig. 6. Aspecto visual del área donde se realizó el muestreo del suelo



Fig. 7. Disposición de las estacas y las cuerdas en el terreno seleccionado

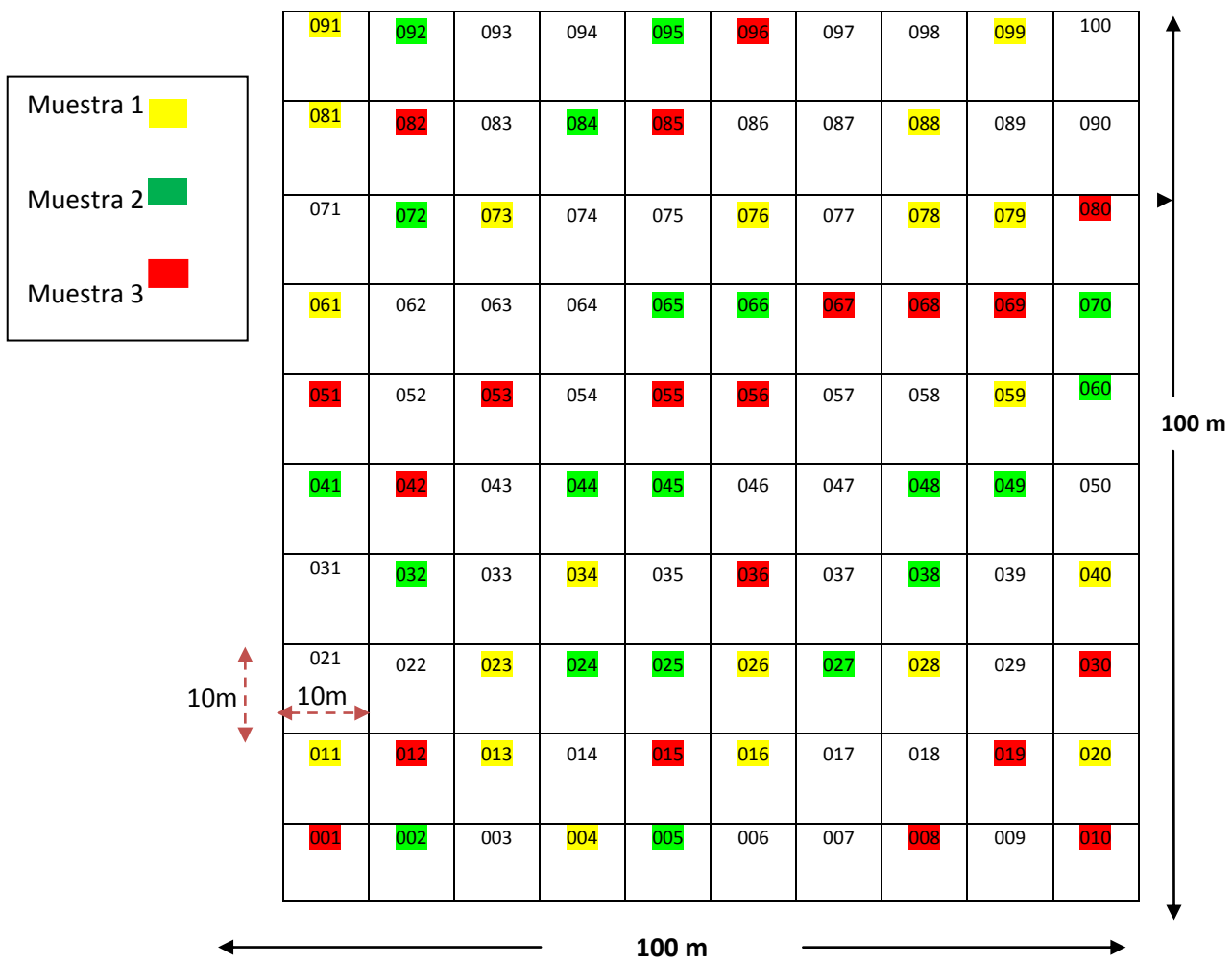


Fig. 8. Disposición espacial de los puntos de muestreo en campo seleccionadas aleatoriamente



Fig. 9. Bolsa plástica conteniendo una de las muestras compuestas recolectadas con el barreno

### Esquema Metodológico en Laboratorio

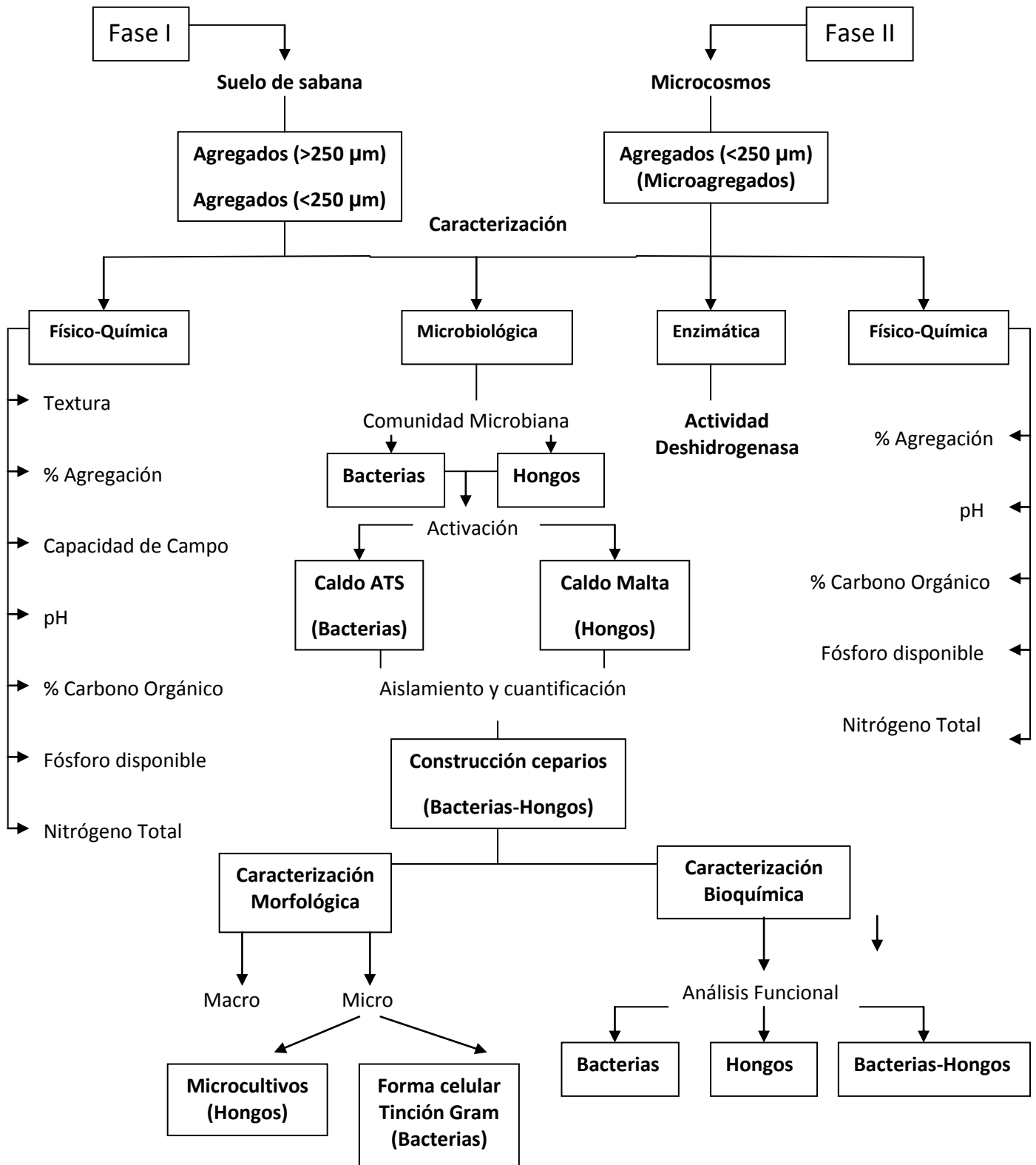


Fig. 10 Esquema metodológico general en laboratorio



### 5.2.2 Etapa de laboratorio

Los ensayos de laboratorio se dividieron en dos fases. La Fase I incluyó la caracterización microbiológica y físico-química del suelo, mientras que la Fase II correspondió al montaje de los microcosmos, que incluyó las determinaciones microbiológicas y físico-químicas de los microagregados (<250  $\mu\text{m}$ ) del suelo tratado con emulsión asfáltica, siguiendo el esquema general descrito anteriormente (Fig. 10).

### 5.3 Caracterización Físico-química del suelo

La Tabla 3 muestra los parámetros físicos-químicos evaluados tanto en la Fase I como en la Fase II. A diferencia de la Fase I, en la Fase II, se analizaron los microagregados provenientes del suelo tratado con emulsión aniónica en microcosmos (Fig. 10).

Tabla 3. Parámetros físico-químicos evaluados en los agregados antes y después de la aplicación de emulsión aniónica.

| Parámetros evaluados  | Métodos   |
|-----------------------|---|
| Textura               | Método Hidrométrico (Pla, 1983)                   |
| % de Agregación       | Tamizado Húmedo (Cambardella y Elliot, 1993)      |
| Capacidad de campo    | Diferencia de volúmenes (Anderson e Ingram, 1992) |
| pH                    | Método electrométrico (Alef y Nannipieri, 1995)   |
| % de Carbono Orgánico | Walkley-Black (1934) (Alef y Nannipieri, 1995)    |
| Fósforo disponible    | Murphy & Riley (1962) (Alef y Nannipieri, 1995)   |
| Nitrógeno total       | Kjeldahl (Hesse, 1971)                            |

### **5.3.1 Textura (Método Hidrométrico)**

Consistió en la determinación de los porcentajes de arena, limo y arcillas presentes en el suelo. Estos porcentajes se obtuvieron mediante la separación de las partículas clasificadas de acuerdo a su diámetro. Luego, utilizando el triángulo textural propuesto por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos se determinó la clasificación textural del suelo.

### **5.3.2 Agregación del suelo**

Se evaluó el porcentaje de agregación del suelo mediante la técnica de tamizado en húmedo según el método descrito por Pla (1983), con modificaciones tomadas de Cambardella y Elliot (1993) y Liu y col (2005). Para ello, se tomó 100 g de suelo de cada muestra compuesta y se pasó por un tamiz de 4 mm de poro de malla, obteniendo una fracción de tamaño  $<4000\mu\text{m}$ . De esta fracción, se tomaron 30 g de ellos y se pusieron a secar a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  en estufa por 24 horas, cumplido lo cual se volvieron a pesar (peso (a)). Otros 30 g de suelo  $<4000\mu\text{m}$  se tamizó en húmedo a través de una serie de tres tamices para obtener cuatro fracciones o tamaños de agregados: (i)  $>2000\mu\text{m}$  (macroagregados grandes), (ii) 250 a  $2000\mu\text{m}$  (macroagregados pequeños), (iii) 53 a  $250\mu\text{m}$  (microagregados), y (iv)  $<53\mu\text{m}$  (limos + partículas de arcillas). La muestra de suelo se colocó en el tope de un tamiz de  $2000\mu\text{m}$ , luego fue sumergido por 5 min en un recipiente plástico tipo cuñete conteniendo agua a temperatura ambiente. La separación fue acompañada realizando movimientos verticales de 3 cm al tamiz. Este movimiento manual se realizó 50 veces durante un período de 2 min. El material remanente sobre cada tamiz fue recogido haciendo pasar agua de una piceta a través de la malla del tamiz sobre filtros de papel de cafetera y puestos a secar a  $110\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 24 horas en la estufa y luego pesado (peso (b)). La suspensión del suelo fue recogida en recipientes plásticos limpios tipo poncheras. Esta a su vez, fue pasada a través del

próximo tamiz de menor tamaño de poro, y así sucesivamente. La determinación fue hecha por triplicado.

### 5.3.3 Corrección de agregados por arena

Las fracciones de suelo secadas en la estufa fueron enfriadas en un desecador y luego dispersadas en una solución de hexametáfosfato de sodio al 0,5 %, y agitadas mecánicamente. La fracción dispersada fue pasada a través de tamices de 2000, 250, y 53  $\mu\text{m}$ , dependiendo del tamaño de fracción evaluada. La fracción remanente sobre el tamiz fue recogida como se dijo anteriormente y secada a 110°C y pesada (peso (c)). Así, restando de los pesos (b) los correspondientes pesos (c), se obtuvieron los pesos (d). El porcentaje de agregación se calculó de acuerdo a las siguientes fórmulas:

$$1) \text{ \% Agregados de 2-4 mm estables al agua (\% AE 2-4 mm)} = \frac{d(2-4 \text{ mm})}{a - c(2-4 \text{ mm})}$$

$$2) \text{ \% AE } > 1 \text{ mm} = \frac{d(2-4 \text{ mm}) + d(1-2 \text{ mm})}{a - [c(2-4 \text{ mm}) + c(1-2 \text{ mm})]}$$

$$3) \text{ \% AE } > 0,5 \text{ mm} = \frac{d(2-4 \text{ mm}) + d(1-2 \text{ mm}) + d(0,5-1 \text{ mm})}{a - [c(2-4 \text{ mm}) + c(1-2 \text{ mm}) + c(0,5-1 \text{ mm})]}$$

$$4) \text{ \% AE } > 0,1 \text{ mm} = \frac{d(2-4 \text{ mm}) + d(1-2 \text{ mm}) + d(0,5-1 \text{ mm}) + d(0,1-0,5 \text{ mm})}{a - [c(2-4 \text{ mm}) + c(1-2 \text{ mm}) + c(0,5-1 \text{ mm}) + c(0,1-0,5 \text{ mm})]}$$

### 5.3.4 Capacidad de Campo

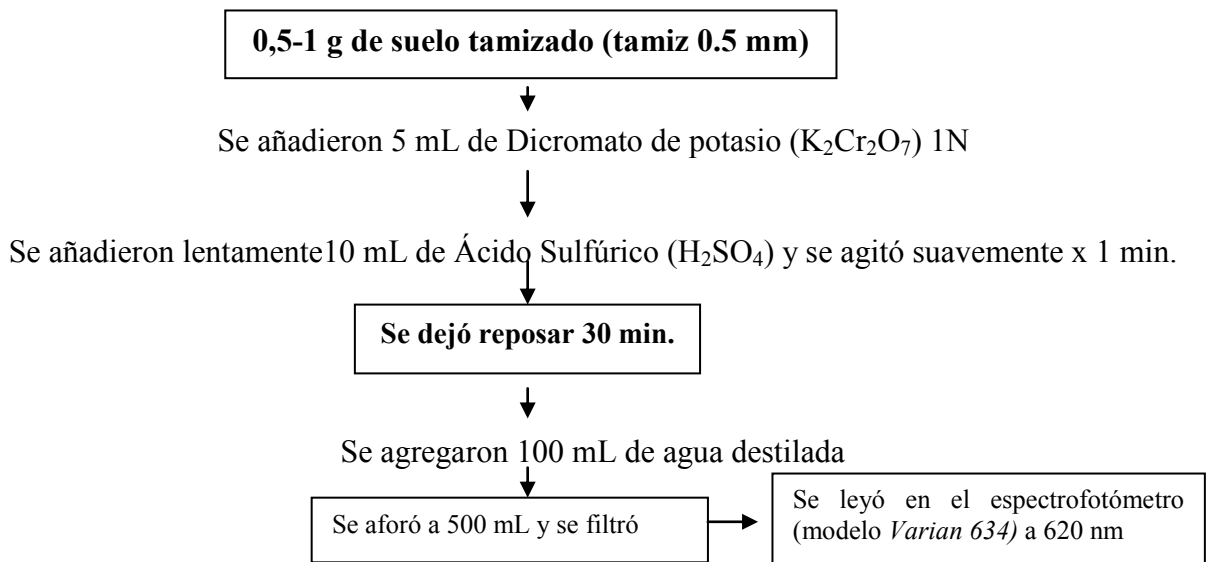
Se estimó la capacidad de campo colocando 30 g de suelo seco en un embudo con papel de filtro saturado de agua. Posteriormente se agregó al suelo un volumen de agua conocido, se dejó transcurrir 96 horas hasta que el agua drenara y el volumen excedente fue captado en un cilindro graduado. La capacidad de campo se calculó como la diferencia de volúmenes entre el volumen de agua agregado y el colectado.

### 5.3.5 pH

El pH se midió con un electrodo de vidrio marca Orión, modelo 720. Para ello, se utilizó una mezcla suelo: agua en una proporción 1:5

### 5.3.6 Carbono Orgánico

Para estimar el porcentaje de Carbono Orgánico y el porcentaje de Materia Orgánica, se utilizó el método de análisis colorimétrico de Walkley- Black (1934). Se realizó el siguiente protocolo:

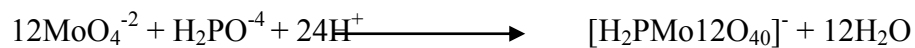


Se realizó una curva patrón de sacarosa para determinar el valor de carbono en la muestra problema, de concentración de carbono conocida. El % de C.O se obtuvo a través de la siguiente ecuación:

$$\% \text{ C.O} = \left( \frac{[\text{Sacarosa}] (\text{mg/mL}) * 25 \text{ mL}}{0.89 * 1000 \text{ mg}} \right) * 100$$

### 5.3.7 Fósforo Disponible (en solución)

Se estimó mediante el método de Murphy & Riley (1962), modificado por Watanabe y Olsen (1965) y descrito en Alef y Nannipieri (1995). En este método, el ortofosfato reacciona con el molibdeno y antimonio en medio ácido, para formar un complejo fosfoantimonil-molibdenico, como se muestra en la siguiente reacción:



Este complejo es reducido subsecuentemente con ácido ascórbico para formar otro complejo de valencia mixta, de color azul. La absorción de luz es medida a 840-880 nm en un espectrofotómetro. El protocolo fue el siguiente:

#### Paso I. Digestión Binaria (Ptotal)

- Se pesó 1 g de suelo tamizado por tamiz N° 60 (= 250 µm) y se colocaron en tubos de digestión
- Se colocaron 2 mL de Solución Binaria ( Ácido sulfúrico concentrado + Pentóxido de Vanadio + Ácido Perclórico concentrado) a cada tubo
- Los tubos se colocaron en el bloque digestor una temperatura de 180 °C por dos horas

- Al terminar la digestión, se dejaron enfriar las soluciones y se diluyen agregando agua destilada, luego se filtraron (papel filtro Whatman N° 1 ó 2) y se aforaron en balones de 50 mL.

### **Paso II Determinación de Fósforo en solución**

- Se transfirió una alícuota de patrón o de muestra a un balón de 25 mL.
- Se agregó 3 gotas de p-nitrofenol (0,25%). La solución se tornó amarilla, y se agregaron gotas de solución de HCl 5N hasta que la solución se tornó transparente.
- Se agregaron 4 mL de reactivo B, se aforó y se mezcló bien.
- Se dejó desarrollar color por 10 minutos y se midió la absorbancia a 880 nm en un espectrofotómetro (marca Varian, mod. 634).

**Reactivo B:** Para 100 mL de reactivo:

- 50 mL de ácido sulfúrico 2,5 M
- 15 mL de molibdato de amonio
- 0,528 g de ácido ascórbico diluido en 10 mL de agua destilada
- 5 mL de tartrato de potasio antimonio
- Aforar y agitar

Para la determinación de fósforo en solución, previamente se debe graficar los valores de absorbancia de los patrones vs. la concentración (en ppm) de las alícuotas, obteniendo una curva de calibración ajustada a una recta de regresión, de la forma  $y = a + bx$ , donde:

y: la absorbancia

a: punto de corte de la recta con el eje y

b: pendiente de la recta

x: concentración de fósforo

El fósforo disponible se calculó con la siguiente fórmula:

$$P \text{ (}\mu\text{g/g)} = P \text{ en la muestra (}\mu\text{g/mL)} \times \frac{25 \text{ mL}}{\text{(Alícuota)}} \times \frac{50 \text{ mL}}{\text{(g suelo)}}$$

### 5.3.8 Nitrógeno Total

Se estimó por el método de Kjeldahl, descrito en Hesse (1971), siguiendo el protocolo siguiente:

- **Digestión.**

**Paso 1:** se peso 1 g de suelo seco al aire y se tamizó (>0,15 mm). Se colocó en un tubo digestor. Luego, se añadió 3 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se colocó en el digestor y cuando la temperatura del mismo llegó a 200 °C, se retiró del digestor y se dejó reposar por unos minutos sin dejar que se enfriaran los tubos.

**Paso 2:** se añadió lentamente 2 mL de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y se esperó 15 min. Los tubos se colocaron de nuevo en el digestor y se aumentó la temperatura hasta 360 °C y se esperó hasta que se completara la digestión total de las muestras (2 horas).

**Paso 3:** una vez digerida la muestra, se dejó enfriar y se añadió 10 mL de agua destilada y se filtró, luego se enrasó a 50 mL (papel de filtro Whatman N° 42).

- **Determinación de N total**

**Paso 1:** en un tubo de digestión vacío se colocaron 25 mL de la muestra digerida y 12 mL de NaOH al 40 %, se mezcló y se colocó el tubo en el destilador Kjeldahl. Simultáneamente, en una fiola de 250 mL se colocó ácido bórico al 2% y 5 gotas de indicador y se colocó en el destilador Kjeldahl. Con todo esto listo se comenzó la destilación y se colectó 25 mL aproximado de destilado observándose un viraje de color rojo-violeta a verde.

**Paso 2:** Este paso se trató de la titulación con HCl 0,01 N. Se dejó caer gota a gota ácido hasta que el destilado viró de un color verde a un color rojo-violeta inicial y se registró el valor de HCl consumido.

El % de Nitrógeno en cada muestra se calculó a través de la siguiente fórmula:

$$\% N = \frac{(T-B) \times N \times 1,4}{S}$$

Donde:

*T: mL de ácido gastado con la valoración del destilado*

*B: mL de ácido gastado en la valoración del blanco*

*N: Normalidad del ácido valorado*

*S: peso de la muestra en gramos*

*1,4:  $10^{-3} \text{ l} \times 14 \text{ g/eq} \times 100$*



## **5.4 Caracterización microbiológica**

El suelo a ser caracterizado en la Fase I, se sometió a un proceso de tamizado, el cual consistió en: 1 kg de suelo de cada una de las muestras compuestas traídas de campo, se colocaron sobre plásticos previamente esterilizados con alcohol, en los mesones del laboratorio, dejándose secar a temperatura ambiente por 12 horas. Luego se trituraron pasando por encima un rodillo estéril para disgregar el suelo. Posteriormente, se tamizó en seco pasando el suelo a través de dos tamices: 2000  $\mu\text{m}$  y 250  $\mu\text{m}$ , con lo que se separaron dos tamaños de agregados: la fracción entre  $>250 \mu\text{m}$  y la fracción  $<250 \mu\text{m}$ .

En la Fase II, se tomaron sub-muestras de suelo tratado y no tratado con emulsión aniónica de los microcosmos y se sometió a un proceso de tamizado similar al descrito anteriormente.

### **5.4.1 Activación microbiológica**

Para la activación de la comunidad microbiana en las muestras de suelo, se utilizaron medios de cultivos comerciales deshidratados, el caldo Trypticasa de Soya (TS) (HiMedia Laboratories) para la activación de las bacterias, y el caldo Extracto Malta (HiMedia Laboratories) para la activación de los hongos. El procedimiento fue el siguiente:

- Se pesaron por separado en una balanza, 45 g de caldo Trypticase Soy Agar (ATS) y 22,5 g de caldo Malt Extract. Se colocaron en beakers de vidrio de 2,0 L de capacidad.
- Se añadió a cada beaker 1,5 L de agua destilada y se agitaron con una varilla de vidrio suavemente, hasta su completa disolución.
- Con un cilindro graduado de 250 mL, se transfirieron volúmenes de 250 mL de cada medio a balones de vidrio de 500 mL de capacidad. Se rotularon y se taparon con tapones

de gaza y fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1,5 atm de presión, durante 15 minutos.

Una vez esterilizados los medios, se procedió a incubar las muestras de suelo de la manera siguiente:

- Se pesaron sub-muestras de 25 g de cada fracción de suelo contrastante en una balanza electrónica (250-2000  $\mu\text{m}$  y  $<250\mu\text{m}$ ).
- Las porciones de 25g de suelo se agregaron asépticamente por triplicado, en cada uno de los medios de cultivos respectivos para hongos y bacterias (Fig.11).
- Los balones fueron incubados a temperatura ambiente, previa agitación manual, por 48 horas en el caso de las bacterias, y de 7 días para los hongos.



Fig.11. Balones con medios de cultivos durante la activación de la comunidad bacteriana y fúngica

#### 5.4.2 Dilución y siembra en placa

Con la finalidad de contar y aislar las poblaciones microbianas existentes en las muestras de suelo, se empleó el método de recuento en placas descrito por Sylvia y col (1998), con algunas modificaciones. Para ello, se realizaron diluciones seriadas de las muestras activadas, tomando 1 mL de suspensión celular y se transfirió a tubos de ensayos conteniendo 9 ml de Solución Salina (NaCl, 0,85%) previamente esterilizados. Así se obtuvo una dilución 1/10 ó  $10^{-1}$ . A partir de esta dilución, se repite el paso de nuevo hasta llegar a una dilución final de  $10^{-8}$  para el conteo de UFC bacterianas, y de  $10^{-6}$  para las fúngicas.

Tomando las últimas cuatro diluciones de cada serie, se procedió a inocular o sembrar en medios de cultivos sólidos, a través de dos técnicas: primero, siembra en superficie con rastrillo de vidrio sobre Agar Plate Count (PCA) contenido en placas de Petri estériles, para el recuento de células que crecen bajo condiciones aeróbicas; segundo, siembra por inclusión en Agar Plate Count (PCA) fundido (40-45 °C) y vertido en placas de Petri estériles. Es una técnica apropiada para el recuento de células anaeróbicas facultativos. Al solidificar, las células quedan incluidas dentro de la matriz del agar.

Las alícuotas fueron de 0,1 mL para la siembra en superficie, y de 1 mL para la siembra en inclusión. Se sembró por duplicado cada placa de Petri, y se incubaron a 30 °C hasta observar el crecimiento celular (UFC)

Las UFC fueron contadas manualmente, y se expresaron el número de UFC por gramo de suelo. En este caso, utilizamos la notación ( $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo seco) para facilitar la interpretación y manejo de los datos. Así, se calculó el título microbiano para cada muestra, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título microbiano} = \frac{\text{recuentos de colonias (UFC promedio)} \times 1/\text{dilución} \times (25 \text{ g}/250 \text{ mL})}{\text{Volumen de siembra (mL)}}$$

#### 5.4.3 Aislamiento y construcción del cepario

Se realizó el aislamiento de los microorganismos basado en las diferencias fenotípicas mostradas por cada colonia, tomando con una asa de platino estéril, una pequeña porción de la colonia, bacteriana o fúngica, y luego repicándola o inoculándola en placas de Agar Plate Count (PCA) en el caso de bacterias, y en placas de Agar Extracto Malta, en el caso de los hongos. Existen diversas formas de llevar a cabo este proceso. A continuación, se ilustra un ejemplo de la técnica de agotamiento seguida en este trabajo (Fig. 12) descrita en Finegold y col. (1978).

Las cepas aisladas y purificadas fueron transferidas a tubos de ensayo conteniendo medio de cultivo sólido (Agar PCA para bacterias y agar Extracto Malta para hongos) rotulados e identificados.

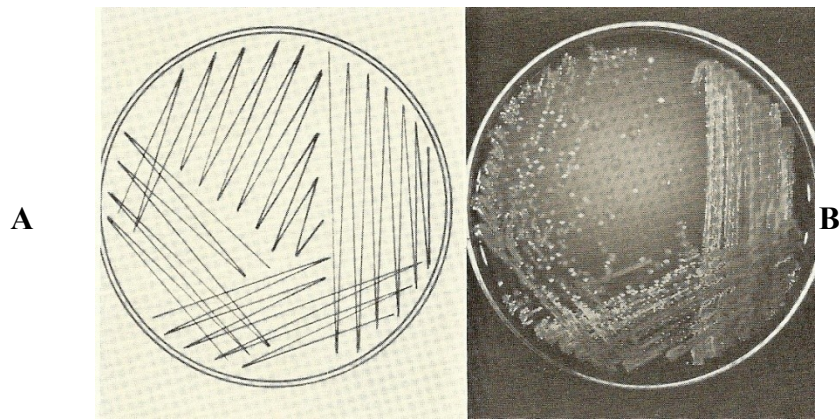


Fig. 12. A) Diagrama ilustrativo del procedimiento de agotamiento en placa para obtener cepas puras. B) Apariencia general de las colonias aisladas por la técnica descrita en A (Finegold y col, 1978).

#### 5.4.4 Caracterización macro y micromorfológica

Fueron escogidos todos los morfotipos diferentes, aeróbicas y anaeróbicas facultativas, y se procedió a caracterizar macro-morfológicamente las cepas bacterianas y fúngicas, evaluando la forma, el tamaño, el color, el tipo de borde, la superficie y la elevación de las colonias. En los casos que fue necesario, se re-aisló por repiques sucesivos, con el fin de conseguir cepas totalmente puras.

Este aislamiento permitió realizar la caracterización micro-morfológica de las cepas bacterianas. Para ello, se empleó la Tinción Gram y se describió las formas celulares presentes (Sylvia y col, 1998). La Tinción Gram es una técnica de tinción diferencial, donde las muestras se someten a una serie de soluciones en el siguiente orden: Cristal de violeta, iodo de Gram, alcohol (decolorante) y safranina como solución contraste. Esta técnica permitió observar al microscopio, las formas celulares (bastones, *cocobastones*, *cocos*, etc.), y clasificar las bacterias en dos grandes grupos: Gram positivas y Gram negativas, basándose en la estructura y los atributos químicos de las paredes celulares.

#### **5.4.4.1 Microcultivos**

Se elaboraron micro-cultivos según metodología de Samson (1995), con la finalidad de observar al microscopio las principales características distintivas de las cepas fúngicas, lo cual permitió la identificación de los principales géneros o familias de hongos. Los micro-cultivos son montajes semi-permanentes de material fresco, en portaobjetos, donde se colocó una pequeña porción del hongo ya crecido, se colocó una gota de solución colorante (Azul de Algodón), se hizo pasar por el mechero para fundir la base de agar donde creció el hongo, y con un cubre-objeto se fija el material fundido, quedando el espécimen, preservado y coloreado, para su observación al microscopio.

#### **5.4.5 Caracterización funcional**

Con ayuda de una tabla de números aleatorios, se eligieron por separado, 12 cepas bacterianas y 12 cepas fúngicas; 9 pruebas bioquímicas fueron aplicadas a las bacterias y 10 a los hongos. Tal escogencia se basó en el potencial de cada cepa para utilizar diferentes fuentes de carbono y procesos de toma de nutrientes y energía, lo que generó semejanzas y diferencias funcionales de acuerdo a las capacidades bioquímicas (genotípicas) de cada cepa (Tabla 4). Esto permitió estudiar la estructura funcional de la comunidad bacteriana y fúngica a través de una muestra representativa de todo el universo microbiano encontrada en las fracciones de suelo estudiadas. Esto a su vez, permitió llevar a cabo un análisis gremial de las comunidades bacterianas y fúngicas, tanto en el suelo como en los microcosmos, de manera que se pueda establecer la estructura comunitaria microbiana.

Tabla 4. Pruebas bioquímicas aplicadas a las cepas bacterianas y fúngicas para la caracterización funcional de la comunidad microbiana aisladas en las dos fases experimentales.

| Prueba                          | Principio  | Cepa              | Referencia                                  |
|---------------------------------|--|-------------------|---|
| Agar de Hierro de Kligger       | Fermentación de azúcares simples (Glucosa y lactosa)   | Bacterias         | MacFaddin, (1980)                           |
| Agar Almidón                    | Degradación de polisacáridos                           | Bacterias/ Hongos | MacFaddin, (1980)                           |
| Agar Celulosa                   |  |                   | Harrigan y McCane, (1968)                   |
| Agar Pectina                    |  |                   |   |
| Agar Quitina                    | Degradación de compuestos estructurales recalcitrantes | Bacterias/ Hongos | Harrigan y McCane, (1968)                   |
| Agar lignina                    |  |                   |   |
| Prueba de Nitratos              | Reducción de Nitratos                                  | Bacterias/Hongos  | MacFaddin, (1980)                           |
| Prueba licuefacción de Gelatina | Degradación de enlaces peptídicos                      | Bacterias/Hongos  | Finegold et al, (1978)<br>MacFaddin, (1980) |
| Agar Tween-80                   | Actividad Lipolítica                                   | Bacterias/Hongos  | Macfaddin, (1980)                           |
| Agar Emulsión Asfáltica al 1%   | Degradación de emulsión asfáltica                      | Bacterias/Hongos  | Mekl <i>et al</i> (2005) modificado*        |

(\*): Emulsión asfáltica al 1% en lugar de hidrocarburo.

### 5.5 Caracterización bioquímica

Se evaluó la Actividad Deshidrogenasa (ADH) como medida indirecta de la actividad metabólica de los microorganismos del suelo. Primero, la ADH se estimó de forma complementaria o alternativa al ensayo de respirometría con el fin de determinar la dosis única de emulsión a emplear en los microcosmos en la Fase II; y segundo, se evaluó la ADH durante la Fase II en los

microagregados. Se utilizó el método de Casida *et al* (1964), modificada por el Dr. Jorge Paolini (IVIC). Éste método se basó en la extracción con metanol del trifenilformazan (TPF) que se originó después de la incubación de muestras de suelo con las mismas concentraciones de emulsión empleadas en el ensayo de respirometría, y las diferentes muestras de los tratamientos, con una solución acuosa de trifeniltetrazolium cloruro (TTC) a 37 °C por 24 horas (Fig.13). El contenido de TFF se midió colorimétricamente en un espectrofotómetro a 485 nm. Para determinar la ADH de peso 1,5 g de suelo o microagregado, según el caso, y se añadió 0,015 de CaCO<sub>3</sub> y 0,5 mL de solución de TTC y 2,5 mL de agua destilada. El control contenía solamente suelo o microagregado, según el caso, sin TTC. Luego de agitar, se incubaron las muestras a 37 °C por 24 horas. Transcurrido este período, se realizaron lavados con metanol y se diluyó el filtrado en balones de 25 mL para luego medir la absorbancia a 485 nm. Se utilizaron tres replicas para cada determinación. La absorbancia de la muestra control, se restó de las absorbancias de las muestras problemas, a partir de la curva de calibración se calculó la concentración de las mismas en µg TPF/mL.

La ADH fue calculada por medio de la fórmula:

$$ADH = \frac{(M - B) \times Vf}{Ps}$$

Donde:

M: concentración de la muestra (µg TPF.mL<sup>-1</sup>)

B: concentración del blanco (µg TPF. mL<sup>-1</sup>)

Vf: volumen final en el balón aforado (25 mL)

Ps: peso seco de la muestra de suelo o microagregado (g)



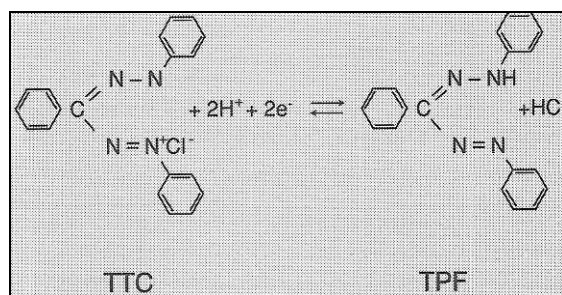


Fig. 13. Reacción de la transformación del TTC en TPF (Alef y Nannipieri, 1995)

## 5.6 Diseño Experimental de la Fase II

Se utilizó un diseño aleatorizado en bloques, de dos factores, siguiendo un modelo general  $X_{jk} = \mu + \alpha_j + \beta_k + \epsilon_{jk}$  (Spiegel, 1991), con cuatro tratamientos y tres réplicas por cada uno, como se muestra en la Tabla 5. Para ello, se construyeron unidades muestrales en recipientes plásticos llamados microcosmos, estableciendo muestreos destructivos durante 45 días de experimentación, en intervalos de 0, 15, 30 y 45 días. El número total de microcosmos fue de 48.

Tabla 5. Numero total de unidades de muestreo (microcosmos) empleadas en el experimento

| Tratamientos    | Tiempos de Muestreo (días) |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|-----------------|----------------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                 | 0                          |      |      | 15   |      |      | 30   |      |      | 45   |      |      |
| Suelo s/EA      | X1t0                       | X2t0 | X3t0 | X1t1 | X2t1 | X3t1 | X1t2 | X2t2 | X3t2 | X1t3 | X2t3 | X3t3 |
| Suelo s/EA(est) | Y1t0                       | Y2t0 | Y3t0 | Y1t1 | Y2t1 | Y3t1 | Y1t2 | Y2t2 | Y3t2 | Y1t3 | Y2t3 | Y3t3 |
| Suelo c/EA      | J1t0                       | J2t0 | J3t0 | J1t1 | J2t1 | J3t1 | J1t2 | J2t2 | J3t2 | J1t3 | J2t3 | J3t3 |
| Suelo c/EA(est) | k1t0                       | k2t0 | k3t0 | K1t1 | K2t1 | K3t1 | K1t2 | K2t2 | K3t2 | K1t3 | K2t3 | K3t3 |

Los tratamientos aplicados, los tiempos de toma de muestras en los microcosmos y la función de cada tratamiento se especifican en la tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos, intervalos de muestreo y función de los tratamientos en microcosmos

| Tratamiento | Condición suelo | Función     | Intervalo de muestreo (para todos los tratamientos) |                          |
|-------------|-----------------|-------------|---|--------------------------|
| Trat.1      | Suelo s/EA      | Control     | 0   | inicio                   |
| Trat.2      | Suelo s/EA(est) | Tratamiento | 15  | 1 <sup>er</sup> muestreo |
| Trtat.3     | Suelo c/EA      | Tratamiento | 30  | 2 <sup>o</sup> muestreo  |
| Trat.4      | Suelo c/EA(est) | Tratamiento | 45  | 3 <sup>er</sup> muestreo |

s/EA: sin emulsión; c/EA: con emulsión; (est): esterilidad inicial

Se realizó la mezcla del suelo con emulsión, para los tratamientos requeridos, según metodología de Pla *et al* (1981). Se utilizaron las muestras compuestas de suelo (1, 2 y 3) traídas de campo, se colocaron en un recipiente de plástico de 50 L de capacidad, previamente desinfectado, luego se mezcló manualmente, hasta lograr una muestra homogénea. 60 Kg de suelo de esta muestra, se pasaron a través de un tamiz de 8 mm de diámetro, para retirar piedras, raíces, restos vegetales, restos de coraza laterítica y cantos de mediano y gran tamaño; y se colocaron en otro recipiente de plástico estéril de igual capacidad. Luego, de este suelo mezclado y tamizado, se pesaron 24 Kg y se colocó en un recipiente plástico estéril de 40 L de capacidad y se añadió una cantidad de emulsión diluida a 1/6 en agua, con el fin de facilitar su manejo y mezcla. La mezcla suelo-emulsión se hizo manualmente con una pala de jardín estéril, hasta lograr la uniformidad visual de la misma. Una vez mezclada, se procedió a colocar 1 kg de suelo-emulsión en cada bandeja hasta completar 24 unidades. Se pesaron otros 24 kg de suelo, se añadió agua estéril hasta alcanzar el 60% de la capacidad de campo, y se pesó 1kg de este suelo húmedo sin emulsión, en otras 24 bandejas estériles, completándose 48 unidades experimentales o microcosmos. Posteriormente, 12 bandejas, conteniendo suelo húmedo, y otras 12 bandejas, conteniendo suelo-emulsión, fueron esterilizadas en conjunto, en autoclave a 121 °C y 1,5 atm. durante 1 hora, según método descrito por Alef y Nannipieri (1995)

Los microcosmos se colocaron en el vivero de la Facultad de Ciencias- UCV, sobre un mesón de concreto (Fig. 15), en un espacio techado y ventilado (Fig. 14b). Los microcosmos, se sometieron a riego y aireación, cada 72 horas, para mantener el 60% de humedad y el suelo aireado. Para ello, se registraron los pesos iniciales, y transcurrido el tiempo (72 horas), se pesó cada bandeja, y por diferencia de peso, se regó con agua destilada estéril hasta completar de nuevo el peso inicial, con ayuda de una balanza y el suelo se removió suavemente con un rastrillo metálico estéril para permitir la soltura y aireación del suelo.

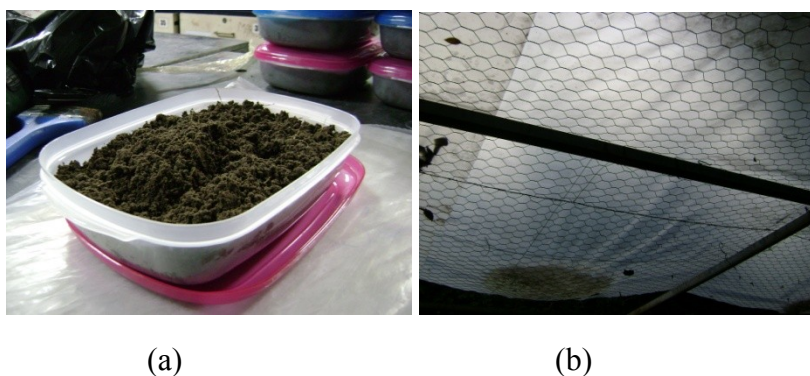


Fig. 14 (a) Bandeja con suelo; (b) Techo cubierto de plástico cubriendo el área de los microcosmos



Fig. 15. Disposición espacial de los microcosmos en el vivero, cubiertos por una malla porosa de polietileno, lo que permitió la aireación y protección contra restos vegetales y desechos

## 5.7 Tratamiento Estadístico

Los análisis químicos, físicos y microbiológicos, se realizaron por triplicado, en cada uno de los tiempos. Se empleó el análisis de varianza (ANOVA) de dos vías ( $p=0,05$ ), cuyos factores fueron tratamiento y tiempo, utilizando el programa estadístico STATISTICA versión 5.5 (Statsoft, Inc., 1999) y STATGRAPHICS *plus* 5.0 (Statistical Graphics Corp., 2000).

Para analizar los resultados de las pruebas bioquímicas, se siguió la metodología propuesta por Ramos (1996). Esta consistió en crear una base de datos alfa-numérica, proveniente del registro morfo-bioquímico obtenido a través del uso de variables binarias (+/-, que significa ausencia/presencia ó ausencia/crecimiento) en las pruebas bioquímicas, traducidas a 1/0 respectivamente y con igual significado (Zamora, 2008).

Tomando de manera aleatoria, un número finito de cepas por tratamiento y mediante el uso de la técnica de análisis multivariado «Clúster de Datos» a través del paquete estadístico MVSP versión 3.1 (Kovach Computing Services, 2001), se agruparon de acuerdo a las similitudes de las cepas en grupos funcionales, la cual es medida a través de la distancia Euclídeana. Este procedimiento permite obtener gráficamente un *dendograma* que muestra las coincidencias tanto positivas como negativas (ausencia o presencia de utilización) de cada cepa, derivando en la conformación de grupos funcionales. Esto a su vez, permitió establecer la estructura funcional de la comunidad microbiana en ambas fases del experimento.

## 5.8 Montaje de microcosmos y aplicación de Emulsión Asfáltica

La emulsión asfáltica empleada en este estudio consistió de una emulsión de tipo aniónica, manufacturada bajo el nombre “IPA Liga Piso-Mastic”, con las siguientes especificaciones técnicas:

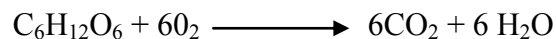
Tabla 7. Especificaciones técnicas de la emulsión aniónica empleada en este estudio.

| Especificaciones Técnicas Emulsión Aniónica (IPA C.A) |                   |                  |                               |      |
|---|-------------------|------------------|-------------------------------|------|
| Propiedades   | Unidad            | Método de ensayo | Requerimiento                 |      |
|   |                   |                  | Min                           | Máx. |
| Viscosidad Saybolt (25 °C)                            | s                 | NVC 1017         | 20                            | 100  |
| Estabilidad al almacén (1 día/25 °C)                  | %                 | NVC 934          | 0                             | 1    |
| Estabilidad por tamizado cedazo N° 20                 | %                 | NVCD 1198        | 0                             | 0,1  |
| Homogeneidad  | ADIM              | NVC 918          | Superficie regular sin grumos |      |
| Residuo por evaporación (sólido)                      | %                 | NVC 1057         | 58                            | 60   |
| pH (25°C)   | ADIM              | NVC 676          | 9                             | 12   |
| Densidad (25 °C)                                      | g/cm <sup>3</sup> | NVC 1736         | 1                             | 1,1  |
| Residuo por destilación                               | %                 | NVC 358          | 57                            | -    |
| Sedimentación (5 días)                                | %                 | NVC 358          | 0                             | 5    |
| Identificación  | ADIM              | ID-EN-405        | Bien identificado             |      |
| Aspecto del empaque                                   | ADIM              | ID-EN-405        | Limpio y sin deformaciones    |      |

Fuente: IPA C.A

### 5.8.1 Estimación de la dosis de Emulsión Asfáltica Aniónica (EA) utilizada en el experimento

Se estimó la cantidad de emulsión asfáltica aniónica a utilizar en los tratamientos que lo requerían. Para ello, se emplearon concentraciones crecientes de emulsión asfáltica en muestras de suelo, y se estimó la tasa de evolución de CO<sub>2</sub> (Merkl *et al*, 2005) a través de técnicas respirométricas (Respiración Basal del suelo) (Alef y Nannipieri, 1995), donde se determinó la dosis mínima inhibitoria, es decir, la concentración mínima de emulsión a la cual la tasa de producción de CO<sub>2</sub> mostró una inhibición. Se utilizó la metodología de Alef y Nannipieri (1995), con algunas modificaciones. Este método se basa en la respiración hecha por las células, que es la oxidación de materia orgánica por microorganismos aeróbicos, donde el oxígeno actúa como un aceptor final de electrones. A continuación una reacción general, con glucosa como ejemplo, del proceso de respiración y producción de CO<sub>2</sub> bajo condiciones aeróbicas, vía glicólisis a partir de compuestos orgánicos (Sylvia *et al*. 1998):



La respiración basal es aquella sin adición de sustratos orgánicos al suelo. En este estudio, se utilizaron respirómetros tipo Warburg (Bartha y Pramer, 1965; citado en Johnson y Curl, 1972). Como se puede apreciar en la Fig. 15, se trata de una fiola de 250 mL que tiene adherido un tubo de fondo circular, de 50 mL, cuyas bocas permiten su cierre con tapones de goma, o acoplar cualquier otro dispositivo al sistema.



Fig. 16. Frascos tipo Warburg, donde se muestra la disposición de la muestra de suelo y la trampa de CO<sub>2</sub> en un tubo adherido a un costado de la fiola de 250 ml

El ensayo se hizo colocando 40 g de suelo tamizado (2 mm), humedecido al 55 % de la capacidad de campo, y tratado con Emulsión Asfáltica Aniónica (EA), a las concentraciones 0; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 y 1,0 % en el fondo de la fiola. Se emplearon 11 frascos por triplicado, más tres replicas para el blanco, para un total de 36 frascos. En el tubo, se pipetearon 25 mL de álcali (NaOH, 0,05 M) a cada uno de las réplicas e inmediatamente, todas las bocas de los frascos fueron selladas con tapones de goma N° 16, y recubiertas con Parafilm<sup>®</sup> para garantizar la pureza de la solución. El tiempo de incubación fue de 24 horas a temperatura ambiente. Al transcurrir el tiempo, se retiraron los tapones de goma de los tubos conteniendo el álcali, y se vaciaron rápidamente en beakers de 50 mL conteniendo 5 mL de BaCl<sub>2</sub> (0,5 M). Se añadió tres gotas de fenolftaleína (1%) a cada una de las soluciones, virando a un color púrpura, como se ilustra en la figura 16. Posteriormente, se tituló con HCl (0,05 M) con bureta de precisión, cada una de las soluciones, hasta lograr el viraje de color púrpura a transparente, y se registro el volumen de HCl consumidos.



Fig. 17. Respirometría. Soluciones antes de la titulación (color púrpura) y después de la titulación (sin color)

La cantidad de CO<sub>2</sub> producido se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{CO}_2 \text{ (mg)} / \text{peso seco del suelo (g)} / \text{tiempo} = \frac{(\text{V}_0 - \text{V}) \times 1,1}{\text{M} \times \text{t}}$$

Donde:

V<sub>0</sub>: mL de HCl gastados en la titulación del blanco

V: mL de HCl gastados en la muestra

M: masa del suelo seco

t: tiempo de incubación

1,1: factor de conversión (1 mL de NaOH 0,05 M = 1,1 mg CO<sub>2</sub>)



## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Caracterización Físico-química del suelo

La Tabla 8 resume los resultados de las evaluaciones iniciales de los parámetros físicos y químicos del suelo de sabana analizado en la Fase I.

Tabla 8. Características Físico-Químicas del suelo de sabana utilizado en este estudio

| Propiedades Físico-Químicas del suelo |                |
|---------------------------------------|----------------|
| Textura                               | Franco arenoso |
| Arenas                                | 77,5%          |
| Arcillas                              | 18%            |
| Limo                                  | 4,5%           |
| Agregación (% AEA)                    |                |
| AEA (>2 mm)                           | 19,4%          |
| AEA (>1 mm)                           | 22,8%          |
| AEA (> 0,5 mm)                        | 25,5%          |
| AEA (> 0,1 mm)                        | 26,2%          |
| Humedad Capacidad de Campo            | 15 ml/50 g s.s |
| pH <sub>H2O</sub> (1:5 )              | 5,2 ± 0,04     |
| % Carbono Orgánico                    | 3,28±0,03      |
| % Materia Orgánica                    | 5,64±0,06      |
| Fósforo total(μg.g <sup>-1</sup> s.s) | 57,2±0.04      |
| % Nitrógeno Total                     | 0,02±0,01      |

s.s= suelo seco; AEA= agregados estables al agua.

La textura es franco-arenoso, a pesar de contener un elevado contenido de arenas (77.5 %), mientras que el porcentaje de Agregados Estables al Agua (% AEA) de tamaño > 2 mm fue de 19,4 %, siendo la fracción de menor abundancia respecto a los otros tamaños de agregados.

Pla (1983), señala que a mayores porcentajes de AEA de tamaño >2 mm, disminuye la erodabilidad del suelo, por lo tanto, existe un gran riesgo que estos suelos sufran importantes pérdidas por erosión. El bajo contenido de materia orgánica, de nitrógeno y fósforo, hacen que estos suelos tengan baja fertilidad natural, además de la condición arenosa de su textura, contribuye al lavado de bases intercambiables, convirtiéndolos en suelos ácidos (pH = 5,2) y desde el punto de vista agrícola, deben ser tratados con enmiendas para mejorar su condición (Sarmiento, 1990; López-Hernández y Ojeda, 1996). Las observaciones realizadas en la calicata, se muestran en la Tabla 9:

Tabla 9. Principales características de los perfiles del suelo observados en la calicata en el área de estudio

| Descripción del suelo |            |                               |          |                       |
|-----------------------|------------|-------------------------------|----------|-----------------------|
| Horizontes            | Prof. (cm) | Actividad Biológica Observada |          | Color (Tabla Munsell) |
|                       |            | Raíces                        | Insectos |                       |
| A                     | 0-15       | si                            | si       | 7,5 YR 4/6            |
| B                     | 15-40      | si                            | si       | 7,5 YR 5/6            |
| c                     | > 40       | no                            | no       | 7,5 YR 5/8            |

De acuerdo a la clasificación propuesta por el Soil Taxonomy (2006), este suelo se clasificó como un *Typic Kandiuults*, del orden Ultisol, ya que presentó acumulaciones de arcillas cercanas al 18 % (ver Tabla 8) más allá de los 40 cm de profundidad.

## 6.2 Caracterización microbiológica del suelo

La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos de la densidad bacteriana y fúngica como parte de la caracterización inicial de la comunidad microbiana evaluada en dos intervalos de tamaño contrastantes de partículas del suelo.

Tabla 10. Número inicial de Bacterias y Hongos, aeróbicos y anaeróbicos facultativos, en intervalos de tamaño contrastantes de partículas del suelo

| Intervalos de tamaño   | Bacterias  |           | Hongos     |           |
|--|------------|-----------|------------|-----------|
|  | Superficie | Inclusión | Superficie | Inclusión |
| <b>2000-250 <math>\mu\text{m}</math></b>   |            |           |            |           |
| S1   | 9,31       | 11,11     | 9,15       | 8,42      |
| S2   | 8,96       | 9,88      | 8,04       | 7,21      |
| S3   | 10,21      | 11,10     | 7,15       | 7,17      |
| S4   | 11,11      | 10,92     | 8,85       | 0,00      |
| S5   | 11,16      | 11,33     | 8,13       | 6,62      |
| S6   | 11,76      | 9,14      | 8,36       | 0,00      |
| Promedio (n=6)   | 10,42a     | 10,58a    | 8,28b      | 4,91ac    |
| Des. Est. (n=6)  | 1,12       | 0,87      | 0,70       | 3,84      |
| <b>&lt;250 <math>\mu\text{m}</math></b>  |            |           |            |           |
| M1   | 11,11      | 8,95      | 6,38       | 5,97      |
| M2   | 8,40       | 11,28     | 5,08       | 4,83      |
| M3   | 7,91       | 9,03      | 5,74       | 4,30      |
| M4   | 7,90       | 8,90      | 0,00       | 5,93      |
| M5   | 8,20       | 11,30     | 5,87       | 5,58      |
| M6   | 8,39       | 0,00      | 7,23       | 7,28      |
| Promedio (n=6)   | 8,65a      | 8,24b     | 5,05 c     | 5,65bc    |
| Des. Est. (n=6)  | 1,23       | 4,20      | 2,57       | 1,03      |
| <b>S:</b> agregados >250 $\mu\text{m}$ , llamada "Suelo"; <b>M:</b> agregados <250 $\mu\text{m}$ , llamados "Microagregados" |            |           |            |           |

Valores expresados en  $\text{Log}_{10}$  UFC.g<sup>-1</sup> suelo seco. Números con letras diferentes indican diferencias significativas entre un mismo método.

De acuerdo a la Tabla 10, la población bacteriana aeróbica y anaeróbica facultativas (Prom= 10,4 y 10,6 respectivamente), asociada a la fracción de suelo con tamaño de partículas >250  $\mu\text{m}$ , fue más numerosa que la población bacteriana asociada al intervalo de tamaño de partículas <250  $\mu\text{m}$  (Prom= log 8,7 y 8,3). De igual manera, para ambas fracciones, los hongos sembrados por rastrilleo fue el grupo más numeroso (Prom=8,3) de la comunidad fúngica. Entre ambas comunidades, las bacterias mostraron mayor densidad que los hongos, en ambos intervalos de tamaños de partículas. De igual forma, la densidad de la comunidad fúngica obtenida por rastrilleo varió marcadamente respecto al tamaño de las partículas, mostrando mayor densidad en el intervalo de tamaño de >250  $\mu\text{m}$  en comparación con la densidad en intervalos de tamaño < 250  $\mu\text{m}$ . La densidad de hongos sembrados por inclusión no mostró diferencias significativas en los intervalos contrastantes de tamaño de partículas evaluados.















Las tendencias observadas en la densidad microbiana, para las poblaciones bacterianas y fúngicas, se corresponden con lo señalado en la literatura por diversos autores (Alexander, 1977; Sylvia *et al*, 1998; Rivero, 1999; Atlas y Bartha, 2002; Coleman *et al*, 2004), que afirman que las bacterias son los organismos más numerosos del suelo, llegando a  $10^8$ - $10^9$  cel.g<sup>-1</sup> de suelo, mientras que pueden llegar a  $2 \times 10^9$  cel.g<sup>-1</sup> en el tope del suelo, y entre 1 cm y 20 cm de profundidad, pueden llegar a  $1 \times 10^8$  cel.g<sup>-1</sup>. Los hongos por su parte, le siguen a las bacterias en abundancia, pudiendo llegar a  $10^4$ - $10^6$  cel.g<sup>-1</sup> en suelos con condiciones óptimas. Por el contrario, en suelos ácidos de sabana, la actividad microbiana se ve afectada por los bajos niveles nutricionales y de materia orgánica, al igual que por la estacionalidad del ciclo lluvia-sequía, afectando el desarrollo de estas comunidades (López-Hernández *et al*, 2005). Alexander (1977) resalta el hecho de que los hongos aunque son menos numerosos que las bacterias, pueden concentrarse en gran número cerca de micro-sitios en presencia de oxígeno, pues la mayoría de

hongos son aerobios estrictos. Esto puede explicar que bajo condiciones de tensión de oxígeno, el número estimado de hongos es menor que las bacterias, bajo la misma condición. Por otro lado, Coleman *et al* (2004) señalan que la mayor diferencia entre las bacterias y los hongos, es su manera de crecer, pues las bacterias se duplican en poco tiempo, y en ausencia de oxígeno, puede activar mecanismos metabólicos de fermentación para duplicarse; además, la tensión de oxígeno requerida para los hongos, puede ser diferente en el caso de las bacterias. El hecho de aislarlas en las dos condiciones indica que la fracción de mayor tamaño, brinda mayor porosidad al suelo, creando micro-sitios donde se acumulan los hongos y en el caso de un menor tamaño de partícula, existe menor proporción de oxígeno. Sin embargo, siguen explotando micro-sitios a los cuáles pueden llegar hifas o estructuras reproductivas que se mantienen, y al proporcionarles la humedad y nutrimentos suficientes, manifiestan su viabilidad en el medio de cultivo.

## 6.2.1 Caracterización macro y micro-morfológica

La Tabla 11 muestra algunas características generales comunes utilizadas en la descripción macromorfológica de colonias microbianas provenientes de suelos, agua o alimentos, ampliamente utilizada en ensayos microbiológicos.

Tabla 11. Algunas características generales aplicadas en microbiología para describir las colonias microbianas sobre medios sólidos.

| Forma  | Borde  | Elevación   | Superficie             |
|--|--|---|------------------------|
| Puntiforme<br>    | Entero<br>        | Plana<br>          | Lisa o rugosa          |
| Circular<br>      | Ondulado<br>      | Elevada<br>        | Mate o brillante       |
| Rizoide<br>      | Lobulado<br>    | Convexa<br>      | Seca o cremosa         |
| Irregular<br>   |  | Crateriforme<br> | Invasiva o superficial |
| Filamentosa<br> | Filamentoso<br> | Acuminada<br>    |                        |

Fuente: Gerhardt *et al* (1981)

La Tabla 12 muestra los resultados desde un punto de vista integral de la descripción macromorfológica de las bacterias aisladas a través de dos métodos distintos, para ambos tamaño de partículas del suelo la cual resalta las características más importantes.

Tabla 12. Caracterización macromorfológica de las bacterias aisladas a través de dos métodos diferentes de aislamiento en partículas de tamaño <250  $\mu\text{m}$  y >250  $\mu\text{m}$ .

| Tamaño             | Método     | Tamaño           | Color      | Forma     | Borde        | Elevación | Superficie     |
|--------------------|------------|------------------|------------|-----------|--------------|-----------|----------------|
| <250 $\mu\text{m}$ | Superficie | pequeñas (<5 mm) | Beige      | Circular  | entero(liso) | cóncava   | lisa           |
|                    |            | medianas (5 mm)  | tornasol   | Ameboide  | ondulado     | plana     | cremosa        |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | traslucida |           | irregular    | elevadas  | estriada       |
|                    | Inclusión  | pequeñas (<5 mm) | tornasol   | Circular  | entero(liso) | planas    | cremosa        |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | blancas    | Ameboide  | ondulado     | cóncava   | lisa           |
|                    |            | medianas (5 mm)  | beige      | fusiforme | lobulado     | elevadas  | estriada       |
| >250 $\mu\text{m}$ | Superficie | pequeñas (<5 mm) | Beige      | Circular  | entero(liso) | cóncava   | lisa           |
|                    |            | medianas (5 mm)  | blancas    |           | ondulado     | plana     | cremosa        |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | amarillas  |           | irregular    |           | estriada       |
|                    | Inclusión  | medianas (5 mm)  | blancas    | Circular  | entero(liso) | cóncava   | cremosa        |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | Beige      | Ameboide  | ondulado     | plana     | lisa           |
|                    |            | pequeñas (<5 mm) | amarillas  | rizoide   | lobulado     | elevadas  | lisa-brillante |

Las características macromorfológicas son rasgos fenotípicos de las colonias las cuales se ponen en evidencia al utilizar diferentes medios nutritivos que favorecen el crecimiento de los organismos. La Tabla. 13 señala las principales característica macromorfológicas tomadas en cuenta en la caracterización de la comunidad fúngica presente en partículas del suelo <250  $\mu\text{m}$  y entre 2000-250  $\mu\text{m}$ . El grupo de morfos distintos descritos para el intervalo 2000-250  $\mu\text{m}$  es de 7 morfos (26,9% del total general de hongos aislados) y de 19 morfos en el intervalo de partículas <250  $\mu\text{m}$  (73,0 % del total general de hongos aislados), para un total de 26 morfos distintos de hongos.

Tabla 13. Caracterización macromorfológica de los hongos aislados a través de dos métodos diferentes de aislamiento en partículas de tamaño contrastante del suelo.

| Tamaño             | Método     | Tamaño           | Color        | Forma       | Borde       | Elevación   | Superficie |
|--------------------|------------|------------------|--------------|-------------|-------------|-------------|------------|
| <250 $\mu\text{m}$ | Superficie | grandes (>5 mm)  | blancas      | Circular    | entero      | concava     | rugosa     |
|                    |            | medianas (5 mm)  | amarillo     | irregular   | ondulado    | elevadas    | lisa       |
|                    |            | pequeñas (<5 mm) | naranja      | filamentosa | filamentoso | incrustada  | algodonoso |
|                    | Inclusión  | medianas (5 mm)  | blancas      | Circular    | entero      | concava     | cremosa    |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | Beige        | Ameboide    | ondulado    | plana       | lisa       |
|                    |            | pequeñas (<5 mm) | amarillas    | rizoide     | lobulado    | elevadas    | brillante  |
| >250 $\mu\text{m}$ | Superficie | pequeñas (<5 mm) | blancas      | Ameboide    | lobulado    | concava     | rugoso     |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | verde oscuro | Circular    | entero      | filamentosa | lisa       |
|                    |            | medianas (5 mm)  | beige        | filamentosa | filamentoso | plana       | algodonoso |
|                    | Inclusión  | pequeñas (<5 mm) | Beige        | Circular    | entero      | plana       | rugosa     |
|                    |            | medianas (5 mm)  | verde oscuro | filamentosa | difuso      | concava     | lisa       |
|                    |            | grandes (>5 mm)  | blancas      | irregular   | irregular   | incrustadas | algodonosa |

La caracterización de los morfotipos permitió tener una visión integral de los rasgos fenotípicos de las colonias tanto bacterianas como fúngicas. Estos rasgos dependerán del medio nutritivo en el cual el organismo logre desarrollarse.

La descripción macro-morfológica inicial de las comunidades microbianas aisladas de los diferentes intervalos de tamaño contrastantes de partículas del suelo, fue realizada, siguiendo algunos criterios generales aplicados en microbiología general para la descripción de las colonias, que no son más que grupos de microorganismos visiblemente formados a partir de una sola célula (Bryan *et al*, 1962). Son éstas colonias las que muestran las diferentes características que muchos autores suelen enumerar en la descripción de los morfotipos microbianos. Según Bryan *et al* (1962), una colonia puede ser descrita como: discreta, coloreada, opaca o mate, esparcida o compacta, mucosa o harinosa, de superficies cóncavas, convexas, incrustadas, entre otros atributos. Por su parte, Alexander (1977) señala que debido a la vasta variedad de microorganismos, en especial las bacterias, es casi imposible describir todos los diferentes



morfos a través de un esquema preestablecido, pues la caracterización de los microorganismos del suelo depende del tiempo de la colonia y la morfología mostrada sobre el medio usado en su aislamiento o crecimiento. Atlas y Bartha (2002) señalan que las características fenotípicas de los microorganismos, dependen de las vías específicas para metabolizar los nutrientes en un medio.

### 6.2.2 Caracterización Micro-morfológica de bacterias

La caracterización micromorfológica se llevó a cabo aplicando la Tinción Gram. Es una de las técnicas más frecuentes utilizadas en la identificación de bacterias, y se basa en las propiedades de la pared celular de las bacterias y su capacidad de retener el complejo cristal de violeta-iodo de color púrpura (Gram +) o safranina de color rojo (Gram -) por los compuestos químicos que la forman (Finegold y col, 1978). Así, las Gram (-) tienen un alto contenido de lipopolisacáridos y las Gram (+) de peptidoglicanos en sus respectivas membranas (Sylvia y col, 1998).

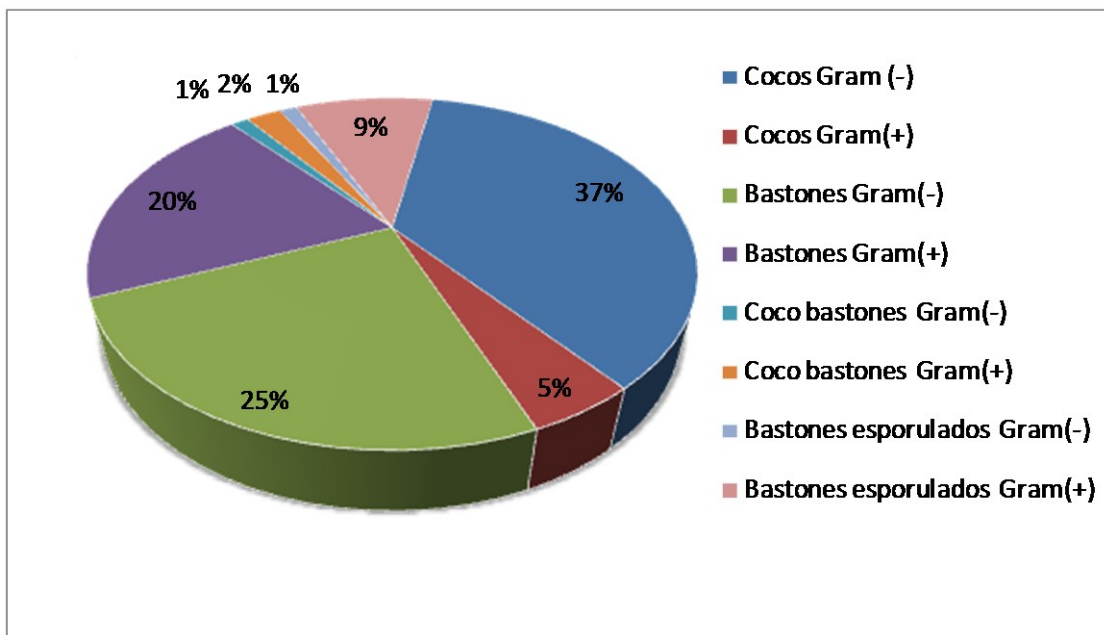


Fig. 18. Abundancia de formas celulares bacterianas obtenidas con la técnica de tinción diferencial "Tinción Gram".

La Fig. 18 muestra los porcentajes de cada uno de los grupos bacterianos diferenciados a través del uso de la Tinción Gram. Se puede observar que el 45% de todos los tipos bacterianos observados correspondieron a bacterias del tipo *bastones*, donde los Gram (-) fueron predominantes, seguidos de los Gram (+), ejemplificadas en la Fig. 19 y 20. El otro 45 % correspondió a bacterias tipo *cocos*, donde los tipos Gram (-) fueron predominantes (37 %), seguidos de los tipo Gram (+) (5 %), mostradas en las Fig. 21 y 22. Entre las bacterias tipo *bastones*, se observaron las de tipo esporuladas Gram (+), mostradas en la Fig. 23, con una representación de 9 %. En ella se observa la pared celular de un color púrpura, y las esporas se ubican empaquetadas dentro de la célula. Los resultados obtenidos reafirman lo señalado en la literatura, acerca de la predominancia de bacterias tipo *bacilos* sobre bacterias tipo *cocos* (Alexander, 1977). Las bacterias tipo *bacilos* pueden persistir en condiciones poco favorables debido a la formación de endosporas, que funcionan como parte del ciclo normal de crecimiento de la bacteria. Esto explica la presencia de este tipo de bacterias en la caracterización micro-morfológica, ya que el suelo de sabana empleado en este estudio, está sometido generalmente a altas temperaturas y períodos de sequía prolongados (Alexander, 1977).

Entre los muchos reportes del uso de esta técnica, Harada *et al* (2005) aplicó la Tinción Gram como primera prueba de identificación en la caracterización de microorganismos capaces de degradar herbicidas, mientras que Hernández *et al* (2006) realizaron caracterizaciones de bacterias vía Tinción Gram aisladas de suelos sometidos a diferentes sistemas de producción en el Edo. Amazonas, Venezuela.

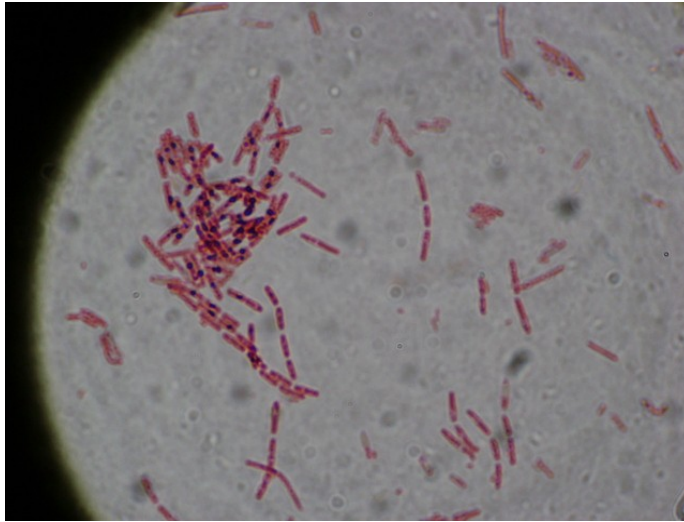


Fig. 19. Bacterias tipo *bastones* Gram (-). Se puede observar el color rojo predominante en las células (100x)

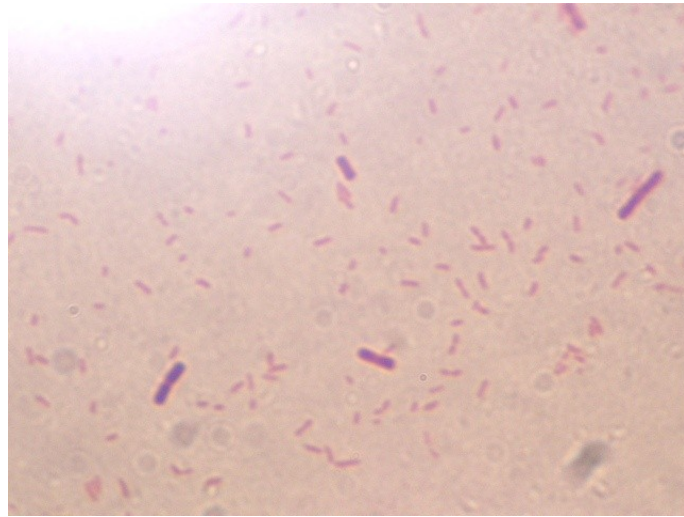


Fig. 20. Bacterias tipo *bastones* Gram (+). Se puede observar el color púrpura retenido en el exterior de las células  
(100x)

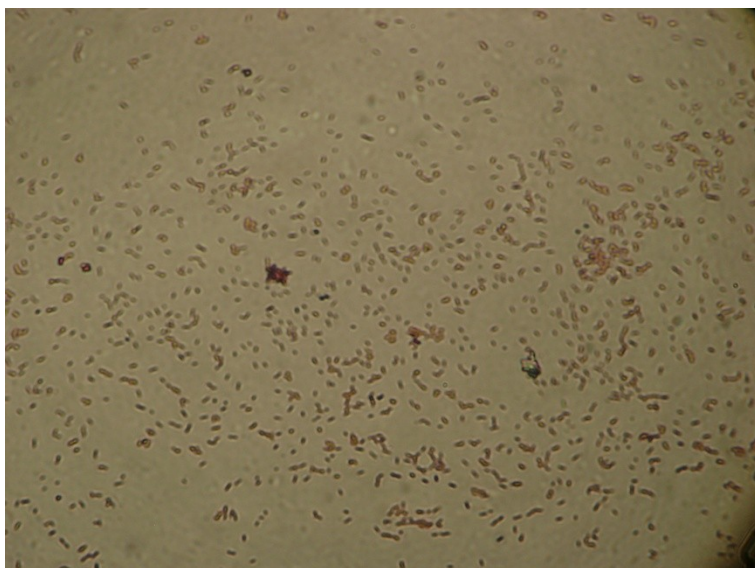


Fig. 21. Bacterias tipo *cocos* Gram (-), de color rojo (100x)

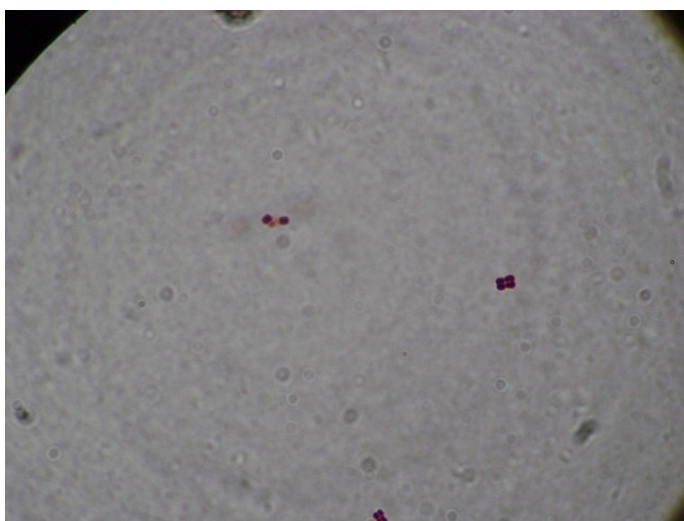


Fig. 22. Bacterias tipo *cocos* Gram (+), de color púrpura y forma esféricas (100x)

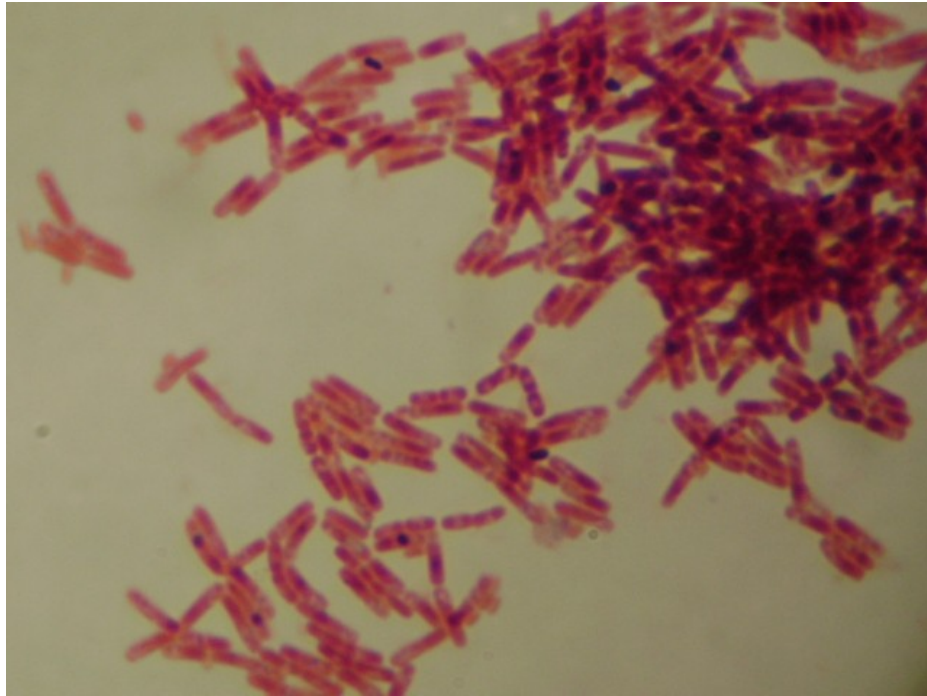


Fig. 23. Bacterias tipo *bastones* esporulados, donde resaltan las endosporas empaquetadas dentro del citoplasma celular (100x)

### 6.2.3 Caracterización micromorfológica de hongos

La descripción micro-morfológica inicial de la comunidad fúngica, se basó en la identificación de estructuras reproductivas de valor taxonómico, pues se llevaron a cabo micro-cultivos de cada uno de los hongos filamentosos utilizando la técnica de coloración con Azul de Algodón Lactofenol (Finegold y col, 1978), en montajes permanentes sobre portaobjetos, como se muestra en la Fig. 24. De los 26 hongos aislados en esta etapa inicial, 22 fueron identificados, de los cuáles 13 correspondieron a hongos filamentosos, mientras que 7 fueron identificadas como levaduras, mientras 4 morfotipos no pudieron ser clasificados dentro de los géneros comunes encontrados en suelos. Solo 2 morfotipos no pudieron ser identificados por defectos en los montajes.



Fig. 24. Montajes semi-permanentes de muestras de hongos tomadas de cultivos crecidos a 4 y 7 días para la identificación de los géneros taxonómicos

Los hongos filamentosos se observaron bajo el microscopio, con objetivos de inmersión (100x), de los montajes o micro-cultivos permanentes correspondientes. La Tabla 14 muestran los porcentajes de los géneros taxonómicos identificados.

Tabla 14. Porcentaje de géneros taxonómicos identificados inicialmente en los intervalos de tamaño de partículas contrastantes del suelo

| Género           | Porcentajes (%) |
|------------------|-----------------|
| Rhizopus sp      | 13,64           |
| Aspergillus sp   | 9,09            |
| Penicillium sp   | 27,27           |
| Trichoderma sp   | 4,55            |
| Mucor sp         | 4,55            |
| Levaduras        | 31,82           |
| No Identificados | 9,09            |

La Fig. 25 ilustra los géneros más comunes de hongos del suelo. Las Fig. 26, 27, 28, 29 y 30 muestran ejemplos de las principales estructuras reproductivas y formas celulares de los hongos aislados en este estudio.

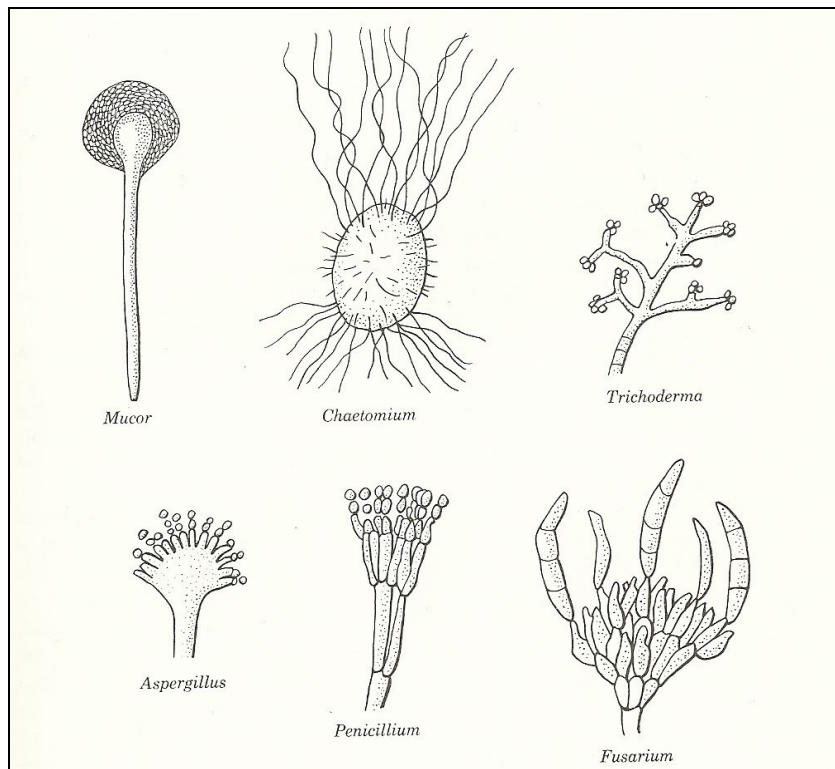


Fig. 25. Géneros comunes de hongos del suelo (Alexander et al, 1977)

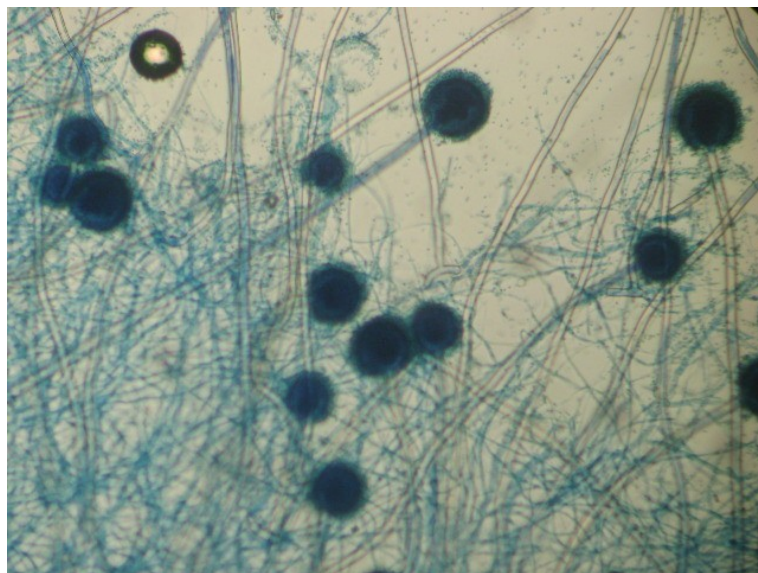


Fig. 26. Estructuras reproductivas (esporangióforos y esporangio) de *Mucor* sp (Zygomycetes) (100x)



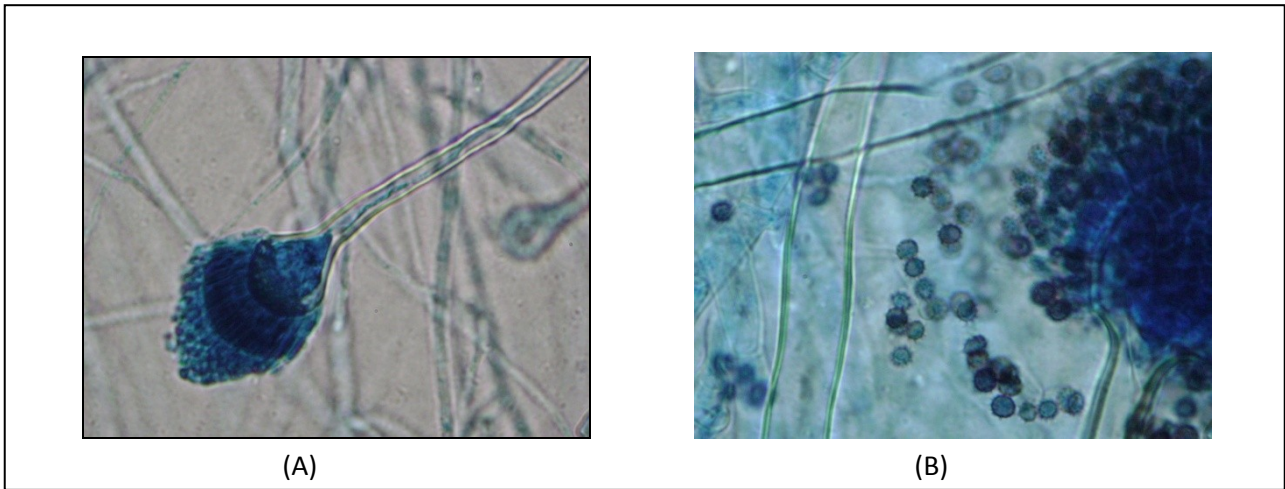


Fig. 27. Estructuras reproductivas de *Aspergillus* sp (Hyphomycetes): A) Conidióforos; B) Conidias (100x)

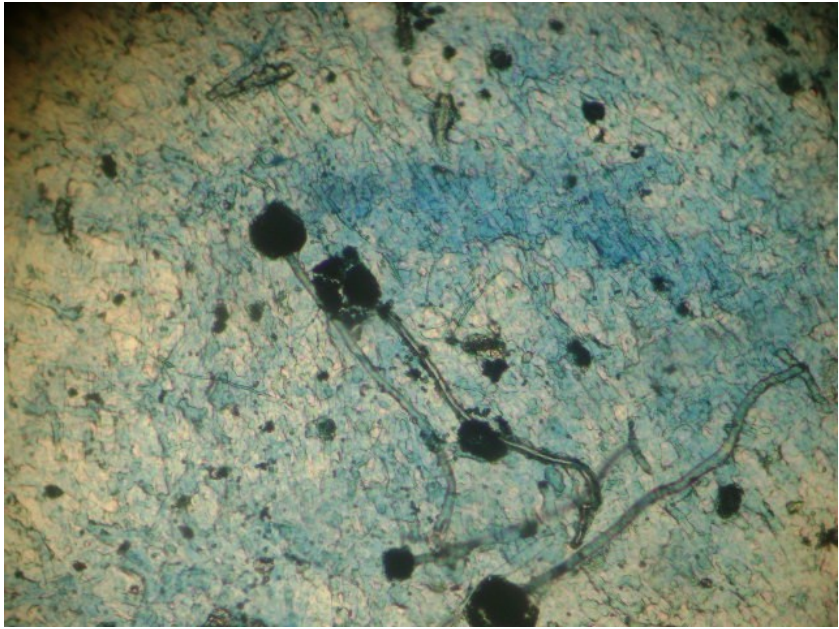


Fig. 28 Estructura reproductiva (Esporangióforo y esporangio) en *Rhizopus* sp (Zygomycetes)(100x)

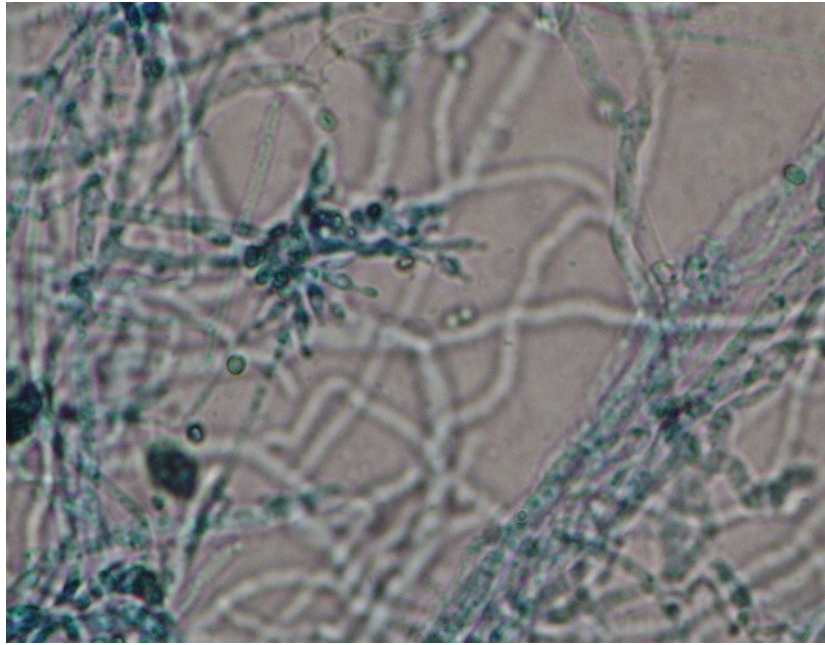


Fig. 29 Estructura reproductiva (Conidióforo) en *Trichoderma sp* (Hyphomycetes)(100x)

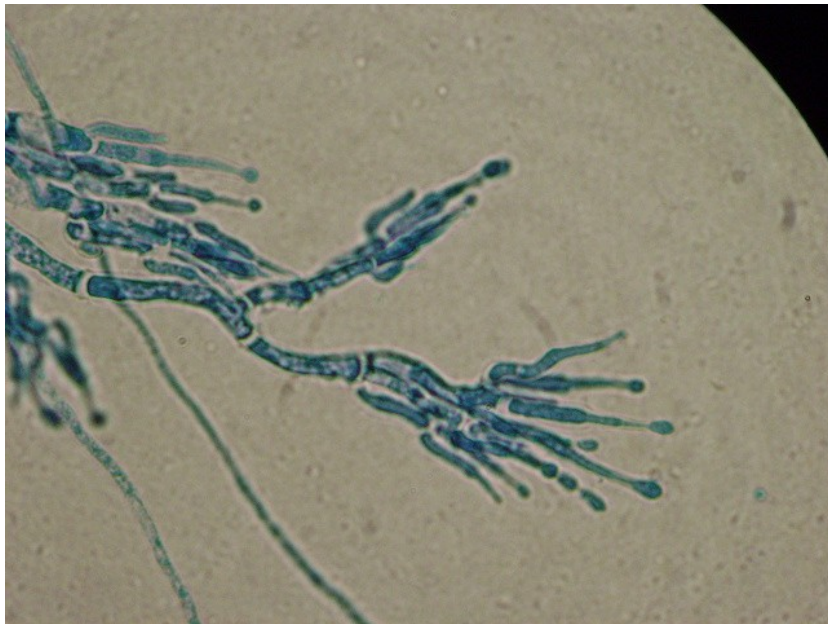
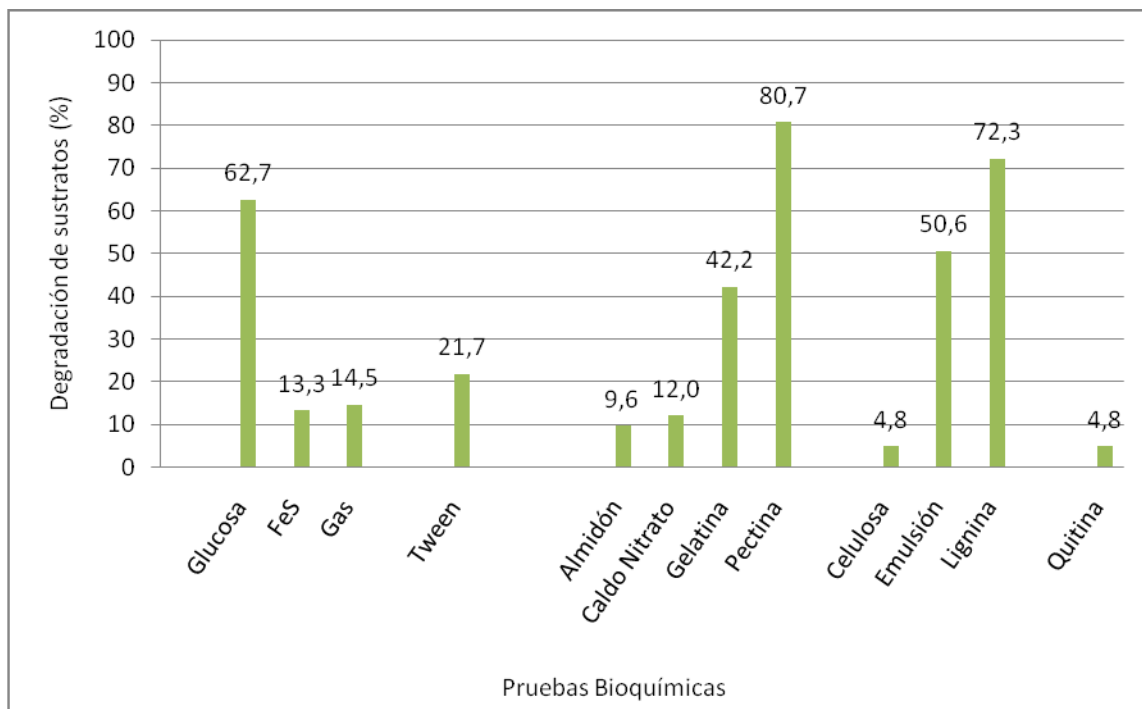


Fig. 30 Estructura reproductiva (conidióforo) en *Penicillium sp* (Hyphomycetes) (100x)

## 6.2.4 Caracterización Funcional de las comunidades microbianas en el suelo

La primera etapa de la caracterización funcional, es la determinación del potencial degradativo de la comunidad microbiana, tanto para las bacterias como para los hongos. Para ello, la comunidad bacteriana y la comunidad fúngica fueron sometidas a 10 pruebas bioquímicas, respectivamente, con el fin de detectar las capacidades metabólicas de las comunidades frente a los sustratos implicados en cada prueba. Como se observa en la Fig. 31, los sustratos más degradados por los miembros de la comunidad bacteriana, fueron: compuestos recalcitrantes como la lignina (72 %), polisacáridos como la pectina (81 %), azúcares simples como la glucosa (63 %) y Emulsión

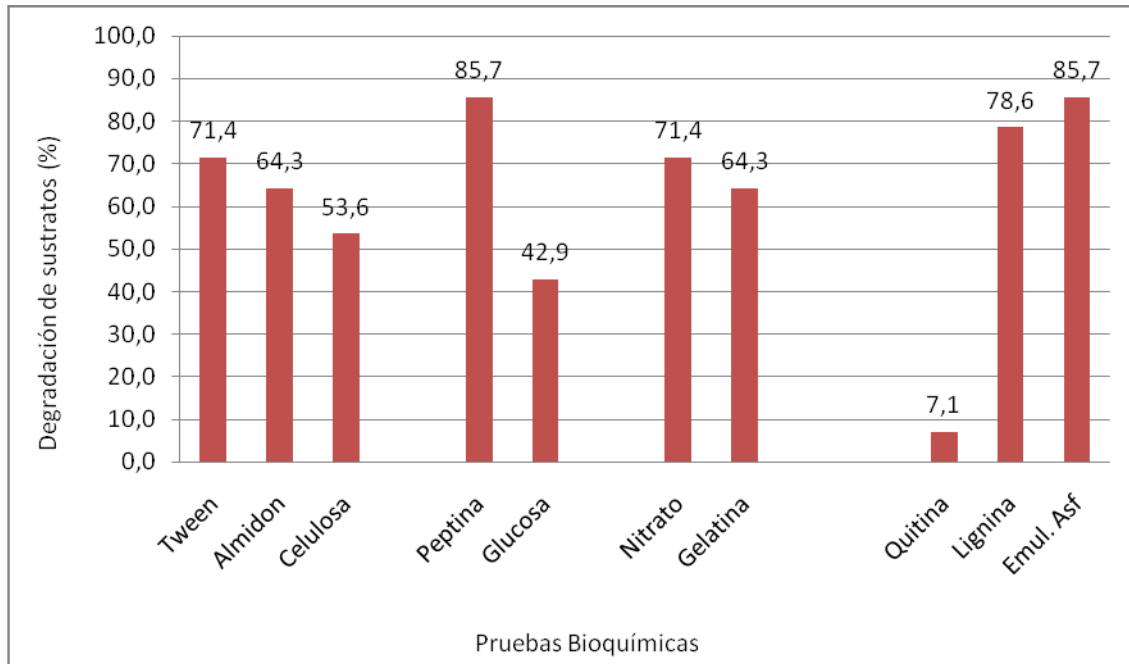


Asfáltica (51 %).

Fig.31. Porcentaje de degradación de sustratos y pruebas bioquímicas aplicadas a bacterias

La Fig. 32 muestra los sustratos degradados por la comunidad fúngica: polisacáridos como pectina (86 %), compuestos recalcitrantes como la lignina (79 %) y compuestos hidrocarbonados

como la emulsión asfáltica (86 %). De igual forma, el 71 % de las bacterias degradaron nitratos y



tuvieron capacidad lipolítica.

Fig. 32. Porcentaje de degradación de sustratos y pruebas bioquímicas aplicadas a los hongos

Con los resultados de las pruebas bioquímicas, se generó una base de datos, donde cada aislado o cepa tuvo un código que lo representa en el análisis y para ello se empleó la técnica multivariada o análisis de “clúster”. El clúster registró la información bioquímica de cada cepa y la tradujo en un hiperespacio “N” dimensional (N° de pruebas realizadas), donde la ubicación de cada una de las cepas será dada por cada una de las pruebas, de aquí que dos o más cepas funcionalmente idénticas (NGI= número de grupos funcionalmente idénticos), capaces de degradar los mismos sustratos, tuvieron los mismos valores y se ubicaron en un mismo punto en el hiperespacio, siendo cero la distancia entre ellas. Así se pudo establecer el número de grupos funcionales (NGF) dentro de la comunidad y un índice de diversidad funcional de la comunidad (IDF). Los

análisis de clúster se reportaron en este estudio tomando en cuenta los criterios propuestos por Antía (1995), los cuales son:

- GIF: N° de grupos de identidad funcional que tienen la misma capacidad de degradar los substratos (disimilitud=0)
- NGF: Total de cepas aisladas (casos) – (NGI)
- IDF Índice de diversidad funcional (IDF)= NGF/Total de cepas aisladas (Casos)
- (MDA): Máxima Distancia de Amalgamiento o agrupamiento: distancia máxima a la cual se separan los grupos funcionales

Como ejemplo de los dendogramas obtenidos en este ensayo, en la Fig. 33 se ilustra el dendograma general de los hongos aislados y analizados inicialmente. A distancia 0, hubo un grupo funcionalmente idéntico, integrado por las cepas (U28-U27).

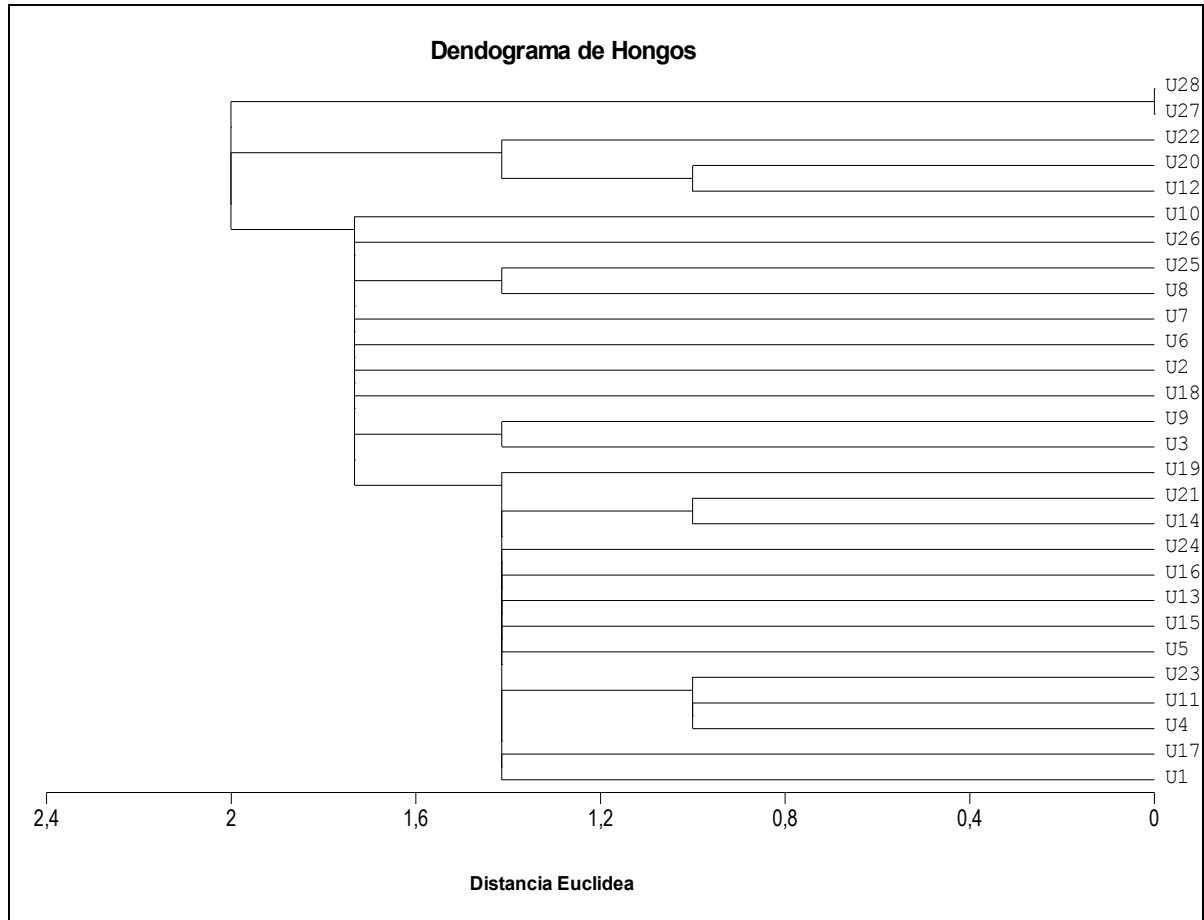


Fig. 33. Dendrograma del análisis de clúster de la comunidad fúngica, mostrando un grupo o clúster formado (hongos U28-U27)

La Tabla 15 muestra los resultados del análisis funcional de las comunidades microbianas evaluadas según los criterios descritos anteriormente.

Tabla 15. Índice de Diversidad Funcional (IDF), Distancia Máxima de Amalgamiento (DMA), Grupos de identidad formados (NGI) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de bacterias y hongos en el suelo de sabana

| NGF       |        | NGI       |        | MDA       |        | IDF       |        |
|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos |
| 69        | 27     | 12        | 1      | 1         | 1      | 0,85      | 0,98   |

Los resultados mostrados en la Tabla 15, fueron originados por análisis de clúster realizados por separado a cada comunidad microbiana. Con el fin de detectar grupos equivalentes funcionalmente entre ambas comunidades, se corrió un mismo clúster integrado por bacterias y hongos combinados (ver Tabla 16). Las pruebas bioquímicas que no fueron afines a ambas comunidades, se asignó valor cero (0). Este análisis, señaló la presencia de dos grupos funcionalmente idénticos (NFI), a distancia = 0. El dendograma respectivo, resultó ser muy denso para presentarlo acá, aunque si se describen, de acuerdo a los criterios utilizados anteriormente, la identidad funcional de toda la comunidad microbiana.

Tabla 16. Índice de Diversidad funcional (IDF), Distancia Máxima de Amalgamiento (DMA), Grupos de identidad formados (NGI) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de la comunidad microbiana en general

| Comunidad Bacterias-Hongos |     |     |      |
|----------------------------|-----|-----|------|
| NGF                        | NGI | MDA | IDF  |
| 106                        | 2   | 2   | 0,98 |

El Índice de Diversidad Funcional (IDF), en la comunidad microbiana total, fue igual al IDF de la comunidad fúngica, y ambas, fueron mayores a su vez que el IDF de la comunidad bacteriana. También se indica que se detectaron dos grupos funcionalmente idénticos (NGI), entre bacterias

y hongos, los cuáles fueron: grupo 1 (cepa 54-hongo U27) y grupo 2 (cepa 54-hongo U27- hongo U28). Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos por Hernández *et al* (2006), quien determinó un IDF mayor para la comunidad fúngica que para la comunidad bacteriana, en suelos de dos ecosistemas de producción contrastantes, lo que indicó que la comunidad fúngica fuese más diversa que la comunidad bacteriana, sin embargo, ambas comunidades tuvieron el mismo potencial degradativo indistintamente del suelo de origen. En esta etapa inicial, las comunidades analizadas funcionalmente provienen de intervalos de tamaño de partículas contrastantes de un suelo de sabana natural, que no ha sido sometido a sistemas de producción alguno, pues de esta manera, se evidencia la condición inicial de la estructura funcional de la comunidad microbiana en el suelo evaluado antes de tratar el suelo con emulsiones asfálticas.



### 6.3 Fase II. Determinaciones Microbiológicas y Físico-Químicas del suelo tratado con Emulsión Asfáltica

La emulsión asfáltica empleada en este estudio es una emulsión asfáltica comercial llamada “IPA Liga Piso-Mastic”, producida en el país y cuyas especificaciones técnicas se describieron en la Tabla 8.

La dosis de emulsión asfáltica a aplicar a los tratamientos se estimó a través de dos ensayos: primero, la determinación de Actividad Deshidrogenasa (ADH) como medida de la actividad metabólica de los microorganismos (Alef y Nannipieri, 1995); y segundo, la estimación de la tasa de producción de CO<sub>2</sub> en el suelo. La finalidad fue utilizar la concentración de emulsión asfáltica que produjera el mayor efecto inhibitorio.

La Tabla 17 muestra las concentraciones de emulsión asfáltica en (%) p/p y su equivalente en Toneladas por hectárea de suelo (T/ha).

Tabla 17. Concentraciones de Emulsión Asfáltica empleadas en los ensayos de ADH y Respirometría

| <b>Concentración Emulsión</b> |               |                |               |
|-------------------------------|---------------|----------------|---------------|
| <b>(%) p/p</b>                | <b>(T/ha)</b> | <b>(%) p/p</b> | <b>(T/ha)</b> |
| 0                             | 0             | 0,6            | 15,0          |
| 0,1                           | 2,5           | 0,7            | 17,5          |
| 0,2                           | 5,0           | 0,8            | 20,0          |
| 0,3                           | 7,5           | 0,9            | 22,5          |
| 0,4                           | 10,0          | 1,0            | 25,0          |
| 0,5                           | 12,5          |                |               |

### 6.3.1 Actividad Deshidrogenasa (ADH)

El ensayo enzimático de la ADH es uno de los más utilizados como indicador de la actividad microbiana por la alta correlación encontrada con diversos parámetros involucrados con la actividad biológica del suelo (Casida y col, 1977). Esta enzima es la encargada de la oxidación biológica de compuestos orgánicos a través de la deshidrogenación. La cuantificación de esta enzima se basa en la determinación del TFF liberado luego de incubar la muestra con TTC a 37°C por 24 horas (Paolini y col, 2005).

La Fig. 33 muestra los resultados de la ADH en muestras de suelo incubadas con concentraciones crecientes de emulsión aniónica y el sustrato TTC durante 24 horas a 37°C.

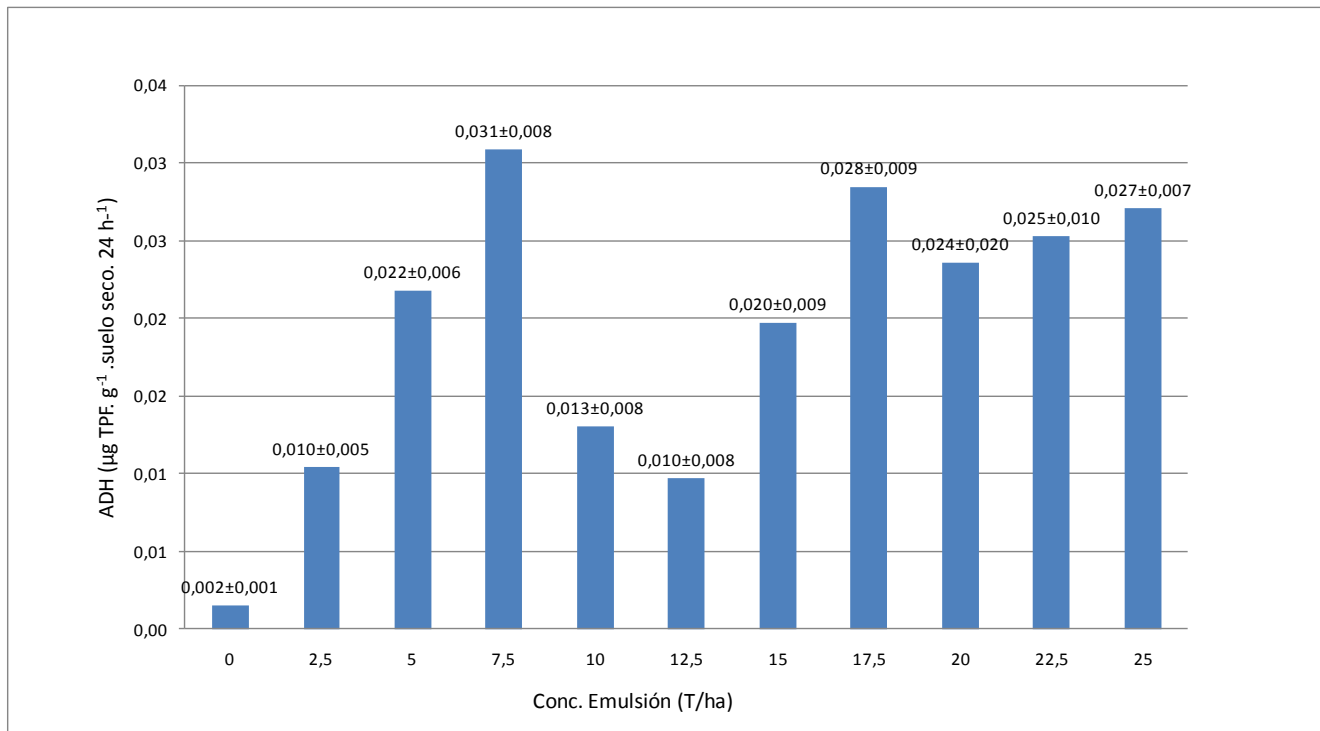


Fig. 33. Estimación de la ADH en muestras de suelos tratadas con concentraciones crecientes de emulsión aniónica. Los valores se muestran sobre cada barra, junto a la desviación estándar.

La producción de TPF fue de 0,031 ( $\mu\text{g. g}^{-1}$  suelo seco. $24 \text{ h}^{-1}$ ) a una concentración de 7,5 T/ha, siendo éste el máximo valor de ADH de todo el ensayo. Posteriormente, ocurrió una disminución de la ADH hasta 0,013 y 0,010 ( $\mu\text{g. g}^{-1}$  suelo seco. $24 \text{ h}^{-1}$ ), correspondiente a las concentraciones 10 y 12,5 T/ha respectivamente. A concentraciones mayores de emulsión, se observa un aumento en la ADH pero que no llega al máximo inicial registrado. Las variables concentración de emulsión y ADH se correlacionaron posteriormente.

La Fig. 34 muestra la correlación lineal entre la concentración de emulsión asfáltica y la ADH.

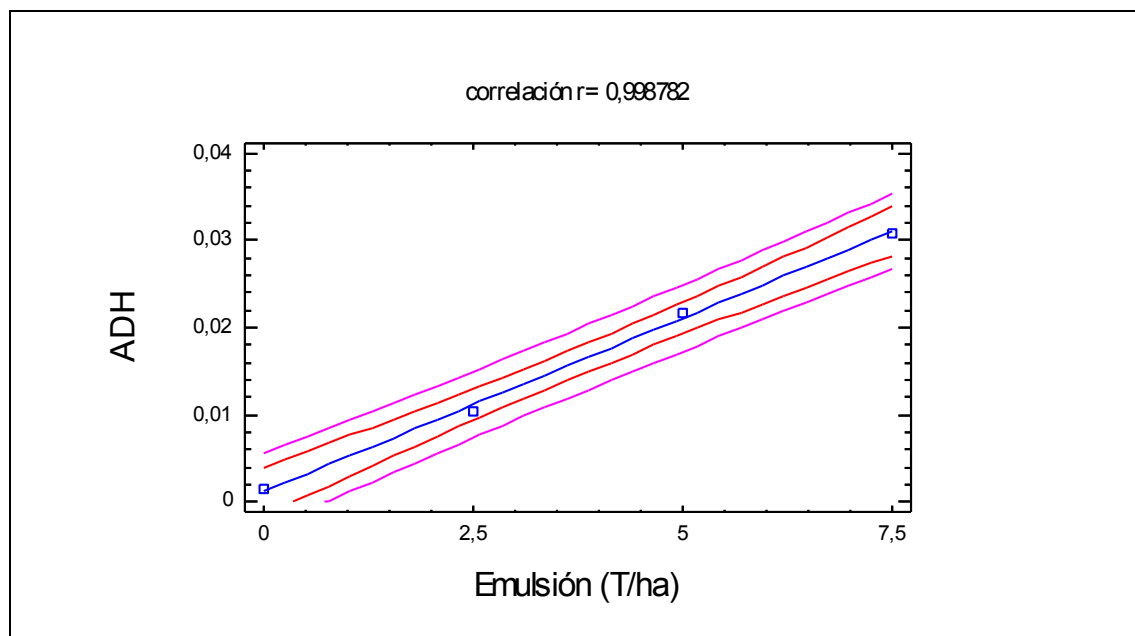


Fig. 34. Correlación lineal entre la concentración de Emulsión y la ADH para concentraciones entre 0 y 7,5 T/ha.

El Coeficiente  $r=0,99$  indicó una estrecha correlación entre ambas variables para concentraciones entre 0 y 7,5 T/ha, lo que significó una mayor producción de ADH a medida que aumentó la concentración de emulsión. Sin embargo, para concentraciones mayores a 7,5 T/ha, la correlación fue pobre debido a que no hubo linealidad en los datos obtenidos. Por otro lado, se observa que a concentraciones entre 0 y 7,5 T/ha, el aumento fue más pronunciado, en comparación con otras concentraciones.

Aunque no se midió la ADH en cada hora del experimento, Casida (1977) señala que la ADH no guarda un comportamiento lineal durante las 24 h de incubación, y sólo a pocas horas de iniciarse ésta, se puede detectar un incremento lineal en la ADH. Adicionalmente, resalta que la ADH tampoco alcanza un comportamiento lineal al incrementar las concentraciones de sustratos orgánicos, tal como la emulsión asfáltica empleada, y agrega que especialmente en suelos ácidos ( $\text{pH} \leq 5$ ), la ADH es notoriamente baja. De forma similar, Paolini y col. (2005), obtuvieron un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de la ADH al incorporar materiales orgánicos a un suelo, tales como: lodos residuales, estiércol de chivo y residuos de sábila (*Aloe vera*), en los instantes iniciales del ensayo, y luego una disminución notoria hacia tiempos más prolongados.

### **6.3.2 Producción de CO<sub>2</sub>**

La respirometría del suelo es una técnica utilizada comúnmente para estimar índices de consumo de O<sub>2</sub> ó producción de CO<sub>2</sub>, ya que son sinónimos en los procesos de respiración (Alef y Nannipieri, 1995). En este ensayo, se determinó la evolución del CO<sub>2</sub> producido por la comunidad microbiana en muestras de suelos tratadas con diferentes concentraciones de emulsión asfáltica, dentro de recipientes especiales que permitieron la captación del CO<sub>2</sub> producido.

La Fig. 35 muestra los resultados de la respirometría, realizado con las mismas concentraciones utilizadas en la determinación de la ADH

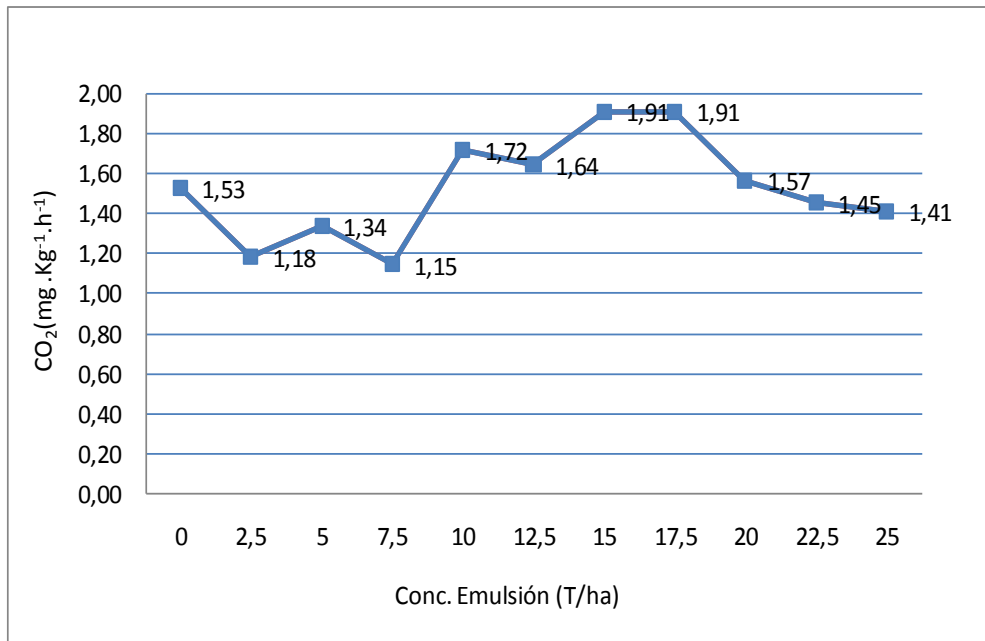


Fig. 35. Producción de CO<sub>2</sub> durante el ensayo de respirometría en muestras de suelos tratadas con concentraciones crecientes de emulsión asfáltica

La concentración de emulsión asfáltica equivalente a 7,5 T/ha generó la mayor inhibición en la producción de CO<sub>2</sub> en el sistema, comparada con la muestra sin emulsión, con una producción de 1,15 (mg CO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). A partir de la concentración de 10 T/ha de emulsión, aumentó la producción de CO<sub>2</sub> hasta una concentración de 15 T/ha, para luego disminuir gradualmente al aumentar las concentraciones de emulsión. De igual forma que para la ADH, los datos de CO<sub>2</sub> fueron analizados estadísticamente mediante un análisis de correlación.

La Fig. 36 muestra la correlación lineal entre la concentración de emulsión asfáltica y el CO<sub>2</sub> producido, a concentraciones entre 0 y 15 T/ha (ver Fig. 35), ya que a mayores concentraciones, los valores de CO<sub>2</sub> mostraron un comportamiento errático.

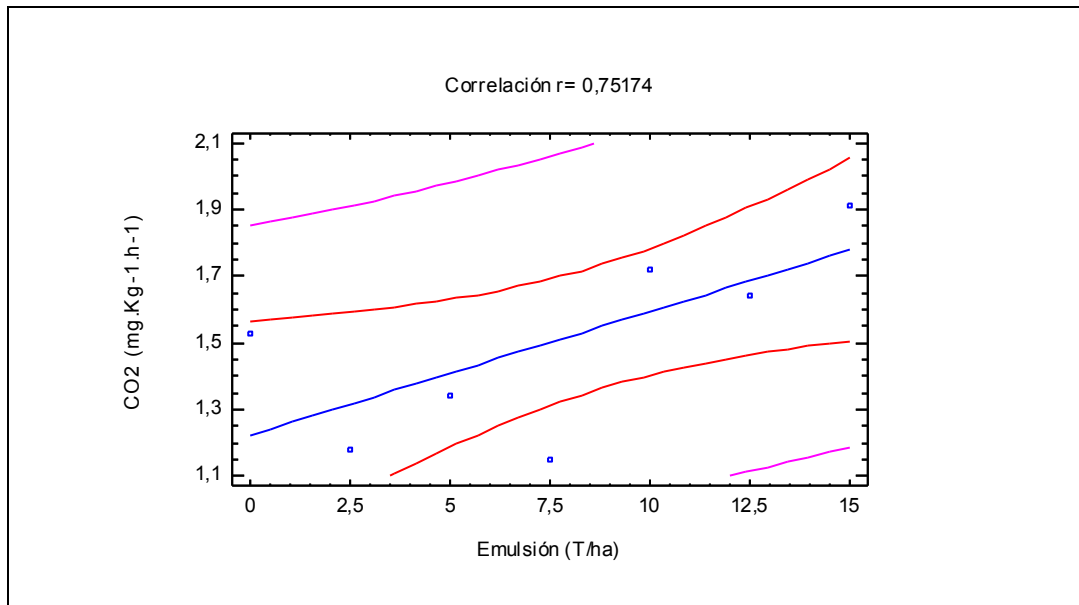


Fig. 36. Correlación lineal entre la concentración de emulsión y el CO<sub>2</sub> producido durante el ensayo de respirometría de un suelo

En general, la variación en la producción de CO<sub>2</sub> se relacionó estrechamente de manera positiva, con la concentración de emulsión asfáltica aplicada hasta concentraciones de 15 T/ha. El valor máximo fue alcanzado a una concentración de 15 T/ha, con 1,91 (mg.CO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>), mientras que el valor mínimo se registró a los 7,5 T/ha, con 1,15 (mg CO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>). Éste valor mínimo evidenció una situación de inhibición en la producción de CO<sub>2</sub> durante el ensayo.

De acuerdo a los resultados, la dosis de emulsión asfáltica elegida para los microcosmos fue la que produjo la mayor inhibición en la producción de CO<sub>2</sub>, que correspondió a una concentración de 7,5 T/ha, con 1,15 mg CO<sub>2</sub>.Kg<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> producido. Por otro lado, el ensayo de la ADH sólo tuvo una estrecha correlación a bajas concentraciones de emulsión, y presentó un valor máximo de

actividad enzimática de 0,031 ( $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}\text{suelo seco}\cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 7,5 T/ha de emulsión. A pesar de que existe buena correlación entre la ADH y otros índices biológicos evaluados en el suelo, tal como la producción de  $\text{CO}_2$ , entre otros (Casida *et al*, 1977), la ADH produjo resultados contradictorios, y una pobre correlación lineal. En consecuencia, el ensayo de respirometría resultó ser determinante en la elección de la dosis única a aplicar en los microcosmos, pues mostró de forma clara el efecto inhibitorio buscado.

La Tabla 18 muestra algunas dosis de emulsión asfálticas empleadas en estudios previos, incluyendo la dosis de emulsión asfáltica a emplear en este estudio.

Tabla 18. Dosis de emulsiones asfálticas aplicadas como tratamiento por diversos autores en estudios anteriores.

| <b>Dosis Empleadas en estudios anteriores</b> |                     |                  |
|---|---------------------|------------------|
| <i>Autor</i>                                  | <i>Dosis (T/ha)</i> | <i>País</i>      |
| Voets y col (1973)                            | 5 y 10              | Bélgica          |
| Petrovic (1975)                               | 37,5                | Estados Unidos   |
| Pla y col (1981)                              | 0,5-1,5             | <b>Venezuela</b> |
| Pla y col (1984)                              | 1,5                 | <b>Venezuela</b> |
| Lobo y col (1984)                             | 1                   | <b>Venezuela</b> |
| Jiuzhi y Bongtong (1985)                      | 2,5-5 y 25          | China            |
| Salem y col (1985)                            | 12,5 y 25           | Bélgica          |
| Frede y col (1994)                            | 1 y 1,5             | Alemania         |
| <b>Reyes (2009)</b>                           | 7,5                 | <b>Venezuela</b> |

#### 6.4 Montaje de los microcosmos

Se realizó luego de determinar la dosis de emulsión a aplicar. Esto permitió llevar a cabo las distintas mezclas suelo-emulsión y establecer los tratamientos descritos en la Tabla 6, dando inicio al montaje de los microcosmos o unidades experimentales. Cada recipiente contuvo 1 Kg de suelo tratado o no con emulsión asfáltica aniónica, a una humedad del 60% de la capacidad de campo, y se dispusieron en un área controlada en el vivero de la Facultad de Ciencias-UCV, por un período de incubación de 45 días, realizando sub-muestras destructivos en cada bloque a intervalos de 15 días.

La Fig. 37 muestra la manera en que fueron colocados los microcosmos, una vez establecidos todos los tratamientos planteados. La malla porosa de plástico fue colocada sobre todas las bandejas, para impedir la entrada de animales, basura, restos vegetales y a su vez, permitir la aireación de los mismos.

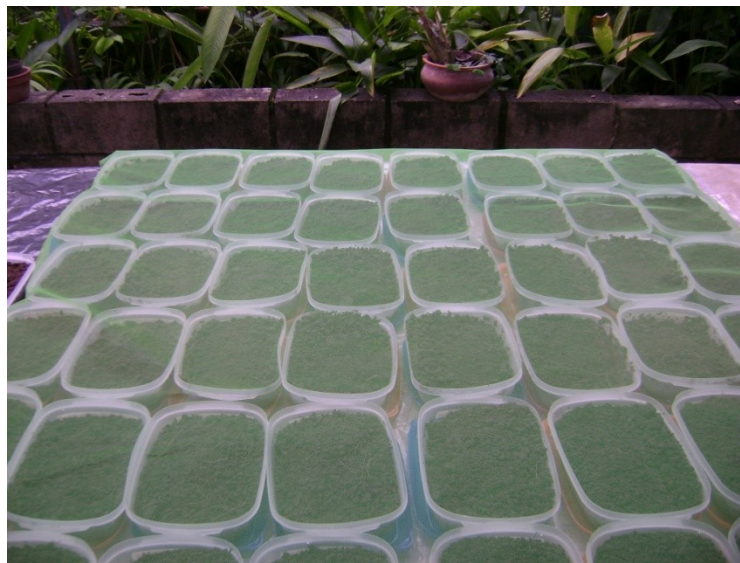


Fig. 37. Disposición final de los microcosmos en el vivero de la Facultad de Ciencias-UCV. Se observa una malla porosa plástica cubriendo los microcosmos.



## 6.5 Análisis Físico-químico del suelo tratado con emulsión asfáltica aniónica

### 6.5.1 Efecto sobre la agregación del suelo

Uno de los objetivos específicos fue establecer el efecto de la emulsión asfáltica sobre la agregación, a través de la estimación del porcentaje de agregados estables al agua (% AEA) en el suelo tratado con emulsión asfáltica, a través de la técnica del tamizado en húmedo el cual permitió determinar el porcentaje de agregados de acuerdo a cuatro tamaños (Cambardella y Elliot, 1993). Estos tamaños fueron: agregados  $>2000 \mu\text{m}$ ; agregados entre  $250$  y  $2000 \mu\text{m}$ ; agregados entre  $53$  y  $250 \mu\text{m}$ ; y finalmente, agregados  $<53 \mu\text{m}$ . La Fig.38 muestra los resultados para el tratamiento 1 (Suelo s/EA) sin emulsión, en función del tiempo, mientras que las Fig.39, 40 y 41, muestran los resultados de los tratamientos denominados: tratamiento 2 (Suelo s/EA (est)); tratamiento 3 (Suelo c/EA) y tratamiento 4 (Suelo c/EA (est)).

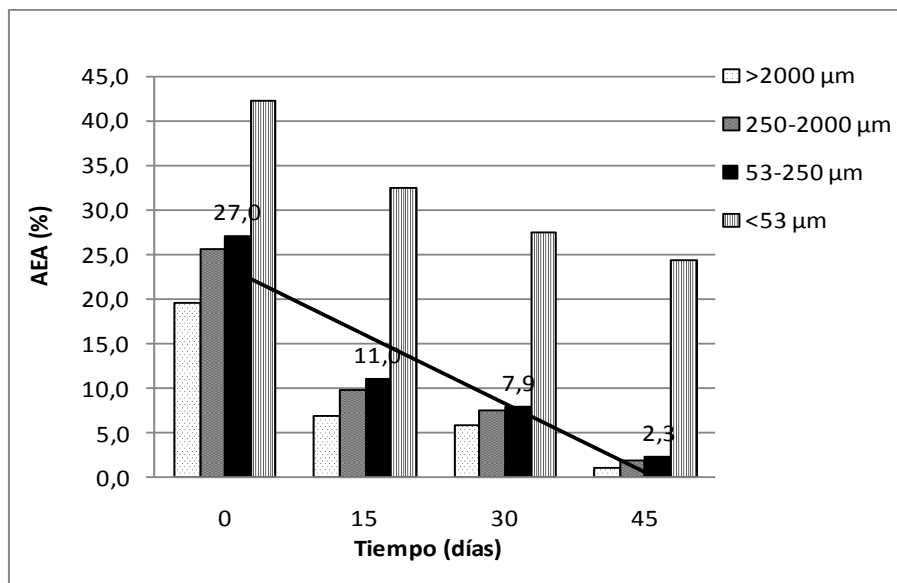


Fig.38. Porcentaje de Agregados Estables al Agua (AEA). Tratamiento control (Suelo s/EA)

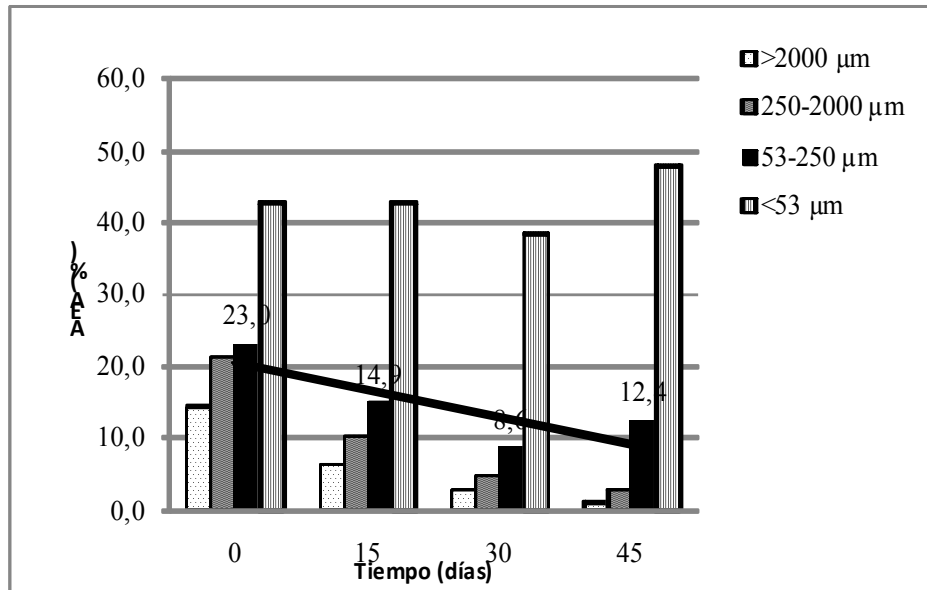


Fig.39. Porcentaje Agregados Estables al Agua (AEA). Tratamiento 2 (Suelo s/EA(est))

La Fig. 39 muestra el porcentaje de AEA para el suelo con el tratamiento 2 (Suelo s/EA (est)).

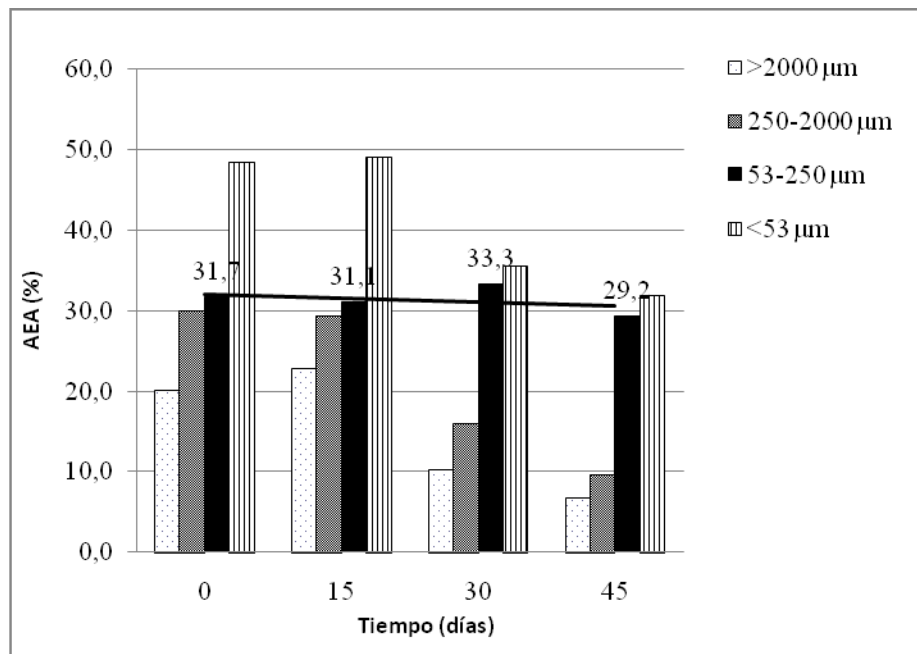


Fig.40. Porcentaje de Agregados Estables al Agua (AEA). Tratamiento 3 (Suelo c/EA)

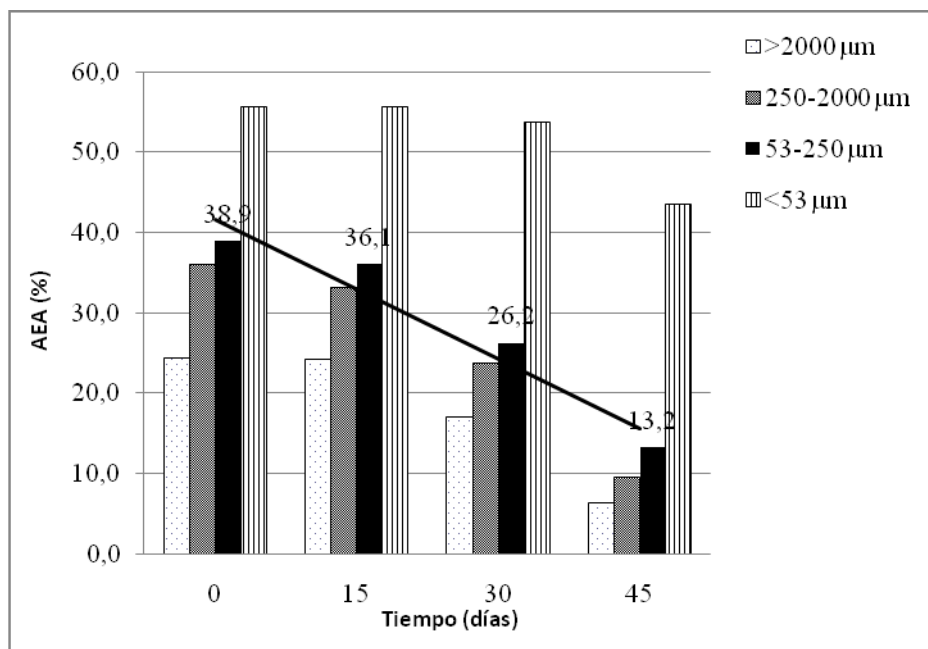


Fig.41. Porcentaje de Agregados Estables al Agua (AEA). Tratamiento 4 (Suelo c/EA(est)).

Las Fig. 40 y 41, muestran los porcentajes de AEA del suelo perteneciente al tratamiento 3 y 4 respectivamente. El tratamiento 3 correspondió al suelo tratado con emulsión asfáltica aniónica al 0,3 % p/p, mientras que el tratamiento 4 consistió de suelo tratado de igual forma e inicialmente estéril.

Los AEA se definieron en cuatro tamaños, según la técnica del tamizado húmedo. Estos tamaños a su vez definieron las siguientes clases de agregados: i) agregados >2000 μm se denominaron macroagregados grandes; ii) agregados entre 2000- 250μm se denominaron macroagregados pequeños; iii) agregados entre 250-53μm se denominaron microagregados, y iv) agregados <53μm, unidades formadas por partículas de arcillas y limos combinadas (Cambardella y Elliot, 1993). La tabla 19 resume los resultados del porcentaje de AEA en todos los tiempos y tratamientos.

Tabla 19. Efecto de la emulsión asfáltica aniónica sobre el porcentaje de agregados estables al agua (% AEA)

| Tratamiento                      | Tiempo (días) | Tamaño agregados    |                        |                      |                   |
|----------------------------------|---------------|---------------------|------------------------|----------------------|-------------------|
|                                  |               | >2000 $\mu\text{m}$ | 250-2000 $\mu\text{m}$ | 53-250 $\mu\text{m}$ | <53 $\mu\text{m}$ |
|                                  |               | (%)                 |                        |                      |                   |
| <b>Suelo s/EA*</b>               | <b>0</b>      | 19,44a              | 25,522a                | 26,97a               | 42,26a            |
|                                  | <b>15</b>     | 6,93a               | 9,71a                  | 10,95a               | 32,37a            |
|                                  | <b>30</b>     | 5,75b               | 7,41b                  | 7,87b                | 27,40b            |
|                                  | <b>45</b>     | 1,09c               | 1,96c                  | 2,28c                | 24,25c            |
| <b>Suelo s/EA<sub>est</sub></b>  | <b>0</b>      | 14,39a              | 21,34a                 | 22,98a               | 42,84a            |
|                                  | <b>15</b>     | 6,33a               | 10,28a                 | 14,94a               | 42,68a            |
|                                  | <b>30</b>     | 2,75b               | 4,83b                  | 8,55b                | 38,47b            |
|                                  | <b>45</b>     | 1,06c               | 2,83c                  | 12,36c               | 47,90c            |
| <b>Suelo c/EA*</b>               | <b>0</b>      | 20,14a              | 29,98a                 | 31,65a               | 48,54a            |
|                                  | <b>15</b>     | 22,81a              | 29,34a                 | 31,09a               | 49,06a            |
|                                  | <b>30</b>     | 10,28b              | 16,08b                 | 33,33b               | 35,62b            |
|                                  | <b>45</b>     | 6,84c               | 9,72c                  | 29,24c               | 31,99c            |
| <b>Suelo c/EA<sub>est</sub>*</b> | <b>0</b>      | 24,39a              | 36,06a                 | 38,88a               | 55,59a            |
|                                  | <b>15</b>     | 24,13a              | 33,14a                 | 36,08a               | 55,57a            |
|                                  | <b>30</b>     | 17,04b              | 23,67b                 | 26,21b               | 53,65b            |
|                                  | <b>45</b>     | 6,29c               | 9,43c                  | 13,22c               | 43,44c            |

Entre un mismo tratamiento, valores con la misma letra minúscula, no guardan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ); (\*) representa diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) (ver Anexo 1)

Los agregados <53  $\mu\text{m}$ , unidades formadas por la unión de limos y arcillas, tuvieron significativamente mayores porcentajes, respecto al control, en todos los tratamientos. Le siguieron los agregados entre 250 y 53  $\mu\text{m}$  (microagregados), como el segundo grupo de mayor abundancia en todos los tratamientos. Cabe destacar, que para efectos de este estudio, los agregados entre 250-53  $\mu\text{m}$  (microagregados), cobran mayor importancia, ya que son las estructuras fundamentales que propician junto a la materia orgánica y los microorganismos, la formación de agregados de mayor tamaño, proporcionando un mejor balance estructural al suelo (Tisdall y Oades, 1982). Los microagregados, disminuyeron a medida que transcurrió el tiempo, en todos los tratamientos. Sin embargo, en el tratamiento 3 correspondiente al suelo tratado con emulsión aniónica al 0,3%, la disminución fue significativamente menor comparado con el suelo control (ver tabla 19), lo que sugiere que la emulsión tuvo un efecto adhesivo sobre el suelo, al

actuar como agente de unión entre las partículas y disminuir la disgregación del suelo en el tiempo (ver Fig. 40).

Estos datos concuerdan por lo reportado por Jiuzhi y Bongtong (1985) quienes registraron un incremento en la abundancia de microagregados de 4.86 %, a 6.85 %, a 23.72 % y a 37.67 %, con la aplicación de emulsiones asfálticas al 0.1 %, 0.2 % y al 1 %, respectivamente. El efecto estructurador de la emulsión sobre partículas del suelo es discutido por Salem y col. (1985), quien obtuvo un incremento significativo con el uso de emulsiones asfálticas en el porcentaje de agregación en suelos arenosos, de 47 % a 67 % y señala que la emulsión actúa como una agente enlazante entre las partículas del suelo, promoviendo la agregación y la repelencia del agua, lo que impide la pérdida de materiales orgánicos promotores de agregados en el suelo.

### **6.5.2 Efecto sobre Carbono Orgánico**

El análisis se realizó sólo en los microagregados, los cuáles fueron extraídos de submuestras de los microcosmos, a través del tamizado en seco, en una batería de tamices.

La Fig. 42 muestra los valores promedios de carbono orgánico en todos los tratamientos, para cada tiempo. El tratamiento 4, correspondiente al suelo tratado con emulsión aniónica e inicialmente esterilizado, registró un incremento de 9,08 % a los 0 días hasta un 14,04 % a los 30 días de experimento, siendo este el valor máximo entre todos los datos registrados.

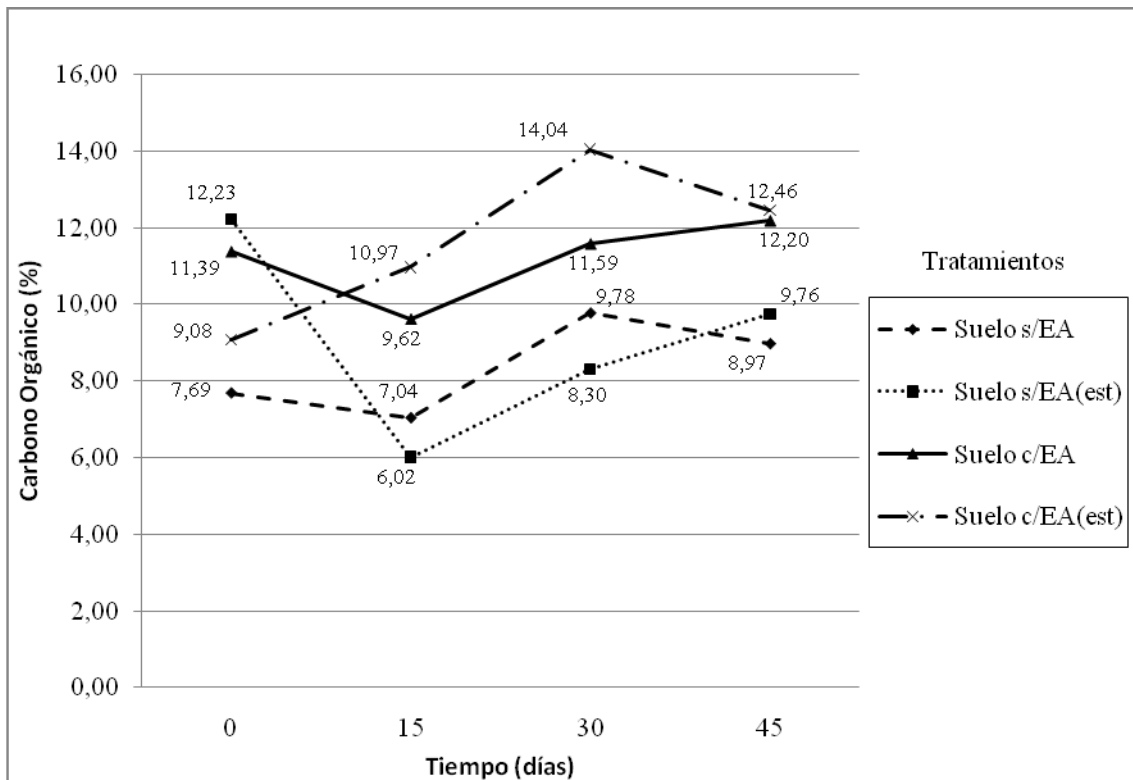


Fig.42. Efecto de emulsión asfáltica aniónica sobre el % de Carbono Orgánico en microagregados de suelo de sabana en cada tiempo de muestreo.

El tratamiento 3 correspondiente al suelo tratado sólo con emulsión anionica, presentó la misma tendencia, pues al inicio se registró 11,39 % de carbono orgánico, y hacia el final del ensayo, se obtuvo un 12,20 %, destacando el hecho de que los suelos tratados con emulsión, tuvieron valores más elevados de carbono orgánico que aquellos no tratados. Sin embargo, un ANOVA de dos vías señaló que las medias no tuvieron variaciones significativas debido a los factores “tratamiento” y “tiempo”, al comparar todos los tiempos, mientras que, al comparar las medias dentro de un mismo tiempo, si surgieron variaciones significativas, como se señala en la Fig. 42.

Cambardella y Elliot (1993), señalan que la cantidad de Carbono Orgánico, en un tamaño de partícula dado, viene dada por cuan agregado sea el suelo como un todo y de la concentración de carbono del suelo. Esto se relaciona con el origen y condición del suelo. Estos suelos

originalmente tienen poco contenido de materia orgánica además de una elevada presencia de arenas como parte de su matriz estructural, lo que hace que la materia orgánica y por ende, el carbono orgánico, sea rápidamente mineralizado (Cambardella y Elliot, 1993). En este estudio no se determinó el porcentaje de carbono orgánico en otros tamaños de agregados, sin embargo, Elliot (1986) determinó que los microagregados tienen menos carbono orgánico, entre otros nutrientes, que los macroagregados. Por otro lado, Nelson y Sommers (1996) señalan que la medición del carbono orgánico a través de ensayos basados en la oxidación por dicromato recupera proporciones variables de carbono elemental y en algunas oportunidades, carbono orgánico contenido en el humus, por lo tanto, la técnica puede arrojar variaciones en la determinación de carbono orgánico contenido en agregados < 2 mm.

Adicionalmente, Alef y Nannipieri (1995) sostienen que la esterilización del suelo por calor húmedo, puede causar daño significativo a la estructura del suelo y además, la liberación de altas concentraciones de sustancias orgánicas. Esto pudiera explicar el incremento de carbono orgánico entre los 0 días y 30 días, para el tratamiento 4, correspondiente al suelo tratado con emulsión inicialmente esterilizado.

Por su parte, la emulsión asfáltica aniónica utilizada en este estudio tuvo un 91,43% de material orgánico, la cual se distribuyó en: 16,97 % de saturados; 34% de aromáticos; 40,40% de resinas y 8,63% de asfaltenos, junto a un 23,5 % de agua p/v. Sin embargo, el análisis estadístico señaló, que a pesar de existir variaciones en el porcentaje de carbono orgánico en microagregados, estas no fueron significativas a un  $p < 0,05$ , al incorporar emulsión asfáltica aniónica al suelo (ver Anexo 2).

### 6.5.3. Efecto sobre el pH del suelo

El suelo se trató con emulsión asfáltica aniónica, y como su nombre lo indica, este compuesto contiene un emulsificante, que es un electrolito de carga negativa (Michaca, 2002). La Fig. 43 muestra el efecto de la emulsión asfáltica aniónica sobre el pH en microagregados de muestras tratadas y no tratadas, en el tiempo.

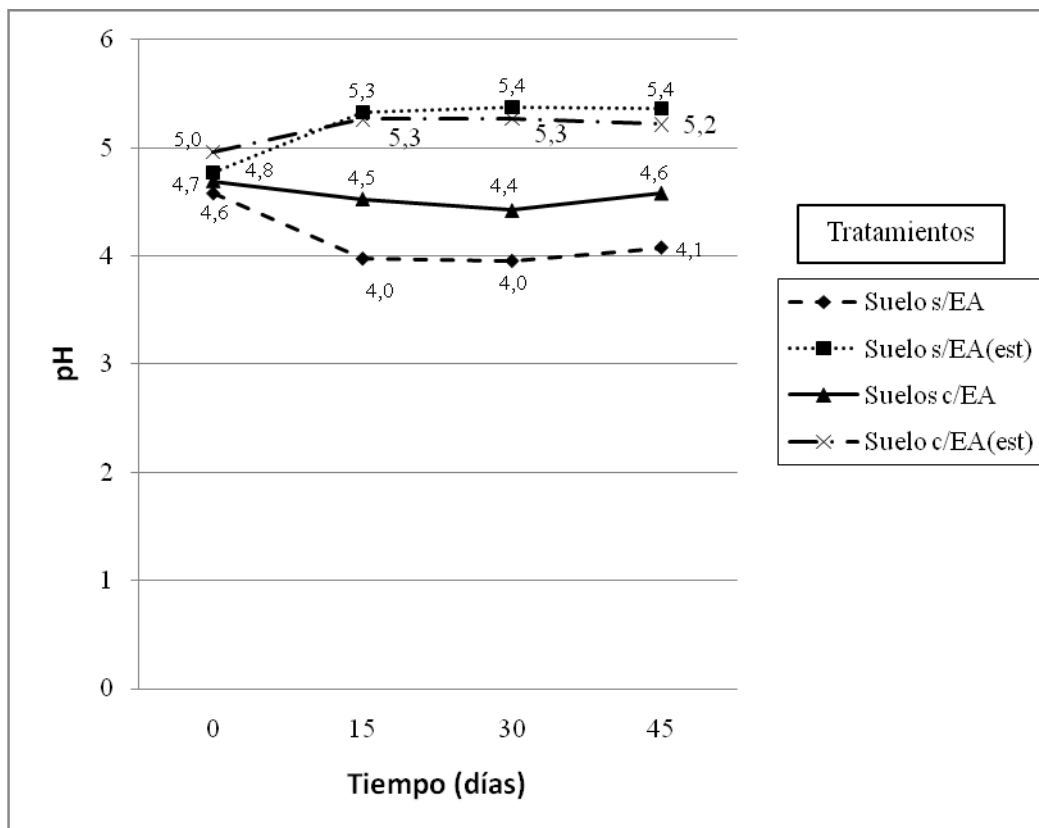


Fig. 43. Efecto de la emulsión asfáltica aniónica sobre el pH en microagregados de un suelo ácido de sabana.

El pH se incrementó en los tratamientos que fueron esterilizados inicialmente, como muestra la Fig. 49. El suelo sin emulsión esterilizado inicialmente, incrementó el pH de 4,77 a los 0 días, hasta 5,36 a los 45 días. De igual manera, el suelo con emulsión esterilizado inicialmente también incrementó el pH de 4,96 hasta 5,22. Contrariamente, el pH disminuyó en los tratamientos que no fueron esterilizados inicialmente, pues en el suelo sin emulsión, disminuyó de 4,58 a 4,08; y el suelo con emulsión, de 4,69 a 4,58. Un ANOVA determinó que sólo el factor “tratamiento”



influyó significativamente en los resultados obtenidos para el pH en los microagregados estudiados (Ver anexo 3)

El efecto de esterilidad inicial no fue evaluado directamente como parámetro físico-químico dentro del experimento, sin embargo, fue una condición utilizada como control microbiológico, más no como control físico-químico. Aún así, tuvo un impacto significativo sobre el pH, a diferencia de otros factores.

La esterilización con vapor húmedo (autoclave), destruye la estructura del suelo y se pueden liberar e incrementar las concentraciones de amonio intercambiable y sustancias orgánicas como aminoácidos (Johnson y Curl, 1972; Alef y Nannipieri, 1995).

#### **6.5.4 Efecto sobre la concentración de fósforo disponible (en solución)**

Se determinó la concentración de fósforo disponible en microagregados (53-250  $\mu\text{m}$ ) de muestras de suelos tratadas con emulsión asfáltica aniónica. La Fig. 44 muestra la variación de la concentración de fósforo en función del tiempo.

Todos los tratamientos, a excepción del tratamiento 4 (Suelo c/EA (est)), incrementaron la concentración de fósforo en solución hacia el final del experimento. El tratamiento 3 (Suelo c/EA) registró 55,30  $\mu\text{g.g}^{-1}$  suelo seco a los 45 días, siendo éste el valor máximo alcanzado entre todos los tratamientos. Por el contrario, el tratamiento 4, varió de 40,30  $\mu\text{g.g}^{-1}$  suelo seco en 0 días, a 38,12  $\mu\text{g.g}^{-1}$  suelo seco a los 45 días de incubación. Estas variaciones no fueron estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) como se puede ver en el anexo 4.

Al inicio, el tratamiento 3 registró el mínimo valor alcanzado en la determinación ( $38,58 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suelo seco), comparado con el tratamiento control (tratamiento 1=  $41,64 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suelo seco).

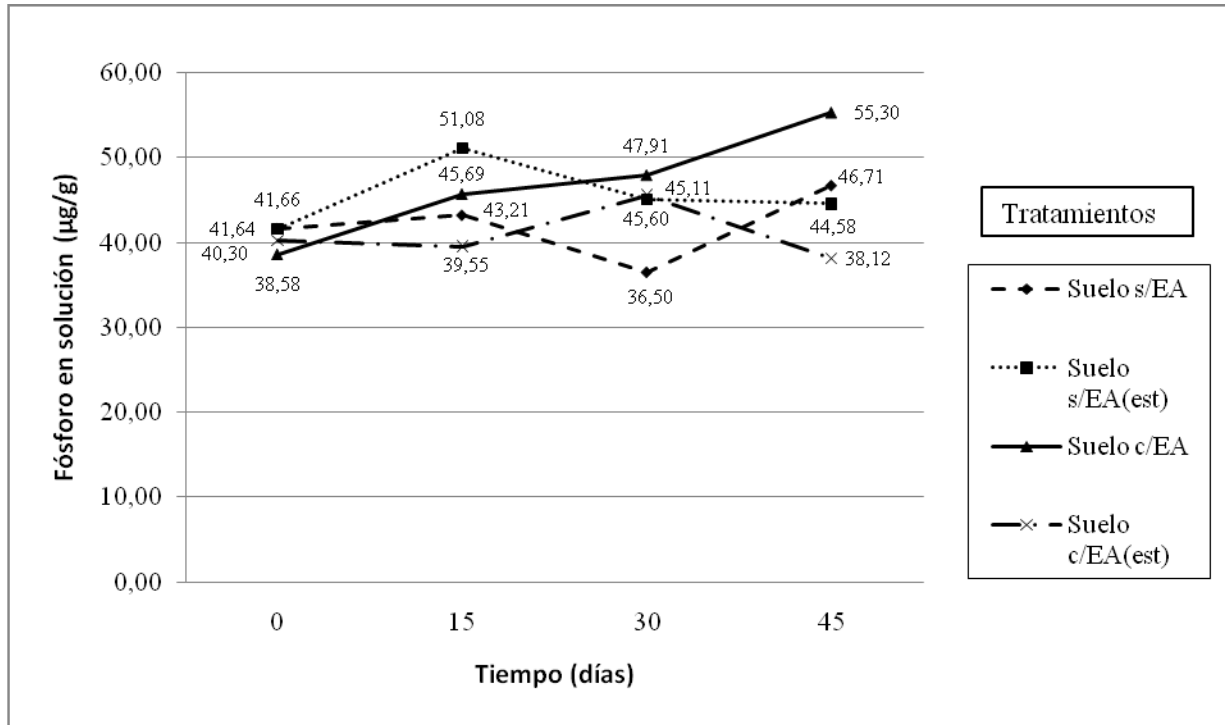


Fig.44. Efecto de la emulsión asfáltica aniónica sobre la concentración de fósforo en solución en microagregados de un suelo ácido de sabana incubado durante 45 días en vivero

La dinámica de nutrientes en suelos tratados con emulsiones asfálticas tales como el fósforo, carbono y nitrógeno, ha sido discutida escasamente en la literatura. Salem *et al* (1985), encontraron que las emulsiones asfálticas ayudan a la formación de agregados que protegen elementos extraíbles por acción del lavado, donde la emulsión actúa como barrera frente a la acción del agua en agregados no destruidos. Bajo este principio, los resultados obtenidos coinciden con lo reportado por Salem y col. (1985). Por lo tanto, podemos decir que en el tratamiento 3, al transcurrir el tiempo, la acción adhesiva de la emulsión se acentuó, promoviendo la formación y estabilización de los microagregados (ver Fig.40; Tabla 19) mientras a su vez, por procesos de retención, se incrementó la carga de nutrientes hacia tiempos más prolongados.

### 6.5.5 Efecto sobre el Nitrógeno Total (Nt)

Se evaluó la cantidad de nitrógeno total a través del método de Kjeldahl (Hesse, 1971) en microagregados en todos los tratamientos, cada 15 días durante 45 días totales de experimento (Fig. 45).

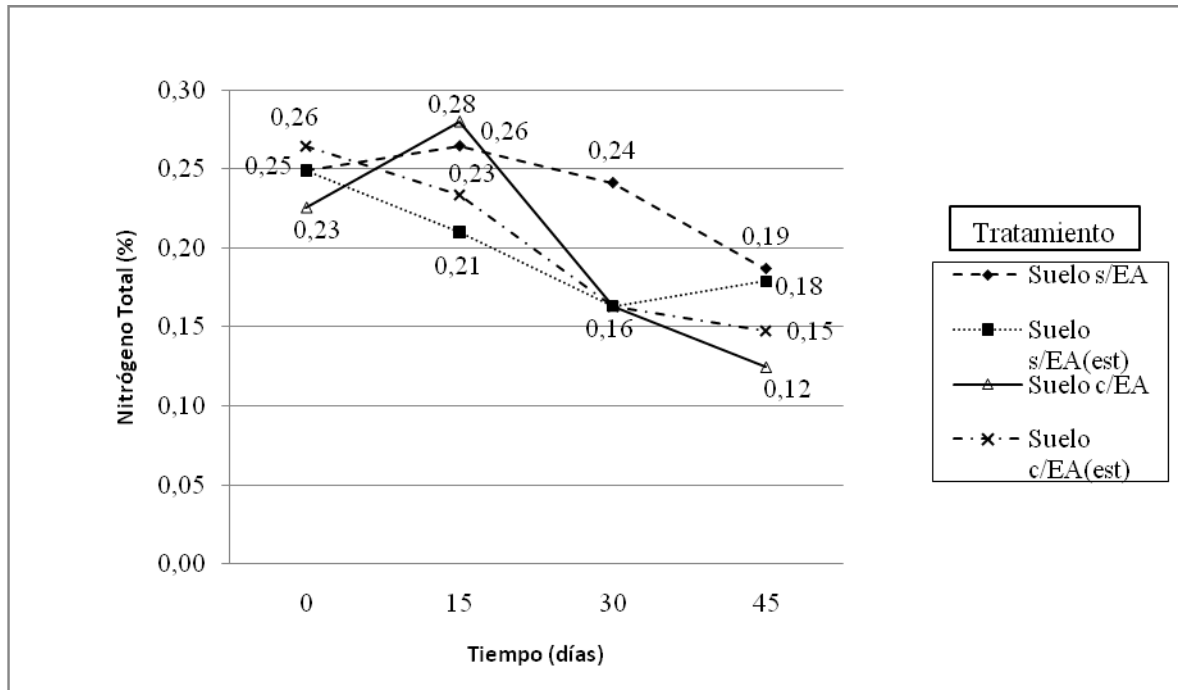


Fig. 45. Efecto de la emulsión asfáltica aniónica (EA) sobre el Nitrógeno Total (%) en microagregados de un suelo ácido de sabana; s/EA: sin emulsión; c/EA: con emulsión.

El porcentaje de nitrógeno total (% Nt) disminuyó significativamente ( $p > 0,05$ ) (ver anexo 5) al transcurrir el tiempo en todos los tratamientos. Al comparar los promedios obtenidos en cada lapso de tiempo, la mayor variación se observó a los 30 días de experimento, con una diferencia de 0,08% entre el tratamiento control (Tratamiento 1) y el resto de tratamientos (Tratamientos 2, 3 y 4). Las variaciones en los demás tiempos, fueron menos pronunciadas, y hacia tiempos más prolongados (30 y 45 días), el nitrógeno total fue mayor en el tratamiento control que en el resto de tratamientos. Al comparar el comportamiento del nitrógeno total con otros nutrientes

evaluados, tal como el carbono y el fósforo, observamos que el nitrógeno disminuye de forma clara, mientras que aquellos aumentan, de manera general, en el tiempo.

Six y col. (2002) reportaron que el carbono asociado con los macroagregados ( $>250 \mu\text{m}$ ) tiene en promedio, un menor tiempo de residencia que el carbono asociado a microagregados ( $<250 \mu\text{m}$ ), ya que los últimos ofrecen una mayor protección física, no solo al carbono, sino también al nitrógeno, de la mineralización y del ataque microbiano (Hassink *et al*, 1992). Sin embargo, estudios hechos por Six y col. (2002) sobre agregados destruidos y no destruidos, y las conclusiones hechas por Balesdent y col. (2000), hacen notar que la mineralización del nitrógeno es mayor que la del carbono inclusive para un mismo tamaño de agregado.

Adicionalmente, la estabilización del carbono y nitrógeno dentro de los agregados, está relacionado parcialmente con la baja concentración de oxígeno en el centro de los micro y macroagregados, generando condiciones anaeróbicas que promueven el incremento de la tasa de desnitrificación y la consecuente pérdida de nitrógeno gaseoso (Hojberg y Revsbech, 1994).

### 6.5.6 Efecto sobre la Actividad Deshidrogenasa (ADH)

Se evaluó el efecto de la emulsión asfáltica sobre la actividad metabólica de la comunidad microbiana, específicamente a través de la actividad deshidrogenasa, presente en microagregados de suelos tratados y no tratados en microcosmos. La Fig. 46 muestra los valores registrados de ADH en cada tratamiento durante todos los tiempos de experimentación.

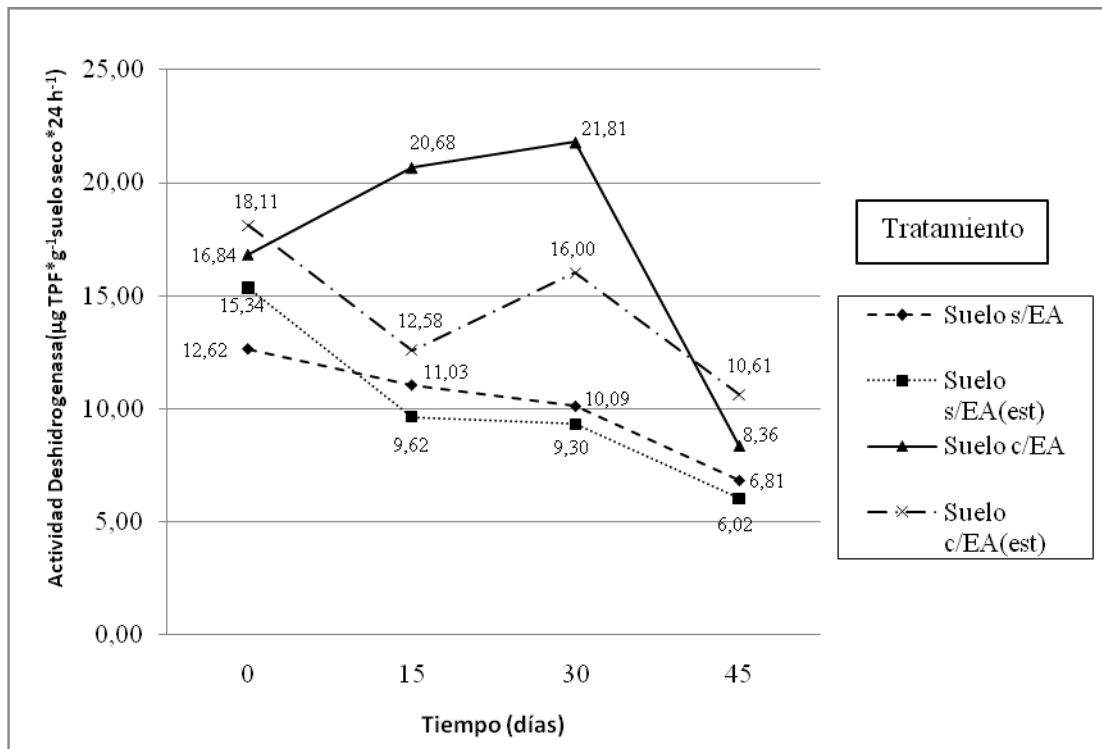


Fig. 46. Efecto de emulsión asfáltica aniónica sobre la actividad deshidrogenasa en microagregados de un suelo ácido de sabana.

Como se puede observar en la Fig. 46, la ADH en el tratamiento control disminuyó de 12,62 ( $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suelo seco} \cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 0 días, hasta 6,81 ( $\mu\text{g TPF} \cdot \text{g}^{-1} \text{ suelo seco} \cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 45 días, representando una variación negativa cercana al 50%. De igual manera, los suelos con y sin emulsión que fueron esterilizados inicialmente (tratamiento 2 y 4, respectivamente), mostraron la

misma tendencia que el tratamiento control, pues la ADH disminuyó al transcurrir el tiempo de incubación de las muestras.

Contrariamente, el suelo tratado con emulsión aniónica fue el único tratamiento que registró un incremento de la ADH, de 16,84 ( $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$  suelo seco $\cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 0 días, hasta 21,81 ( $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$  suelo seco $\cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 30 días, con una variación positiva de 22,79%, para luego disminuir marcadamente hasta 8,36 ( $\mu\text{g TPF}\cdot\text{g}^{-1}$  suelo seco $\cdot 24\text{h}^{-1}$ ) a los 45 días de incubación. Los datos analizados a través de un ANOVA de dos vías, mostraron que existen diferencias significativas ( $p < 0,05$ ;  $n=9$ ) entre los diferentes tratamientos.

Las enzimas deshidrogenasas pertenecen a las clases de las oxidoreductasas, enzimas intracelulares que catalizan las reacciones de oxido-reducción tan importantes en las rutas respiratorias y fermentativas de las células, y pueden encontrarse en el suelo fuera de las células (Fuhrmann, 1998). Por otro lado, se ha demostrado que la adición de compuestos orgánicos al suelo incrementa la ADH, al menos que contengan sustancias tóxicas o las dosis se encuentren en concentraciones inhibitorias (Acosta y Paolini, 2005).

El suelo tratado con emulsión asfáltica incrementó la ADH a diferencia de otros tratamientos, donde la ADH disminuyó notoriamente, pues la esterilización inicial aplicada a los tratamientos que lo requerían, y la no aplicación de emulsión en el tratamiento control, fueron determinantes en la evolución de la ADH en el transcurso del tiempo. Aunque no se tienen registros del comportamiento de la ADH en suelos tropicales tratados con emulsiones asfálticas, Acosta y Paolini (2005), sugieren que la ADH es un buen indicador de la actividad microbológica de un suelo en presencia de diversos materiales y compuestos de origen orgánicos, y aun, en presencia de metales y compuestos tóxicos por su sensibilidad. Adicionalmente, Acosta-Martínez *et al* (2006), sugiere que las enzimas del suelo, entre ellas, las oxidoreductasas, están implicadas

directamente en los procesos bioquímicos y pueden indicar el potencial degradativo del componente microbiano en un suelo.

Sin embargo, Casida (1977) advirtió que la técnica para evaluar la ADH puede sufrir muchas variaciones, y los resultados pueden ser interpretados de muchas maneras por los diferentes investigadores, entre los que destaca Skujins (1976) quien de forma resumida, considera que las siguientes alteraciones que la técnica puede sufrir: alteraciones en el sistema buffer del suelo y los valores de pH, cantidad de TTC usado, períodos de incubación y la cantidad y calidad de la enmienda utilizada en el suelo, entre otras, han llevado a que no haya uniformidad de opiniones acerca de cual componente del suelo contribuye a la respuesta de la ADH (Casida, 1977).

## **6.6 Análisis microbiológico del suelo tratado con emulsión asfáltica aniónica**

### **6.6.1 Efecto sobre la densidad bacteriana**

La densidad bacteriana se determinó a través de dos métodos: primero, por el método de siembra en placa en superficie o rastrilleo, y segundo, por el método de siembra en placa fundida o inclusión. La diferencia se basa en que las bacterias pueden crecer con una máxima condición aeróbica en el primero, mientras que en el segundo, se desarrollan sólo las bacterias que soportan condiciones aeróbicas mínimas.

La tabla 19 muestra los valores transformados en logaritmos base 10 de las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

Tabla 20. Densidad de bacterias en microagregados en suelos tratados con emulsión asfálticas.

| Tratamiento     | Método Siembra en Placa | Tiempo (días)                  |        |        |        |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|--------|--------|--------|
|                 |                         | 0                              | 15     | 30     | 45     |
|                 |                         | <u>Log10(UFC/g suelo seco)</u> |        |        |        |
| Suelo s/EA      | Superficie              | 12,02a                         | 12,58a | 12,10a | 13,26a |
|                 | Inclusión               | 10,11b                         | inc    | 11,71b | 12,37b |
| Suelo s/EA(est) | Superficie              | 11,70a                         | 12,10a | 13,03a | 13,46a |
|                 | Inclusión               | 11,88b                         | 9,96b  | 9,21b  | inc    |
| Suelo c/EA      | Superficie              | 11,96a                         | 13,34a | 13,17a | inc    |
|                 | Inclusión               | 9,88b                          | 11,90b | 12,13b | inc    |
| Suelo c/EA(est) | Superficie              | 11,92a                         | 9,57a  | 13,06a | 13,28b |
|                 | Inclusión               | 11,03b                         | 12,26b | 10,01b | inc    |

s/EA: sin emulsión asfáltica; c/EA: con emulsión asfáltica; (est): esterilidad; *inc*: incontables; Letras minúsculas diferentes en un mismo tiempo, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

La densidad de bacterias contadas de manera individual, a través de los métodos de superficie e inclusión, mostraron cambios no significativos ( $p < 0,05$ ), entre los microagregados del suelo control y los microagregados del suelo tratado con emulsión aniónica, para los distintos tiempos comparados (ver anexo 7). Sin embargo, al comparar los títulos obtenidos entre ambos métodos de siembra, los análisis estadísticos indicaron diferencias significativas, por efecto del método utilizado.

Cambios no significativos en la densidad bacteriana en suelos tratados con emulsión asfáltica, fueron reportados por Voets y col. (1973), quienes aplicaron emulsiones para combatir el severo deterioro de la estructura de un suelo cultivado en Bélgica. Sus observaciones indicaron que a corto y largo plazo, la emulsión no produjo cambios “dramáticos”, si bien, a altas dosis, se registró una inhibición en las poblaciones desnitrificadoras y amonificadoras del suelo, mientras que todas las otras poblaciones microbianas, tuvieron un impacto neutral o positivo, en algunos casos.



Por otro lado, existen diferencias claras en los métodos utilizados para los conteos bacterianos. El método de siembra en superficie ofrece una mayor exposición aeróbica que la siembra por inclusión. Sin embargo, no existe una manera única y completamente eficaz para aislar y contar microorganismos de muestras de suelos, pues las bacterias crecerán dependiendo de la presencia, la cantidad y calidad de nutrientes que contengan los medios de crecimiento o aislamiento (Sylvia y col, 1998). Es por esto, que la densidad de bacterias es generalmente subestimada ya que sólo cerca del 1% de todo el universo microbiano, se puede aislar a través del método en siembra en placa (Atlas y Bartha, 2002)

Las células aerobias estrictas no pueden crecer en inclusión, mientras que los anaerobios estrictos no lo harán en superficie. Las células facultativas pueden crecer adaptando su metabolismo a condiciones carentes de oxígeno (Sylvia y col, 1998).

El título se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Título microbiano} = \frac{\text{recuentos de colonias (promedio)} \times 1/\text{dilución} \times (25 \text{ g}/250 \text{ ml})}{\text{Volumen de siembra (ml)}}$$

### 6.6.2 Efecto sobre la densidad de hongos

La densidad de hongos en microagregados se determinó a través de métodos similares a los utilizados para el conteo de bacterias, aunque a diferencia de éstas, los hongos son organismos eucariotas mientras que las bacterias son procariotas, que presentan, estructuras semejantes a las plantas y animales, con algunas diferencias importantes (Sylvia y col, 1998).

La tabla 21 muestra los resultados de la densidad de hongos determinados en microagregados de suelos tratados con emulsión asfáltica y los tiempos evaluados.

Tabla 21. Densidad de hongos en microagregados de suelos tratados con emulsión asfáltica aniónica al 0,3% p/p

| Tratamiento     | Método Siembra en Placa | Tiempo (días)                  |       |       |       |
|-----------------|-------------------------|--------------------------------|-------|-------|-------|
|                 |                         | 0                              | 15    | 30    | 45    |
|                 |                         | <b>Log10(UFC/g suelo seco)</b> |       |       |       |
| Suelo s/EA      | Superficie              | 9,14a                          | 8,08a | 9,22a | 7,97a |
|                 | Inclusión               | 8,14b                          | 7,25b | 7,97b | 7,00b |
| Suelo s/EA(est) | Superficie              | 9,00a                          | 9,11a | 9,15a | 9,26a |
|                 | Inclusión               | 8,17b                          | 8,33b | 8,21b | 7,96b |
| Suelo c/EA      | Superficie              | 8,08a                          | 9,07a | 9,12a | 7,17a |
|                 | Inclusión               | 8,19b                          | 7,12b | 7,42b | 7,24b |
| Suelo c/EA(est) | Superficie              | 9,26a                          | 9,09a | 9,16a | 8,07a |
|                 | Inclusión               | 7,24b                          | inc   | 7,25b | 8,05b |

s/EA: sin emulsión asfáltica; c/EA: con emulsión asfáltica; (est): esterilidad; *inc*: incontables; Letras minúsculas diferentes en un mismo tiempo, indican diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

Los densidad fúngica se expresó también como el logaritmo base 10 de las unidades formadoras de colonia por gramo de suelo seco, al igual que en las bacterias.

A través del método de siembra en superficie, se obtuvo una mayor abundancia de hongos, comparada con el método de siembra por inclusión, en casi todos los tratamientos y tiempos evaluados.

La densidad fúngica en los tratamientos con emulsión asfáltica, se incrementó en algunos casos, mientras que en otros, disminuyó, respecto al control. Sin embargo, la densidad fúngica disminuyó en todos los tratamientos hacia los 45 días de experimento.

Los análisis estadísticos mostraron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) solamente debidas al factor método de siembra, pues ni la emulsión asfáltica ni el tiempo de incubación de los microcosmos, tuvieron efectos sobre la varianza de las muestras (ver anexo 8). Este resultado es similar al obtenido en la densidad bacteriana en el apartado anterior.

Estos datos coinciden, con los resultados obtenidos por Voets y col (1973). Como se discutió en el apartado anterior sobre las bacterias, de esta misma forma, los autores encontraron que los

hongos incrementaron en algunos casos, la densidad en tratamientos con emulsiones bituminosas, de 4,87 a 5,11<sup>5</sup> como efecto a largo plazo de la aplicación de emulsiones al suelo cultivado.

Los hongos presentan diferencias importantes con las bacterias, pues su desarrollo depende del aporte de oxígeno ya que en su mayoría, son organismos aerobios estrictos, multicelulares con cuerpos vegetativos filamentosos (hifas) que utilizan para crecer y producir esporas con lo cual logran reproducirse y tienden a ser más abundantes en suelos ácidos, evitando competir con las bacterias (Sylvia y col, 1998; Madigan y col, 2005). Adicionalmente, se ha reportado que son los hongos los principales organismos que actúan en la descomposición de la materia orgánica, principalmente de materiales ricos en compuestos carbonados complejos, como la lignina y la celulosa y casi cualquier otro compuesto xenobiótico<sup>6</sup> (Madigan y col, 2005).

---

<sup>5</sup> Unidades expresadas en Log<sub>10</sub>(UFC/g suelo seco)

<sup>6</sup> **Xenobiótico**: producto totalmente sintético que no se produce en la naturaleza, p. e, pesticidas, emulsiones asfálticas, agroquímicos, etc.(Madigan *et al*, 2005).

### 6.6.3 Caracterización Macromorfológica de la comunidad microbiana asociada a microagregados

La caracterización macromorfológica de bacterias y hongos aislados de microagregados se basó en la descripción cualitativa de las principales características fenotípicas exhibidas por los microorganismos disimiles a simple vista, que crecieron en los diferentes medios utilizados. A continuación, la tabla 22 resume las principales características exhibidas por los microorganismos asociados a los microagregados.

Tabla 22. Principales características fenotípicas exhibidas por las bacterias y hongos aislados de microagregados.

| Organismo | Caracteres Macromorfológicos de las colonias bacterianas |                             |                  |                   |                     |                  |                    |
|-----------|--|-----------------------------|------------------|-------------------|---------------------|------------------|--------------------|
|           | Forma  | Tamaño                      | Superficie       | Color             | Textura             | Borde            | Elevación          |
| Bacterias | <i>Circular</i>  | <i>Grandes (&gt;10 mm)</i>  | <i>Lisas</i>     | <i>Amarillo</i>   | <i>Creмоса</i>      | <i>Entero</i>    | <i>Planas</i>      |
|           | <i>Ameboide</i>  | <i>Mediano (5 mm)</i>       | <i>Porosas</i>   | <i>Blanco</i>     | <i>Rugosa</i>       | <i>lobulado</i>  | <i>Cóncavas</i>    |
|           | <i>Irregulares</i>                                       | <i>Pequeñas (&lt;5 mm)</i>  | <i>Estriadas</i> | <i>Traslucido</i> |                     | <i>Crenado</i>   |                    |
| Hongos    | <i>Circular</i>  | <i>Grandes (&gt;15 mm)</i>  | <i>Rugosas</i>   | <i>Blanco</i>     | <i>Porosas</i>      | <i>Entero</i>    | <i>Planas</i>      |
|           | <i>Irregular</i>   | <i>Medianas (10 mm)</i>     | <i>Estriadas</i> | <i>Beige</i>      | <i>Algodonosas</i>  | <i>Rizoide</i>   | <i>Proyectadas</i> |
|           | <i>Rizoide</i>   | <i>Pequeñas (&lt;10 mm)</i> | <i>Opacas</i>    | <i>Amarillo</i>   | <i>Esponjosas</i>   | <i>Irregular</i> | <i>Elevadas</i>    |
|           |  |                             |                  | <i>Gris</i>       | <i>Pulverulenta</i> | <i>Difuso</i>    |                    |
|           |  |                             |                  | <i>Negro</i>      |                     |                  |                    |
|           |  |                             | <i>Verde</i>     |                   |                     |                  |                    |

Los caracteres resaltados en la tabla 21 corresponden a los rasgos fenotípicos exhibidos por las colonias microbianas de bacterias y hongos, sobre los medios sólidos utilizados para su aislamiento.

Las formas circulares y de textura lisa cremosa, predominaron en los morfotipos bacterianos, en todos los tratamientos involucrados, mientras que las colonias blancas, grises y negras, de tamaño mediano (5 mm) y textura algodonosa y esponjosa, predominaron en los hongos para todos los tratamientos.

Atlas y Bartha (2002) señalan que los métodos de siembra en placa, son económicos y muy versátiles, pues sus condiciones pueden adaptarse con la finalidad de aislar un determinado microorganismo, sin embargo, la principal desventaja radica en que los microorganismos exhibirán sus rasgos fenotípicos dependiendo de las condiciones de crecimiento que ofrezca el medio donde es cultivado. En la Fig. 47 se pueden observar ejemplos de colonias bacterianas crecidas en agar ATS (Trypticase de Soya), mostrando algunos rasgos descritos en la tabla 22.

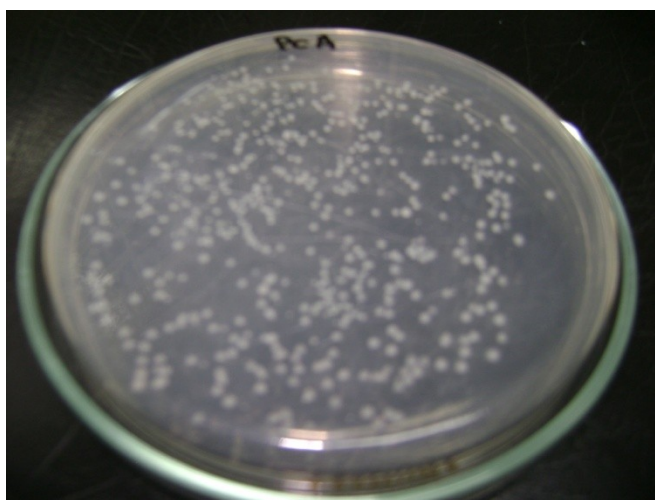


Fig. 47. Colonias bacterianas exhibiendo algunas características fenotípicas sobre una placa de agar sólido.

Algunos medios de cultivo tienen la capacidad de cambiar de color cuando un microorganismo determinado logra crecer en él. Esta capacidad ofrece también algunos rasgos que son utilizados en las caracterizaciones microbianas, pues un microorganismo específico puede cambiar el color del medio donde crece, por ejemplo, los hongos. La Fig. 48 muestra dos ejemplos de hongos crecidos sobre un medio sólido, donde se observan cambios de color del medio.

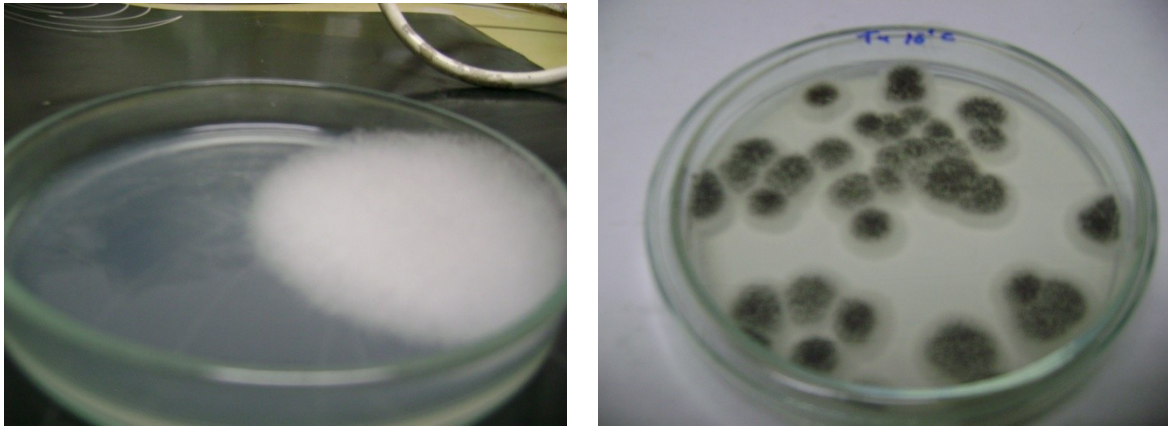


Fig. 48. Colonias fúngicas crecidas sobre medio sólido (Agar Extracto Malta) exhibiendo diferencias fenotípicas

Una vez obtenido los diferentes morfotipos en cada uno de los tiempos, se construyeron los ceparios y se realizó la caracterización micro-morfológica, que consistió en hacer montajes fijos sobre portaobjetos para su observación al microscopio e identificar los principales géneros fúngicos y bacterianos. Para ello, se utilizaron técnicas de montaje fijo de especímenes frescos de hongos sobre portaobjetos o microcultivos, mientras que la Tinción Gram en bacterias y la observación microscópica, en ambos casos, permitieron la caracterización micromorfológica de los microorganismos aislados del suelo.

#### **6.6.4 Caracterización Micro-morfológica de la comunidad microbiana asociada a microagregados**

La caracterización micro-morfológica para bacterias, consistió en aplicar la Tinción Gram a cultivos puros crecidos por 24 horas en viales. Al cabo de 24 horas de crecimiento en Caldo Nutritivo, se hicieron frotis de las suspensiones sobre portaobjetos limpios y secos, luego se tiñeron sumergiendo en colorantes y fijadores cada una de las placas identificadas. En la Fig. 49 se muestran los resultados de la Tinción Gram, con lo cual se clasificaron las bacterias aisladas en cocos, bastones y coco-bastones, Gram (-) o (+).

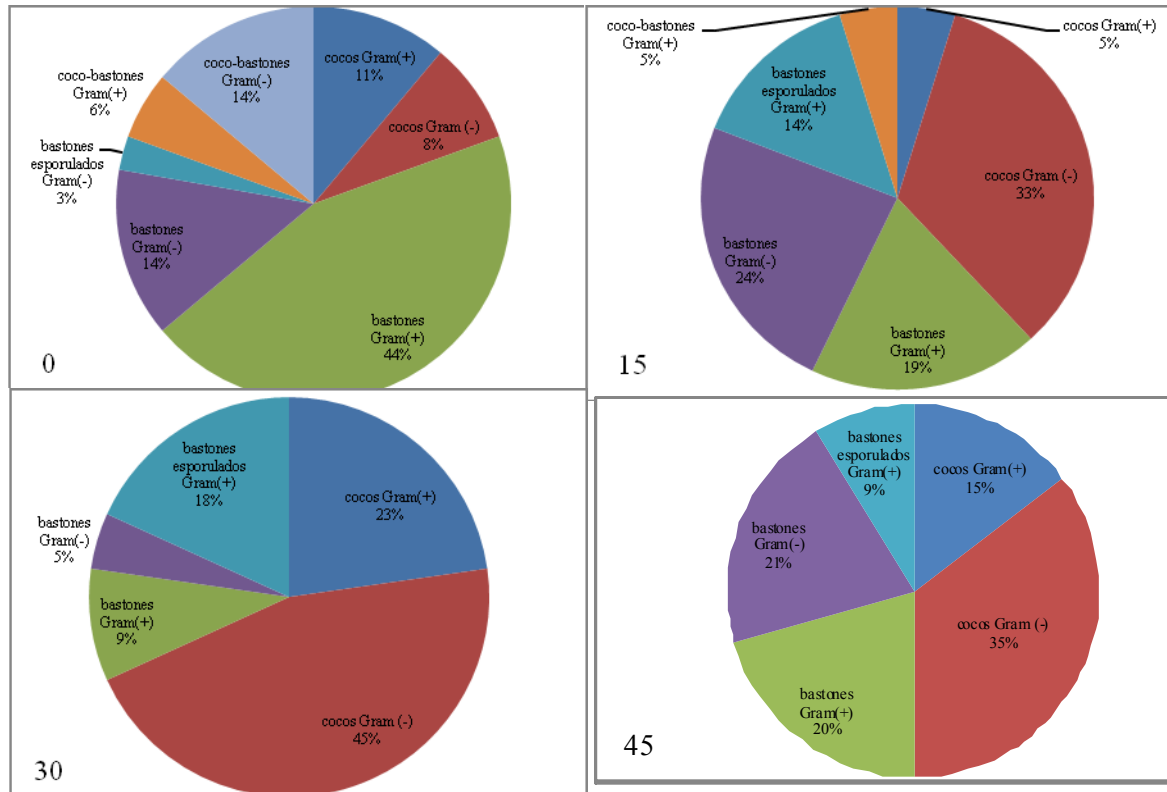


Fig. 49. Caracterización micromorfológica de las bacterias totales en cada uno de los tiempos evaluados.

En primer lugar, las bacterias tipo *cocos* Gram- y los bastones Gram+, fueron los tipos bacterianos más abundantes entre todas las cepas aisladas. En segundo lugar, las bacterias Gram+ de tipo bastón esporulados y los *cocos* Gram+ le siguieron en abundancia. Por último, se detectaron bacterias tipo *coco*-bastones a los 0 días de incubación.

De acuerdo a estos resultados, podemos señalar que las bacterias tipo bastones y las de forma esferoidales o *cocos*, fueron las más abundantes durante todo el tiempo de incubación. No se realizaron análisis estadísticos, pues, sólo se trató de una caracterización cualitativa del tipo de bacterias que predominó en las muestras de suelos, tratadas o no con emulsión asfáltica. Al respecto, Alexander (1977) señala que las bacterias tipo bastones o *bacilos*, son los más numerosos en el suelo, seguido por bacterias tipos esferoidales o *cocos* y bacterias tipo espirales o *espirilos*, que son poco comunes en el suelo. De igual forma, señala la presencia de bacilos

esporulados o que producen endosporas contenidas en el citoplasma celular, que son producidas bajo condiciones ambientales adversas, formando parte del ciclo de vida de la bacteria, ya que ofrecen resistencia a la desecación y altas temperaturas (Fig. 50).

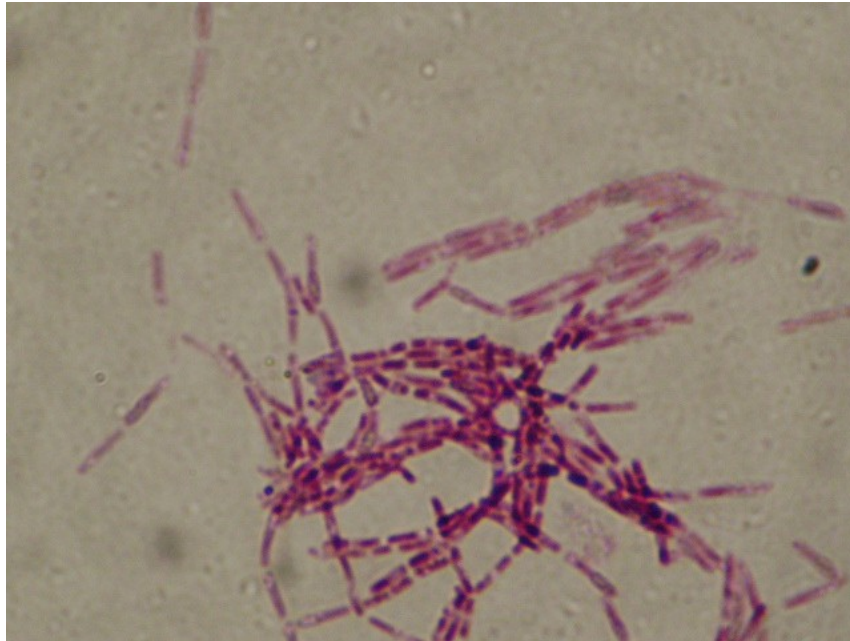


Fig. 50. Fotografía de bacterias tipo bastones formadoras de esporas (esporuladas) Gram (+) tomada bajo el microscopio (objetivo 100x inmersión).

En cuanto a la caracterización micro-morfológica de las cepas fúngicas, ésta se realizó tomando sólo los hongos filamentosos, y de mayor abundancia en cada tiempo. Debido a que el número de hongos aislados no fue suficientemente distinto, se eligieron las cepas que mostraron diferencias morfológicas, y evaluaron todos los hongos sin discriminarlos por tratamientos, solo por tiempo de muestreo, por tanto, estos hongos no necesariamente se encuentran en un tratamiento específico, sino una selección de morfotipos diferentes. La tabla 23, muestran los géneros identificados a partir de las observaciones bajo microscopio de los microcultivos.



Tabla 23. Caracterización micromorfológica de hongos presentes en microagregados de suelos tratados con emulsión asfáltica.

| Caracterización micro-morfológica de géneros fúngicos |                                 |                 |            |                 |
|---|---------------------------------|-----------------|------------|-----------------|
| Géneros   | Tratamientos (N° de individuos) |                 |            |                 |
|   | Suelo s/EA                      | Suelo s/EA(est) | Suelo c/EA | Suelo c/EA(est) |
| <i>Aspergillus</i> sp                                 | 15                              | 23              | 16         | 12              |
| <i>Fusarium</i> sp                                    | 4                               | 0               | 0          | 0               |
| <i>Cladosporium</i> sp                                | 0                               | 0               | 0          | 5               |
| <i>Geotrichum</i> sp                                  | 1                               | 4               | 8          | 8               |
| <i>Monilia</i> sp                                     | 4                               | 0               | 0          | 0               |
| <i>Mucor</i> sp                                       | 4                               | 10              | 33         | 12              |
| <i>Penicillium</i> sp                                 | 9                               | 0               | 8          | 8               |
| <i>Rhizopus</i> sp                                    | 9                               | 9               | 33         | 10              |
| <i>Trichoderma</i> sp                                 | 6                               | 4               | 0          | 0               |

s/EA: sin emulsión asfáltica; c/EA: con emulsión asfáltica; (est): suelo esterilizado al inicio

La Fig. 24 muestra los géneros más comunes encontrados en el suelo (Alexander, 1977). *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Mucor* sp, *Rhizopus* sp y *Geotrichum* sp, fueron los géneros más comunes. Antía (1995) constató que *Aspergillus* sp y *Penicillium* sp son los géneros más comunes encontrados en suelos cultivados y no cultivados, además de *Mucor* sp, mientras que Naranjo *et al* (2007), registraron seis géneros comunes aislados de muestras de suelos contaminados con crudos pesados, entre los que se encontraban *Aspergillus* sp, *Fusarium* sp, *Penicillium* sp, *Trichoderma* sp, relacionadas directamente con la degradación de compuestos hidrocarbonados, similares a las emulsiones utilizadas en este estudio. Por su parte, Alexander (1977) señala que la dominancia de uno u otro grupo fúngico en ambientes naturales depende marcadamente de la cobertura vegetal asociada al suelo. Sin embargo, este mismo autor advierte que *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp y *Mucor* sp suelen ser los géneros más aislados mediante los conteos en placa, debido a que las esporas viajan fácilmente a través del aire, contaminando otros medios, generando nuevas colonias.

### 6.6.5 Caracterización Funcional de la comunidad microbiana asociada a microagregados

Se eligieron de forma aleatoria, por lo menos, 12 cepas diferentes provenientes de ambos ceparios, aisladas en principio de cada tratamiento, debido a que no en todos los casos se obtuvieron suficientes aislamientos distintos entre si. Posteriormente, las cepas bacterianas y fúngicas se sometieron a nueve pruebas bioquímicas. La tabla 4 resume las pruebas bioquímicas aplicadas en este análisis.

La caracterización funcional constó de varias etapas, y la aplicación de pruebas bioquímicas es la primera de ellas ya que se evaluó el potencial bioquímico de cada una (capacidad de degradar sustratos). La tabla 24 muestra la capacidad bioquímica de los grupos microbiano al someterlos a diferentes pruebas. De esta manera queda definida la estructura funcional de la comunidad microbiana.

Tabla 24. Actividad bioquímica potencial de bacterias y hongos en cada tratamiento

| Microorganismos | Tratamientos    | Pruebas bioquímicas (%) |          |         |         |       |         |         |          |                   |
|-----------------|-----------------|-------------------------|----------|---------|---------|-------|---------|---------|----------|-------------------|
|                 |                 | Glucosa                 | Celulosa | Pectina | Quitina | Tween | Almidon | Nitrato | Gelatina | Emulsión Aniónica |
| Bacterias       | Suelo s/EA      | 17,00                   | 41,66    | 50      | 41,66   | 8,33  | 58,33   | 91,66   | 41,66    | 91,66             |
|                 | Suelo s/EA(est) | 33,33                   | 8,33     | 66,66   | 33,33   | 16,66 | 66,66   | 100     | 33,33    | 75                |
|                 | Suelo c/EA      | 50                      | 41,66    | 58,33   | 41,66   | 41,66 | 41,66   | 83,33   | 41,66    | 91,66             |
|                 | Suelo c/EA(est) | 33,33                   | 25       | 91,66   | 16,66   | 8,33  | 41,66   | 83,33   | 33,33    | 100               |
| Hongos          | Suelo s/EA      | 16,66                   | 16,66    | 75      | 33,33   | 16,66 | 41,66   | 75      | 58,33    | 41,66             |
|                 | Suelo s/EA(est) | 41,66                   | 75       | 75      | 16,66   | 8,33  | 41,66   | 8,33    | 83,33    | 30                |
|                 | Suelo c/EA      | 83,33                   | 66,16    | 75      | 75      | 8,33  | 33,33   | 58,33   | 58,33    | 25                |
|                 | Suelo c/EA(est) | 75                      | 83,33    | 75      | 91,66   | 58,33 | 16,66   | 58,33   | 75       | 32                |

Ambos tipos de microorganismos mostraron altas capacidades de degradar diversos compuestos orgánicos complejos, tal como lo indican los porcentajes de actividad bioquímica sobre sustratos tal como celulosa (bacterias 41,66 % y hongos 83,33%); pectina (50 y 90%); quitina (41,66 y

91,66%); Almidón (41,66 y 58,33%); la actividad proteolítica se ubicó para las bacterias entre 41,66% y los hongos en 83,33%; adicionalmente, se probó la capacidad bioquímica frente a la emulsión asfáltica aniónica, inoculando con bacterias y hongos, placas de Petri conteniendo medio sólido con emulsión asfáltica. Las bacterias aisladas del suelo tratado con emulsión, tuvieron 91,66% mientras que los hongos demostraron tener capacidades mas bajas en cuanto a este sustrato. Un comportamiento similar reportó Antía (1995) quien trabajó con comunidades de suelos cultivados y no cultivados, y detectó que gran parte de la capacidad bioquímica de los microorganismos estudiados se enfocaron hacia sustratos carbonados complejos, como la pectina, el almidón y la capacidad proteolítica, entre otros.

Se utilizaron medios comerciales de amplio uso en microbiología, mientras que el medio con emulsión fue elaborado modificando el medio Bushnell-Haas propuesto por Mehl *et al* (2006) ( $\text{g.l}^{-1}$ : 0.2  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ ; 0.02  $\text{CaCl}_2$ ; 1.0  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 1.0  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; 0.05  $\text{FeCl}_3$ ; 15.0 agar pure) suplementado con emulsión asfáltica aniónica al 1% en lugar de crudo. La emulsión se mezcló totalmente en el medio líquido quedando una solución homogénea. Luego de autoclavar (1,5 atm; 121 °C x 15 minutos) se vertió en placas de Petri y tubos de ensayo en bisel, como se puede observar en la Fig. 51.



Fig. 51. Medio Emulsión Asfáltica Aniónica vertido en tubos (izquierda) y en placas de Petri (derecha).

La degradación de nitratos a nitritos y el crecimiento de bacterias en emulsión aniónica, mostraron altos porcentajes (> 70 %) en cada tratamiento. Las bacterias pectinolíticas (que degradan pectina), se hicieron presentes en todos los tratamientos. Las bacterias capaces de utilizar citrato como fuente de carbono, también tuvieron un elevado porcentaje en los tratamientos evaluados.

Los resultados reportados en este ensayo, mostraron valores similares a los obtenidos en la caracterización bioquímica de las bacterias sin emulsión, hecha en la Fase I. De la misma forma, los hongos mostraron valores similares antes y después de aplicar emulsión al suelo. Esto concuerda con lo reportado por Voets y col (1973), quien reportó que las poblaciones de hongos y bacterias no sufrieron cambios significativos en suelos tratados con emulsiones asfálticas, tanto en la densidad como en la capacidad bioquímica de las cepas. Resultados similares reportó Hernández y col (2006) en suelos bajo sistemas de producción contrastantes, quienes registraron similitudes en el porcentaje degradativo entre bacterias, entre hongos y entre bacterias y hongos en los diferentes sustratos empleados.

### 6.6.6 Análisis Funcional de las comunidades microbianas asociadas a microagregados

Se empleó la metodología propuesta por Antía (1995). A partir de la matriz generada con los resultados positivos y negativos en las pruebas bioquímicas, se hicieron los análisis de clúster para estimar los índices de diversidad funcional en bacterias y hongos. La Fig. 52 muestra los cluster para los aislamientos bacterianos en cada tratamiento.

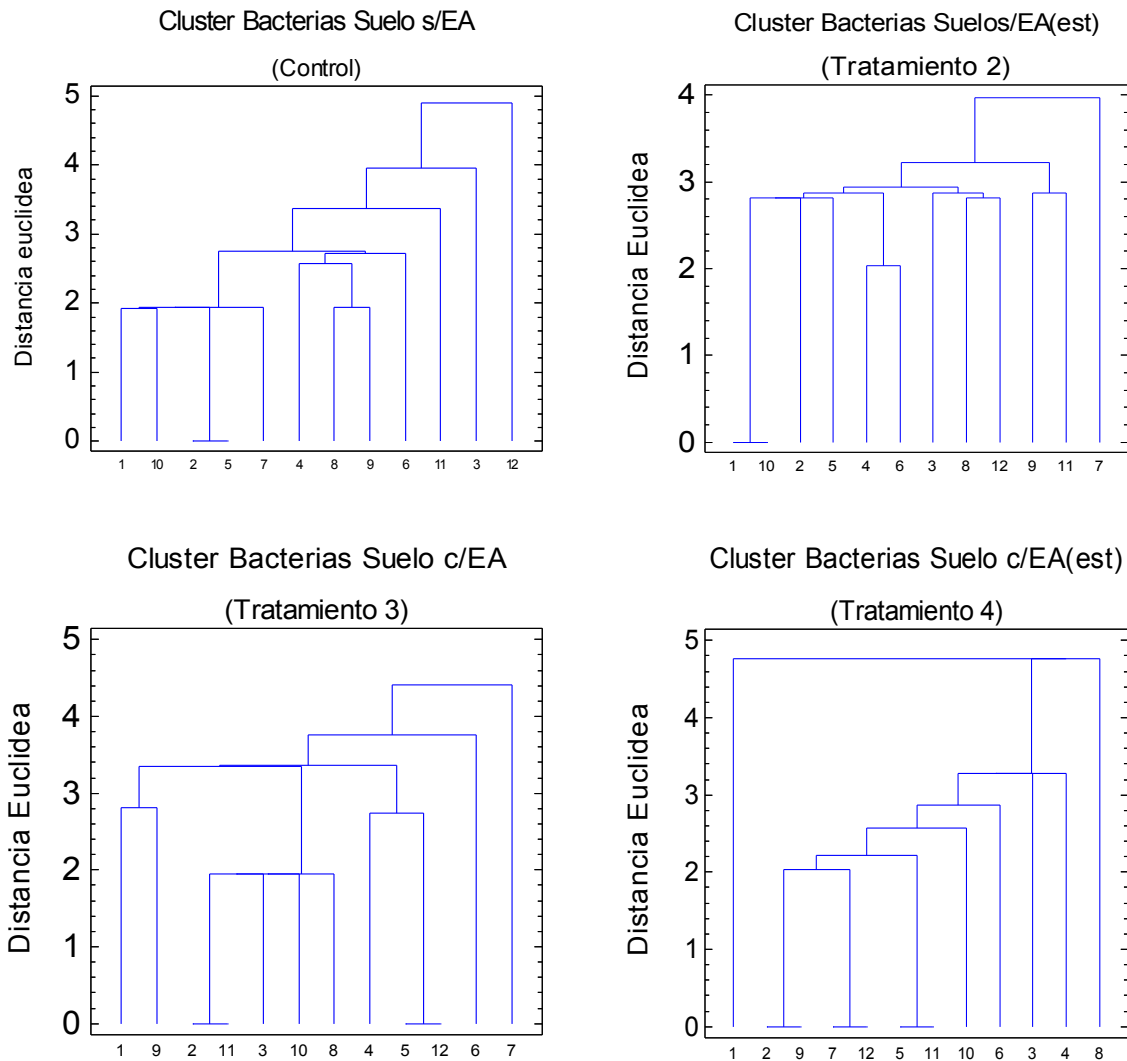


Fig. 52. Análisis de cluster para las bacterias aisladas de cada tratamiento evaluado. Se observan los grupos de identidad funcional formados a distancia euclídea= 0.

El análisis funcional de la comunidad microbiana se basa en las pruebas bioquímicas y características macro y micro-morfológicas, para establecer la estructura comunitaria en base al potencial funcional de las comunidades. Basado en esta metodología, los resultados permitieron crear una base de datos en la cual cada cepa o aislamiento tiene un código que lo representa en el análisis de clúster.

Como se puede apreciar en la Fig. 52, los análisis de agrupamiento en cada tratamiento, permitió reconocer la formación de grupos funcionalmente idénticos (GFI), es decir, cepas o aislamiento que pueden degradar los mismos sustratos, lo que significa que la distancia de disimilitud es cero (distancia= 0 en el clúster), en todos los tratamientos. Con estos datos se estimó el Índice de Diversidad Funcional (IDF) para cada comunidad, como se observa en la Tabla 25 Este análisis no se restringe solo a las bacterias, sino que también es aplicado a los hongos.

Tabla 25. Índice de Diversidad Funcional (IDF), Número de Grupos Idénticos (NGI), Distancia máxima de Amalgamiento (MDA) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de la comunidad Bacteriana en microagregados.

| Tratamiento     | NGI | NGF | MDA  | IDF  |
|-----------------|-----|-----|------|------|
| Suelo s/EA      | 1   | 11  | 4,89 | 0,91 |
| Suelo s/EA(est) | 1   | 11  | 3,97 | 0,91 |
| Suelo c/EA      | 2   | 10  | 4,40 | 0,83 |
| Suelo c/EA(est) | 3   | 9   | 4,76 | 0,75 |

El Índice de Diversidad funcional (IDF) de la comunidad bacteriana presente en microagregados de suelos tratados con emulsión asfáltica, fue menor comparado con el IDF de la comunidad bacteriana asociada a suelos sin emulsión y al IDF de la comunidad bacteriana presente en el suelo previo a los montajes de los microcosmos. Esto implica que en la comunidad bacteriana existen grupos idénticos funcionalmente capaces de llevar a cabo actividades metabólicas sobre diferentes sustratos. El IDF estimado para toda la comunidad bacteriana fue de 0,81 determinado

mediante un análisis de clúster que incluyó todos los aislamientos bacterianos, y éste a su vez, fue similar al IDF estimado en la comunidad bacteriana en el suelo previo al montaje de los microcosmos, lo que indica que no hubo diferencias desde el punto de vista funcional, entre ambas poblaciones de bacterias, independientemente de la aplicación de emulsión al suelo.

De manera análoga, las poblaciones de hongos aisladas de los diferentes tratamientos fueron sometidos a pruebas bioquímicas para verificar su potencial bioquímico. Con estos resultados, se obtuvieron los datos para realizar los análisis de cluster. La Fig. 52 muestra los cluster de cada grupo de hongos en cada tratamiento.

La distancia de menor disimilitud (distancia euclídea=0) indica que los aislamientos son similares en su potencial bioquímico, lo que significa que un mismo sustrato puede ser degradado por más de un solo individuo de la comunidad fúngica, lo que nos llevaría a pensar que se establecen gremios con perfiles bioquímicos definidos. La tabla 26 resume las características funcionales de la comunidad fúngica, permitiendo comparar con la comunidad bacteriana.

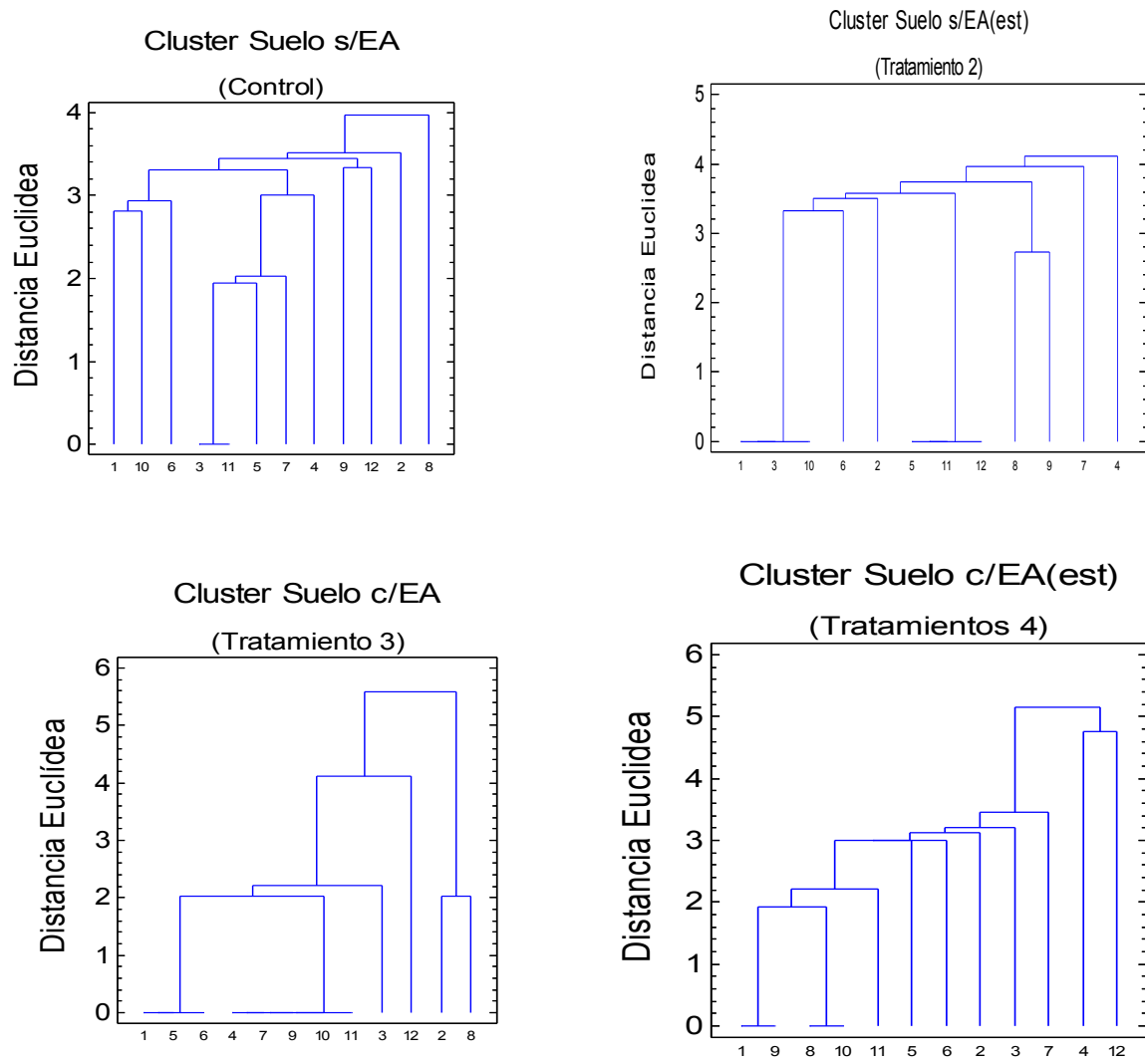


Fig. 52. Análisis de clúster para los hongos aislados de cada tratamiento evaluado. Se observan los grupos de identidad funcional formados a distancia euclídea= 0.



Tabla 26. Índice de Diversidad Funcional (IDF), Número de Grupos Idénticos (NGI), Distancia máxima de Amalgamiento (MDA) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de la comunidad fúngica en cada tratamiento

| Tiempo          | NGI | NGF | MDA  | IDF  |
|-----------------|-----|-----|------|------|
| Suelo s/EA      | 1   | 11  | 3,97 | 0,91 |
| Suelo s/EA(est) | 2   | 10  | 4,20 | 0,83 |
| Suelo c/EA      | 2   | 10  | 5,59 | 0,83 |
| Suelo c/EA(est) | 2   | 10  | 5,16 | 0,83 |

El IDF de la comunidad fúngica fue mayor en el suelo control, mientras que en el resto de tratamientos, se mantuvo en 0,83. El IDF esta acotado entre 0 y 1, siendo 1 el máximo de diversidad funcional, por el contrario, 0 representa una diversidad mínima o inexistente.

Tabla 27. Índice de Diversidad Funcional (IDF), Número de Grupos Idénticos (NGI), Distancia máxima de Amalgamiento (MDA) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de la comunidad fúngica y bacteriana en cada tratamiento.

| Tiempo          | NGI       |        | NGF       |        | MDA       |        | IDF       |        |
|-----------------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
|                 | Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos | Bacterias | Hongos |
| Suelo s/EA      | 1         | 1      | 11        | 11     | 4,89      | 3,97   | 0,91      | 0,91   |
| Suelo s/EA(est) | 1         | 2      | 11        | 10     | 3,97      | 4,10   | 0,91      | 0,83   |
| Suelo c/EA      | 2         | 2      | 10        | 10     | 4,40      | 5,59   | 0,83      | 0,83   |
| Suelo c/EA(est) | 3         | 2      | 9         | 10     | 4,76      | 5,16   | 0,75      | 0,83   |

Una vez establecido la estructura funcional de cada población de microorganismos, se realizó un análisis de clúster que incluyó a todos los miembros de la comunidad microbiana presentes en cada tratamiento, para ello se procedió a combinar en un mismo análisis, todas las bacteria y hongos seleccionados aleatoriamente. Esto permitió conocer la existencia de grupos funcionalmente idénticos entre hongos y bacterias.

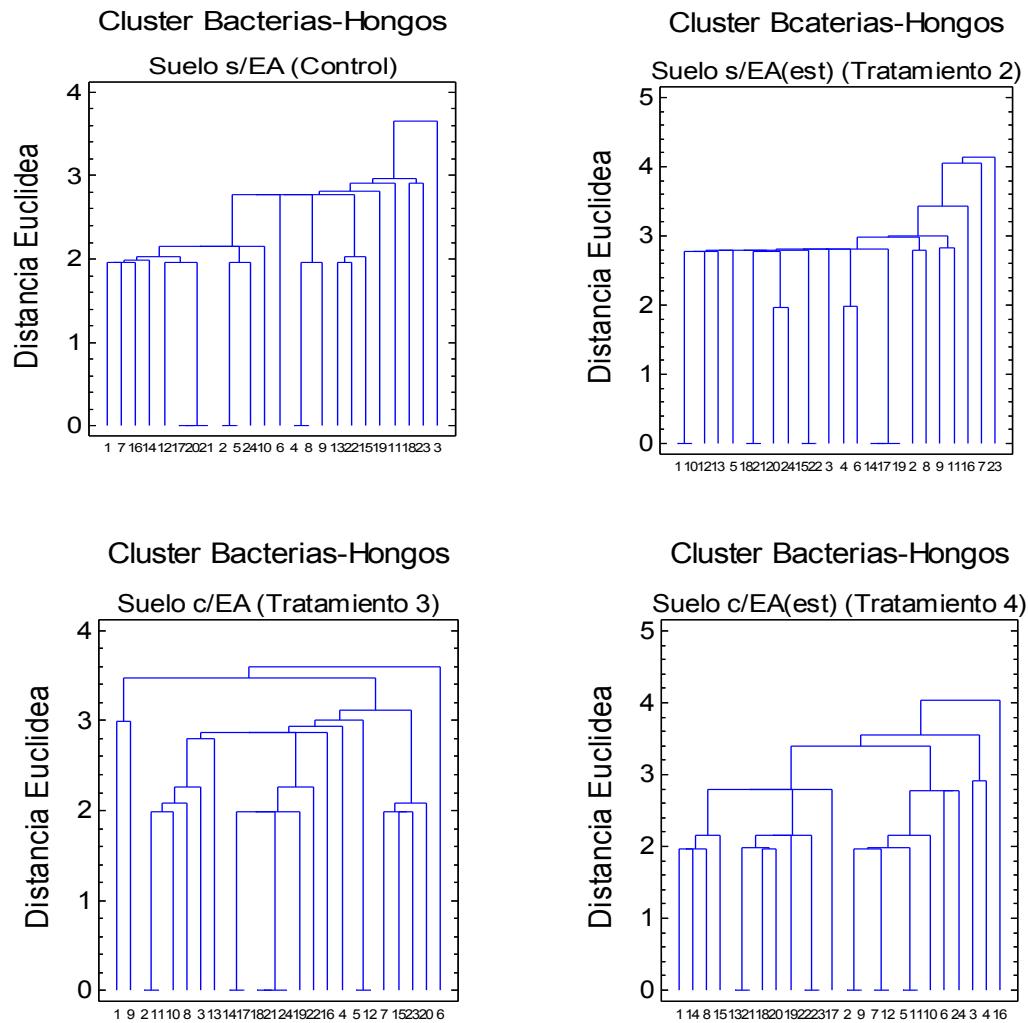


Fig. 53. Análisis de clúster de la comunidad Bacteria-Hongos combinada en cada tratamiento.

La Fig. 53 muestra los dendrogramas en cada corrida, correspondiente al análisis de la comunidad Bacterias-Hongos en cada tratamiento. Adicionalmente, el análisis permitió reconocer que se formaron GIF dentro de una misma clase de organismo, sin embargo, no se formaron GFI entre hongos y bacterias. Esto permite inferir que en ambos grupos de organismos, existen individuos o grupos de individuos, cuya función es la misma, desde el punto de vista cualitativo. Además, esa funcionalidad no se alteró en los suelos tratados con emulsión, pues no se registraron grupos funcionales de microorganismos que fueran idénticos a otros, es decir, que efectuaran las mismas

funciones metabólicas siendo de naturaleza distinta, dentro de la comunidad. La tabla 28 resume los índices funcionales obtenidos para cada comunidad bacteria-hongos de cada tratamiento.

Tabla 28. Índice de Diversidad Funcional (IDF), Número de Grupos Idénticos (NGI), Distancia máxima de Amalgamiento (MDA) y Número de Grupos Funcionales (NGF) de la comunidad bacterias-hongos en cada tratamiento

| Tiempo          | NGF | NGI | MDA  | IDF  |
|-----------------|-----|-----|------|------|
| Suelo s/EA      | 3   | 21  | 3,66 | 0,88 |
| Suelo s/EA(est) | 4   | 20  | 4,13 | 0,83 |
| Suelo c/EA      | 4   | 20  | 3,60 | 0,83 |
| Suelo c/EA(est) | 5   | 19  | 4,02 | 0,79 |

La estructura funcional de las comunidades estimadas mediante el uso de índices de diversidad funcional (IDF) da una idea numérica de cómo varía una comunidad basado en el potencial bioquímico que tiene cada microorganismo, individual o en combinación con otros miembros de su comunidad o de otra, quienes pueden explotar un sustrato en común. El análisis empleado en este estudio se basó en las propiedades fenotípicas de microorganismos cultivables con técnicas clásicas de plaqueo y utilizando herramientas estadísticas como los clusters o análisis de agrupamiento, tomando en cuenta las asociaciones formadas entre microorganismos al enfrentarlas a sustratos diversos, lo que evidenció su capacidad degradativa y la capacidad metabólica de la comunidad en el tiempo.

Atlas y Bartha (2002) señala que los índices de diversidad raramente se aplican a las comunidades microbianas debido a las dificultades de manejar numerosos microorganismos en su determinación. Sin embargo, en la taxonomía numérica pueden emplearse numerosas características, a menudo fenotípicas, de organismos aislados de una muestra, y los análisis de

agrupamiento (clusters) ayudan a establecer semejanzas entre los microorganismos. Los semejantes se consideran de una misma especie o gremio.

Antía (1995) señala que los índices de diversidad funcional permiten establecer equivalentes funcionales entre grupos taxonómicamente diferentes y de algún modo explicar la estabilidad funcional de las comunidades microbianas naturales. Por su parte, Torsvik y Øvreås (2002), señala que en suelos con bajo contenidos de nutrientes o con altos contenidos de compuestos recalcitrantes, se favorecen las comunidades con bajo potencial de crecimiento pero con alta capacidad de competir por sustratos y que en el tiempo, la diversidad puede depender de estas interacciones.

Los microagregados ofrecen numerosos microhabitats, en los que los microorganismos pueden encontrarse en pequeños poros donde se acumula o se protege la materia orgánica, lo que condiciona la diversidad de organismos que tienen acceso a los nutrientes por existir barreras físicas, favoreciendo sólo a una determinada comunidad microbiana (Hassink y col, 1992).

Torsvik y Øvreås (2002) señalan que la diversidad microbiana en fracciones del suelo de pequeño tamaño (por ejemplo, los microagregados), es mayor que en fracciones de gran tamaño y que la comunidad microbiana puede ser específica a estos agregados. El IDF estimado en bacterias y hongos, fueron altos y cercanos a 1 en algunos casos, lo que indica que hubo grupos de microorganismos capaces de metabolizar de manera semejante los sustratos disponibles en las pruebas bioquímicas, y a su vez, los IDF estimados en la comunidad microbiana fueron similares a los IDF estimados con y sin emulsión, lo que puede indicar que la emulsión no condujo a producir cambios en la estructura funcional de la comunidad microbiana.

Por su parte, Stark y col (2007), utilizando técnicas moleculares (PCR y electroforesis en gradiente de gel) y análisis de clúster, determinaron que las propiedades inherentes al suelo y los

factores ambientales, tuvieron un mayor impacto sobre la estructura comunitaria microbiana que las prácticas de manejo del suelo cultivado, que incluyó la adición de enmiendas orgánicas, como abonos verdes y fertilizantes orgánicos.

Respecto al uso de emulsiones de asfalto y su efecto sobre la estructura comunitaria microbiana, es escasa, menos si se trata de suelos tropicales de sabana. Uno de los estudios fue hecho por Voets y col (1973), quienes, a pesar de que evaluaron los efectos de emulsiones asfálticas sobre algunos parámetros microbiológicos y bioquímicos, no establecieron de forma directa, el efecto sobre la estructura comunitaria microbiana, sin embargo, mostraron el efecto sobre grupos de organismos específicos, tales como, las bacterias y hongos totales, bacterias anaerobias, organismos proteolíticos, amilolíticos y celulolíticos, entre otros; sus conclusiones resaltan el hecho de que las emulsiones no tuvieron efecto de importancia sobre cada uno de los aspectos evaluados.

Al observar los resultados de las pruebas bioquímicas, la comunidad microbiana mantuvo el patrón de degradación sobre los sustratos, con poca variación entre el inicio y final del ensayo.

## 7. Conclusiones

- La dosis de emulsión asfáltica aniónica utilizada fue de 0,3 % p/p, equivalente a 7,5 T/ha; y se determinó a través de ensayos de respirometría en el suelo.
- La emulsión asfáltica aniónica mejoró la agregación, promoviendo la formación y estabilización de microagregados en el tiempo.
- El entorno físico-químico y enzimático de la comunidad microbiana (agregación, carbono orgánico, nitrógeno total, fósforo disponible, pH y actividad deshidrogenasa) no tuvo cambios significativos por la incorporación de emulsión asfáltica al suelo a la concentración establecida
- La comunidad microbiana fue caracterizada de acuerdo al patrón metabólico mostrado a través de pruebas bioquímicas, y las diferencias fenotípicas fueron utilizadas para la identificación de los principales grupos microbianos presentes en los microagregados.
- La emulsión asfáltica aniónica no tuvo efectos sobre la estructura comunitaria microbiana, pues no se alteró el patrón funcional de los grupos bacterianos ni fúngicos dentro de la comunidad microbiana total.

## 8. Recomendaciones

- Diseñar nuevos experimentos utilizando concentraciones variables de emulsión asfáltica aniónica, y evaluar sus efectos sobre otros organismos del suelo, por ejemplo, protozoarios, lombriz de tierra, etc.
- Realizar nuevas experiencias tomando en cuenta emulsiones aniónicas y catiónicas, y evaluar la toxicidad a través de pruebas eco-toxicológicas en campo.
- Establecer grupos multidisciplinarios que puedan evaluar todos los aspectos químicos, físicos y biológicos, con el fin de estudiar de forma más amplia y profunda, los efectos de emulsiones de asfalto en suelos aptos para cultivo.
- Incluir en próximos experimentos, técnicas novedosas (HPLC, ICP, PCR, electroforesis en gel) con el fin de optimizar los ensayos, minimizar los errores y lograr interpretaciones claras de los datos al trabajar con emulsiones asfálticas

## 9. REFERENCIAS CITADAS

- Acosta, Y., Paolini, J. 2005. Actividad de la enzima deshidrogenasa en un suelo calciorthids enmendado con residuos orgánicos. *Agronomía Tropical*. 55 (2): 217-232
- Acosta- Martínez, V., Cruz, L., Sotomayor-Ramírez, D., Pérez-Alegría, L. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use a tropical watershed. *Applied Soil Ecology*. 35: 35-45.
- Alef, K., Nannipieri, P. 1995. *Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry*. Academic Press Limited. Londres.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. John Wiley & Sons. Segunda Edición. E. U.A.
- Anderson, J. M e Ingram J. S. I. (Ed.). 1992. *Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods*. CAB International. Wallingford, Oxon UK.
- Atlas R. M., Bartha R. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental*. Pearson Educación, S.A. Madrid, España.
- Baver, L. D., Gardner H. W., Gardner R. W. 1972. *Soil Physics*. John Wiley & Sons, Inc. Cuarta Edición, E.U.A.
- Casanova, E. 1991. *Introducción a la Ciencia del Suelo*. CDCH-UCV. Caracas. 393 pp.
- Casida, L. 1977. Microbial metabolic activity in soil as measured by deshidrogenase determinations. *Appl. Environ. Microbiol.* 34:630-636.
- Castillo, E. A. 2005. Influencia de la rizósfera en los cambios de la fracción de fósforo disponible en suelos ácidos. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología UCV. 73 pp.
- Christensen, B. T. 1996. Carbon in primary and secondary organomineral complexes, en: Carter M.R., Stewart B. A. (Eds), *Structure and Organic matter storage in agricultural soils*, CRC Press Inc, Boca Ratón, FL, U.S.A. pp. 97-165.



- Fortún, C., Fortún, A. 2005. Quantification of Soil Aggregates Treated with Bituminous Emulsions and Other Organic Amendments by Using scanning Electrón Microscope. *Arid Land Research and Management*. **19**: 183-195.
- Frede, H. G., D. Lütkemöller., A. Genead., y H. Neururer. 1994. Effect of bitumenous mulch on soil structure and on evaporation control in soils of arid regions. *Soil Technology*. **7**: 47-55.
- Gaceta Oficial de la República de Venezuela. Caracas, 03/08/1998. Decreto N° 2635 de La Ley Orgánica del Ambiente. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Reforma parcial de fecha 18/12/1997.
- Gilabert, J., I. López., y R. Pérez. 1990. Manual de Métodos y Procedimientos de Referencia. MAC. FONAIAP. CENAIAP. Plan Extra- Institucional para Uniformar Análisis de Suelos para Diagnóstico de Fertilidad. Rep. Téc. Serie D. No.26.
- González, R. 1981. Métodos de Laboratorio para Análisis de Rutina de Suelos y Algunas Consideraciones Sobre Estos. Ofic. Pub. FCF-ULA. Mérida. 96 pp.
- Hassink, J., Bouwman, K., Zwart, K. B., Brussard, L. 1992. Relationships between habitable pore space, soil biota and mineralization rates in grassland soils. *Soil. Biol. Biochem*. **25 (1)**: 47-55.

- Hawkins, C. P. y J. A. MacMahon. 1989. Guilds: the multiple meanings of a concept. *Ann. Rev. Entomol.* 34: 423-451.
- Hernández-Hernández, R. M., y López-Hernández, D. 2002. El tipo de labranza como agente modificador de la materia orgánica: un modelo para suelos de sabana de los llanos centrales venezolanos. *Interciencia.* 27(10):529-536.
- Hesse, P. R. 1971. A Textbook of Soil Chemical Analysis. John Murray Publishers Ltd. Great Britain. 520 pp.
- Instituto de Zoología Tropical. UCV. 2006. Evaluación sistémica de las condiciones socio-ambientales en un área de producción del Distrito San Tomé, División Oriente. Informe N° 2 (Avance de Resultados).p.18-19.
- Jiuzhi, W., y W. Bongtong. 1985. Effects of Bitumen Emulsion on Soil Physical Properties. Colloquium on Energy Flux at the Soil Atmosphere Interface. ICTF- IAEA- UNESCO. Trieste (Italia).
- Johnson, L. F y Curl, E.A. Methods for Research on the Ecology of soil-borne plant pathogens. 1972. Burgess Publishing Company. U.S.A. 247 pp.
- Kaiser, P. 1983. The role of soil micro-organisms in savanna ecosystems. En: F. Boulière (ed). Ecosystems of world: tropical savannas. Elsevier. Amsterdam. 730 pp.
- Kiss, S., M. Dragan-Bularda., y D. Radulescu. 1975. Biological significance of enzymes accumulated in soil. *Adv. Agron.* 27: 25-87.
- Lavelle, P. 1997. Faunal activities and soil processes: adaptive strategies that determine ecosystem function. *Advances in Ecological Research.* 27: 93-132.

- Lobo, D., I. Pla., y A. Florentino. 1983. Uso de emulsiones de asfalto para incrementar y regular la productividad de maní en un Ultisol arenoso de la mesa de Guanipa. *Agronomía Tropical*. 34 (1-3): 43-48.
- López-Hernández, D., y A. Ojeda. 1996. Alternativas en el manejo agroecológico de los suelos de las sabanas del norte de suramérica. *Ecotrópicos*. 9(2): 101-117.
- López –Hernández, D., Hernández R. M., Brossard, M. 2005. Historia del uso reciente de tierras de las sabanas de América del Sur. Estudios de casos en sabanas del Orinoco. *Interciencia*. 30 (10): 623-630.
- Michaca H., J. L., V. M. Sánchez ., I. Chaires, S. A. Damián., y R. Téllez. 2001. Impacto Ambiental de Proyectos Carreteros. Efectos por la construcción y conservación de Superficies de Rodamiento: I Pavimentos Flexibles. Instituto Mexicano del Transporte. Safandila, Querétaro, Mexico. Secretaría de Comunicaciones y Transporte. Documento Tecnico No. 163.
- Milton, J. S. 1994. Estadística para biología y ciencias de la salud. McGraw Hill- Interamericana. 3ª Edición. Madrid.
- Ojeda, A., Stein M., Chacón P., López-Hernández, D. 2006. El papel del Carbono orgánico en la fertilidad de un ultisol de sabana con predominio de cargas variables. *AgroBiológica*. 3 (5): 7-14.

- O'donnell, A., Seasman, M., Macrae, A., Waite, I., Davies, J. 2001. Plants and fertilizers as drivers of change in microbial community structure and function in soils. *Plants and Soil*. **232**: 135-145.
- Pérez, M. 2002. Alternativas de manejo agroecológico y sucesión temprana en sabanas de drenaje interno rápido ubicadas al norte del Estado Amazonas. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología UCV Facultad de Ciencias. 126 pp.
- Pla Sentis, I. 1978. Dinámica de las propiedades físicas y su relación con problemas de manejo y conservación de suelos agrícolas de Venezuela. Trabajo de ascenso a Profesor Titular. Facultad de Agronomía UCV. Maracay.
- Rivero, C. 1999. La Fracción viva de la Materia Orgánica del Suelo. *Alcance Rev. Fac. Agron. UCV*. **57**: 73-96.
- Rodríguez, T., D. Sanabria., y L. Navarro. 1995. Nuevos enfoques en el Manejo de Sabanas en los llanos Orientales Venezolanos. *FONAIAP Divulga*. **52(13)**: 35-38.
- Rodríguez, B., M. España., y E. Cabrera. 2004. Propiedades químico-estructurales de la materia orgánica del suelo en un agro sistema de los llanos centrales venezolanos bajo diferentes prácticas de manejo. *Interciencia*. **29(8)**: 461-467.
- Roldán, A., L. Carrasco., y F. Caravaca. 2006. Stability of desiccated rhizosphere soil aggregates of mycorrhizal *Juniperus oxycedrus* grown in a desertified soil amended with a composted organic residue. *Soil Biology & Biochemistry*. **38**: 2722–2730.

- Russel, E. W. 1973. Soil conditions and plant growth. 10<sup>th</sup> edn. London, Longmans, Green and Co. 849 p.
- Salem, N., M. Verloo. y M. De Boodt. 1985. Effects of bituminous emulsions on retention and release of some chemical elements in two soil samples. *Geoderma*. 35: 241-249.
- Santander, S. 2003. Influencia de la rizosfera en la estructura, actividades enzimáticas y microbiota en suelos de una sabana ubicada al noroeste del estado Bolívar. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología UCV Facultad de Ciencias. 65 pp.
- Sarmiento, G. 1990. Ecología comparada de ecosistemas de sabana en América de Sur. *In: G. Sarmiento (Ed.), Las sabanas americanas: aspectos de sus biogeografía, ecología y manejo*. Fondo Editorial Acta Científica Venezolana; Primera Edición, Caracas Venezuela.
- Senesi, N., C. Plaza., G. Brunetti., y A. Polo. 2006. A comparative survey of recent results on humic-like fractions in organic amendments and effects on native soil humic substances. *Soil Biology & Biochemistry*. 34: 1-19.
- Six, J., C. Feller., K. Denef., S. M. Ogle., J. C. De Morales., Albrecht, A. 2002. Soil organic matter, biota and aggregation in temperate and tropical soils- Effects of no-tillage. *Agronomie*. 22: 755-775.
- Sylvia D., Fuhrmann J., Hartel, P., Zuberer, D. 1998. Principles and Applications of Soil Microbiology. Prentice Hall. New Jersey, E.U.A.

- Tabatabai, M., y J. Bremer. 1972. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil. Biol. Biochem.* 20: 39-43.
- Talavera, R. R., V. M. Meneses., y M. Martínez. 2001. Emulsiones Asfálticas. Instituto Mexicano del Transporte. Sefandila, Querétaro, México. Secretaría de Comunicaciones y Transporte. Documento Tecnico No. 23.
- Tisdall, J. M., Oades, J. M. 1982. Organic matter and water-stable aggregates in soils. *J. Soil Sci.* 33: 141-163.
- USDA-Natural Resources Conservation Service. 2006. Keys to Soil Taxonomy. Soil Survey Staff. Décima Edición. Washington, DC. E.U.A
- Verhoef, H. A. y L. Brussaard. 1990. Decomposition and nitrogen mineralization in natural and agroecosystems: the contribution of soil animals. *Biogeochemistry.* 11: 175-211.
- Voets, J. P., M. Meerschman., y M. Verstraete. 1973. Microbiological and biochemical effects of the application of bitumenous emulsions as soil conditioners. *Plant and Soil.* 39: 433-436.

- Zamora, A. C. 2006. Análisis funcional de comunidades bacterianas asociadas a un proceso de biorremediación de muestras de suelos contaminadas con hidrocarburos. Trabajo Especial de Grado. Escuela de Biología UCV. 89 pp.
- Zamora, A. 2008. Análisis funcional de microorganismos. Un estimador de diversidad y estructura comunitaria. Escuela de Biología. Post-grado en Ecología. Seminario Tesis Doctoral.

## ANEXOS

### Anexo 1. Análisis de Cluster para la comunidad bacterias-hongos del suelo s/EA

Cluster Bacterias-Hongos Suelo s/EA (control)

Clustering Method: Nearest Neighbor (Single Linkage)

Distance Metric: Euclidean

| Stage | Clusters Combined |           | Coefficient | Stage First Appears |           | Next Stage |
|-------|-------------------|-----------|-------------|---------------------|-----------|------------|
|       | Cluster 1         | Cluster 2 |             | Cluster 1           | Cluster 2 |            |
| 1     | 2                 | 5         | 0,0         | 0                   | 0         | 10         |
| 2     | 4                 | 8         | 0,0         | 0                   | 0         | 6          |
| 3     | 17                | 20        | 0,0         | 0                   | 0         | 4          |
| 4     | 17                | 21        | 0,0         | 3                   | 0         | 7          |
| 5     | 1                 | 7         | 1,95789     | 0                   | 0         | 9          |
| 6     | 4                 | 9         | 1,95789     | 2                   | 0         | 17         |
| 7     | 12                | 17        | 1,95789     | 0                   | 4         | 12         |
| 8     | 13                | 22        | 1,95789     | 0                   | 0         | 13         |
| 9     | 1                 | 16        | 1,96472     | 5                   | 0         | 11         |
| 10    | 2                 | 24        | 1,96472     | 1                   | 0         | 14         |
| 11    | 1                 | 14        | 1,98566     | 9                   | 0         | 12         |
| 12    | 1                 | 12        | 2,0221      | 11                  | 7         | 14         |
| 13    | 13                | 15        | 2,0221      | 8                   | 0         | 18         |
| 14    | 1                 | 2         | 2,15375     | 12                  | 10        | 15         |
| 15    | 1                 | 10        | 2,15375     | 14                  | 0         | 16         |
| 16    | 1                 | 6         | 2,76887     | 15                  | 0         | 17         |
| 17    | 1                 | 4         | 2,77371     | 16                  | 6         | 18         |
| 18    | 1                 | 13        | 2,77371     | 17                  | 13        | 19         |
| 19    | 1                 | 19        | 2,81464     | 18                  | 0         | 20         |
| 20    | 1                 | 11        | 2,91067     | 19                  | 0         | 22         |
| 21    | 18                | 23        | 2,91067     | 0                   | 0         | 22         |
| 22    | 1                 | 18        | 2,96005     | 20                  | 21        | 23         |
| 23    | 1                 | 3         | 3,66068     | 22                  | 0         | 0          |

| Cluster Number | Smallest Row |
|----------------|--------------|
| 1              | 1            |

The StatAdvisor

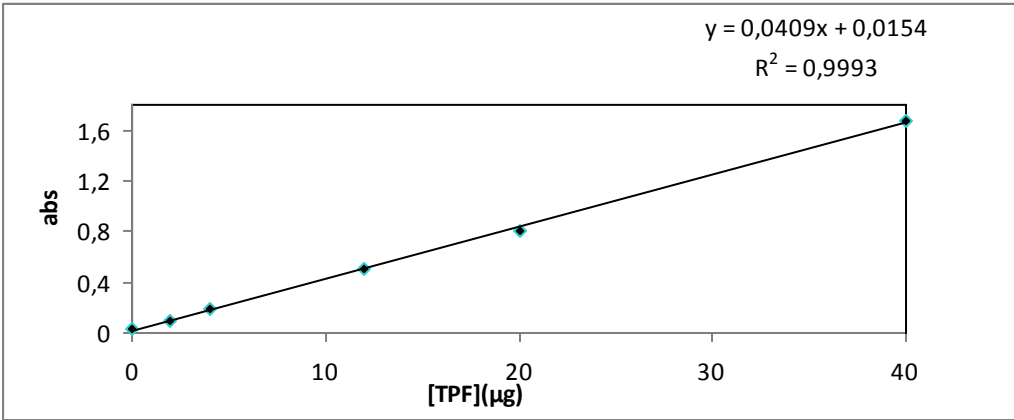
The agglomeration schedule shows which observations were combined at each stage of the clustering process. For example, in the first stage, observation 2 was combined with observation 5. The distance between the groups when combined was 0,0. It also shows that the next stage at which this combined group was further combined with another cluster was stage 10.



**Anexos 2. Curva de calibración Actividad Deshidrogenasa para determinar dosis única inhibitoria.**

**Patrón**

| [TPF]( $\mu\text{g}$ ) | Absorbancia |
|------------------------|-------------|
| 0                      | 0,025       |
| 2                      | 0,101       |
| 4                      | 0,182       |
| 12                     | 0,507       |
| 20                     | 0,802       |
| 40                     | 1,668       |



### Anexo 3. Datos Nitrógeno total para todos los tiempos

| Tiempos | Replica | NitrógenoTotal(%) |
|---------|---------|-------------------|
| 0       | a1      | 0,28              |
| 0       | a2      | 0,21              |
| 0       | a3      | 0,28              |
| 0       | b1      | 0,21              |
| 0       | b2      | 0,28              |
| 0       | b3      | 0,28              |
| 0       | c1      | 0,21              |
| 0       | c2      | 0,28              |
| 0       | c3      | 0,21              |
| 0       | a1      | 0,28              |
| 0       | a2      | 0,35              |
| 0       | a3      | 0,21              |
| 0       | b1      | 0,28              |
| 0       | b2      | 0,28              |
| 0       | b3      | 0,21              |
| 0       | c1      | 0,28              |
| 0       | c2      | 0,14              |
| 0       | c3      | 0,21              |
| 0       | a1      | 0,28              |
| 0       | a2      | 0,21              |
| 0       | a3      | 0,28              |
| 0       | b1      | 0,14              |
| 0       | b2      | 0,14              |
| 0       | b3      | 0,28              |
| 0       | c1      | 0,21              |
| 0       | c2      | 0,28              |
| 0       | c3      | 0,21              |
| 0       | a1      | 0,28              |
| 0       | a2      | 0,14              |
| 0       | a3      | 0,42              |
| 0       | b1      | 0,21              |
| 0       | b2      | 0,28              |
| 0       | b3      | 0,21              |
| 0       | c1      | 0,28              |
| 0       | c2      | 0,35              |
| 0       | c3      | 0,21              |
| 15      | a1      | 0,28              |
| 15      | a2      | 0,21              |
| 15      | a3      | 0,21              |
| 15      | b1      | 0,28              |
| 15      | b2      | 0,35              |
| 15      | b3      | 0,28              |
| 15      | c1      | 0,35              |
| 15      | c2      | 0,21              |
| 15      | c3      | 0,21              |
| 15      | a1      | 0,21              |

|    |    |      |
|----|----|------|
| 15 | a2 | 0,21 |
| 15 | a3 | 0,28 |
| 15 | b1 | 0,21 |
| 15 | b2 | 0,21 |
| 15 | b3 | 0,14 |
| 15 | c1 | 0,28 |
| 15 | c2 | 0,21 |
| 15 | c3 | 0,14 |
| 15 | a1 | 0,28 |
| 15 | a2 | 0,35 |
| 15 | a3 | 0,28 |
| 15 | b1 | 0,28 |
| 15 | b2 | 0,35 |
| 15 | b3 | 0,35 |
| 15 | c1 | 0,14 |
| 15 | c2 | 0,28 |
| 15 | c3 | 0,21 |
| 15 | a1 | 0,21 |
| 15 | a2 | 0,28 |
| 15 | a3 | 0,21 |
| 15 | b1 | 0,21 |
| 15 | b2 | 0,21 |
| 15 | b3 | 0,21 |
| 15 | c1 | 0,21 |
| 15 | c2 | 0,28 |
| 15 | c3 | 0,28 |
| 30 | a1 | 0,28 |
| 30 | a2 | 0,21 |
| 30 | a3 | 0,21 |
| 30 | b1 | 0,21 |
| 30 | b2 | 0,21 |
| 30 | b3 | 0,21 |
| 30 | c1 | 0,28 |
| 30 | c2 | 0,35 |
| 30 | c3 | 0,21 |
| 30 | a1 | 0,21 |
| 30 | a2 | 0,07 |
| 30 | a3 | 0,21 |
| 30 | b1 | 0,28 |
| 30 | b2 | 0,21 |
| 30 | b3 | 0,14 |
| 30 | c1 | 0,14 |
| 30 | c2 | 0,07 |
| 30 | c3 | 0,14 |
| 30 | a1 | 0,14 |
| 30 | a2 | 0,14 |
| 30 | a3 | 0,07 |
| 30 | b1 | 0,07 |
| 30 | b2 | 0,35 |

|    |    |      |
|----|----|------|
| 30 | b3 | 0,21 |
| 30 | c1 | 0,07 |
| 30 | c2 | 0,21 |
| 30 | c3 | 0,21 |
| 30 | a1 | 0,14 |
| 30 | a2 | 0,14 |
| 30 | a3 | 0,21 |
| 30 | b1 | 0,14 |
| 30 | b2 | 0,14 |
| 30 | b3 | 0,14 |
| 30 | c1 | 0,14 |
| 30 | c2 | 0,21 |
| 30 | c3 | 0,21 |
| 45 | a1 | 0,14 |
| 45 | a2 | 0,14 |
| 45 | a3 | 0,21 |
| 45 | b1 | 0,21 |
| 45 | b2 | 0,14 |
| 45 | b3 | 0,21 |
| 45 | c1 | 0,28 |
| 45 | c2 | 0,21 |
| 45 | c3 | 0,14 |
| 45 | a1 | 0,21 |
| 45 | a2 | 0,21 |
| 45 | a3 | 0,14 |
| 45 | b1 | 0,28 |
| 45 | b2 | 0,28 |
| 45 | b3 | 0,14 |
| 45 | c1 | 0,14 |
| 45 | c2 | 0,07 |
| 45 | c3 | 0,14 |
| 45 | a1 | 0,07 |
| 45 | a2 | 0,14 |
| 45 | a3 | 0,07 |
| 45 | b1 | 0,14 |
| 45 | b2 | 0,14 |
| 45 | b3 | 0,07 |
| 45 | c1 | 0,14 |
| 45 | c2 | 0,21 |
| 45 | c3 | 0,14 |
| 45 | a1 | 0,07 |
| 45 | a2 | 0,14 |
| 45 | a3 | 0,14 |
| 45 | b1 | 0,14 |
| 45 | b2 | 0,14 |
| 45 | b3 | 0,14 |
| 45 | c1 | 0,21 |
| 45 | c2 | 0,14 |
| 45 | c3 | 0,21 |

---

**Anexo 4. Datos promedios de fósforo en solución para todos los tiempos.**

| Tiempo(días) | Tratamientos     | Pt ( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------------|------------------|------------------------|
| 0            | Suelo s/EA       | 41,64                  |
| 0            | Suelo s/EA+ester | 41,66                  |
| 0            | Suelo c/EA       | 38,58                  |
| 0            | Suelo c/EA+ester | 40,30                  |
| 15           | Suelo s/EA       | 43,21                  |
| 15           | Suelo s/EA+ester | 51,08                  |
| 15           | Suelo c/EA       | 45,69                  |
| 15           | Suelo c/EA+ester | 39,55                  |
| 30           | Suelo s/EA       | 36,50                  |
| 30           | Suelo s/EA+ester | 45,11                  |
| 30           | Suelo c/EA       | 47,91                  |
| 30           | Suelo c/EA+ester | 45,60                  |
| 45           | Suelo s/EA       | 46,71                  |
| 45           | Suelo s/EA+ester | 44,58                  |
| 45           | Suelo c/EA       | 55,30                  |
| 45           | Suelo c/EA+ester | 38,12                  |

**Curva de calibración para fósforo en solución**

***Curva de Calibración para Fósforo Total en Solución***

| Alicuota Patrón de Fósforo(25 ppm)(ml) | [Fósforo](ppm) | Absorbancia (nm) |
|--|----------------|------------------|
| 0,05                                   | 0,05           | 0,035            |
| 0,1                                    | 0,1            | 0,06             |
| 0,2                                    | 0,2            | 0,144            |
| 0,4                                    | 0,4            | 0,279            |
| 0,8                                    | 0,8            | 0,594            |

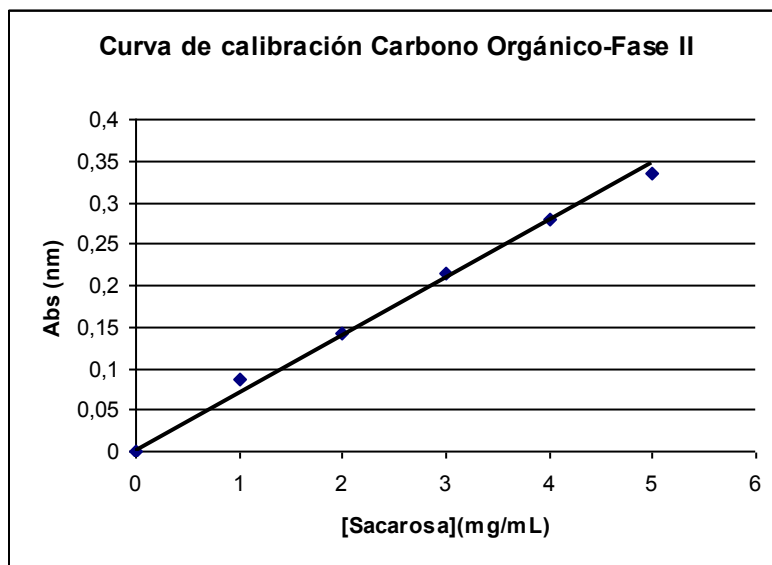
### **Anexo 5. Datos pH del suelo para todos los tiempos y tratamientos.**

| Tiempo | Tratamiento      | pH <sub>(H2O)</sub> |
|--------|------------------|---------------------|
| 0      | Suelo s/EA       | 4,58                |
| 0      | Suelo s/EA+ester | 4,77                |
| 0      | Suelo c/EA       | 4,69                |
| 0      | Suelo c/EA+ester | 4,96                |
| 15     | Suelo s/EA       | 3,97                |
| 15     | Suelo s/EA+ester | 5,33                |
| 15     | Suelo c/EA       | 4,53                |
| 15     | Suelo c/EA+ester | 5,27                |
| 30     | Suelo s/EA       | 3,95                |
| 30     | Suelo s/EA+ester | 5,38                |
| 30     | Suelo c/EA       | 4,42                |
| 30     | Suelo c/EA+ester | 5,27                |
| 45     | Suelo s/EA       | 4,08                |
| 45     | Suelo s/EA+ester | 5,36                |
| 45     | Suelo c/EA       | 4,58                |
| 45     | Suelo c/EA+ester | 5,22                |

**Anexo 6. Datos y curva de calibración para el carbono orgánico en todos los tiempos y tratamientos.**

Curva de Calibración para Carbono Orgánico

| Vol. Solución Patrón Sacarosa(4000 ppm) | [sacarosa](mg/ml) | Absorbancia (nm) |
|---|-------------------|------------------|
| 0                                       | 0                 | 0                |
| 0,25                                    | 1                 | 0,087            |
| 0,50                                    | 2                 | 0,143            |
| 0,75                                    | 3                 | 0,214            |
| 1                                       | 4                 | 0,280            |
| 1,25                                    | 5                 | 0,336            |
| 1,50                                    | 6                 | 0,402            |



## Anexos 7. Datos porcentajes de agregados para todos los tiempos y tratamientos.

| Tratamiento | Tiempo (días) | Tamaño Agregados | AEA(%) |
|-------------|---------------|------------------|--------|
| S           | 0             | >2000            | 19,4   |
| S           | 0             | 250-2000         | 25,5   |
| S           | 0             | 53-250           | 27,0   |
| S           | 0             | <53              | 42,3   |
| S           | 15            | >2000            | 6,9    |
| S           | 15            | 250-2000         | 9,7    |
| S           | 15            | 53-250           | 11,0   |
| S           | 15            | <53              | 32,4   |
| S           | 30            | >2000            | 5,8    |
| S           | 30            | 250-2000         | 7,4    |
| S           | 30            | 53-250           | 7,9    |
| S           | 30            | <53              | 27,4   |
| S           | 45            | >2000            | 1,1    |
| S           | 45            | 250-2000         | 2,0    |
| S           | 45            | 53-250           | 2,3    |
| S           | 45            | <53              | 24,3   |
| S+est       | 0             | >2000            | 14,4   |
| S+est       | 0             | 250-2000         | 21,3   |
| S+est       | 0             | 53-250           | 23,0   |
| S+est       | 0             | <53              | 42,8   |
| S+est       | 15            | >2000            | 6,3    |
| S+est       | 15            | 250-2000         | 10,3   |
| S+est       | 15            | 53-250           | 14,9   |
| S+est       | 15            | <53              | 42,7   |
| S+est       | 30            | >2000            | 2,8    |
| S+est       | 30            | 250-2000         | 4,8    |
| S+est       | 30            | 53-250           | 8,6    |
| S+est       | 30            | <53              | 38,5   |
| S+est       | 45            | >2000            | 1,1    |
| S+est       | 45            | 250-2000         | 2,8    |
| S+est       | 45            | 53-250           | 12,4   |
| S+est       | 45            | <53              | 47,9   |
| S+EA        | 0             | >2000            | 20,1   |
| S+EA        | 0             | 250-2000         | 30,0   |
| S+EA        | 0             | 53-250           | 31,7   |
| S+EA        | 0             | <53              | 48,5   |
| S+EA        | 15            | >2000            | 22,8   |
| S+EA        | 15            | 250-2000         | 29,3   |
| S+EA        | 15            | 53-250           | 31,1   |
| S+EA        | 15            | <53              | 49,1   |
| S+EA        | 30            | >2000            | 10,3   |



|          |    |          |      |
|----------|----|----------|------|
| S+EA     | 30 | 250-2000 | 16,1 |
| S+EA     | 30 | 53-250   | 33,3 |
| S+EA     | 30 | <53      | 35,6 |
| S+EA     | 45 | >2000    | 6,8  |
| S+EA     | 45 | 250-2000 | 9,7  |
| S+EA     | 45 | 53-250   | 29,2 |
| S+EA     | 45 | <53      | 32,0 |
| S+EA+est | 0  | >2000    | 24,4 |
| S+EA+est | 0  | 250-2000 | 36,1 |
| S+EA+est | 0  | 53-250   | 38,9 |
| S+EA+est | 0  | <53      | 55,6 |
| S+EA+est | 15 | >2000    | 24,1 |
| S+EA+est | 15 | 250-2000 | 33,1 |
| S+EA+est | 15 | 53-250   | 36,1 |
| S+EA+est | 15 | <53      | 55,6 |
| S+EA+est | 30 | >2000    | 17,0 |
| S+EA+est | 30 | 250-2000 | 23,7 |
| S+EA+est | 30 | 53-250   | 26,2 |
| S+EA+est | 30 | <53      | 53,7 |
| S+EA+est | 45 | >2000    | 6,3  |
| S+EA+est | 45 | 250-2000 | 9,4  |
| S+EA+est | 45 | 53-250   | 13,2 |
| S+EA+est | 45 | <53      | 43,4 |

(Conclusión datos porcentajes de agregados estables al agua para todos los tiempos y tratamientos)