

## RESPUESTA DE LA COMUNIDAD MICROBIANA AL BIOTRATAMIENTO DE UN SUELO CONTAMINADO CON UN CRUDO MEDIANO

Alejandra Carolina ZAMORA FIGUEROA<sup>1\*</sup>, Jesús Roberto RAMOS OROPEZA<sup>1</sup>,  
Marianela ARIAS<sup>2</sup> e Ismael HERNÁNDEZ VALENCIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Centro de Ecología Aplicada, Instituto de Zoología y Ecología Tropical, Universidad Central de Venezuela. Apartado Postal 47058, Caracas 1041-A, Venezuela

<sup>2</sup> Instituto de Tecnología Venezolana para el Petróleo. Apartado Postal 76343, Caracas 1070-A, Venezuela

\*Autor para correspondencia: alejandra.zamora@ciens.ucv.ve

*(Recibido mayo 2016; aceptado mayo 2017)*

Palabras clave: biodegradación de petróleo, microorganismos, diversidad funcional, biomarcadores

### RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios luego de 120 días en el contenido de hidrocarburos de petróleo y en la actividad de las comunidades microbianas de un suelo contaminado al 9 % (m/m) con un crudo de 24.3 ° de acuerdo con la clasificación del American Petroleum Institute (API). Se establecieron tres tratamientos: a) suelo fertilizado (F: suelo contaminado y con fertilización orgánica e inorgánica), suelo no fertilizado (SF: suelo contaminado sin fertilización) y testigo abiótico (TA: suelo contaminado, fertilizado y esterilizado). Se determinó el contenido de aceites y grasas, los biomarcadores pristano y fitano y sus relaciones con los hidrocarburos de 17 y 18 átomos de carbono para identificar procesos de biodegradación, la respiración basal y el uso de sustratos orgánicos específicos por los microorganismos. Se encontró que la disminución en el contenido de aceites y grasas siguió el orden F > SF > TA. Los análisis de biomarcadores indicaron que la transformación del petróleo en el tratamiento fertilizado fue mayor respecto a los otros tratamientos evaluados. También se encontraron diferencias en los patrones de utilización de sustratos por los microorganismos en los tratamientos fertilizado y no fertilizado, con una disminución de la diversidad funcional en el tratamiento sin fertilización. Se concluye que la estructura funcional de la comunidad microbiana del suelo fertilizado al ser más estable, fue más eficiente degradando el crudo contaminante.

Key words: petroleum, biodegradation, microorganisms, functional diversity, biomarkers

### ABSTRACT

The aim of this study was to assess the changes after 120 days in the petroleum hydrocarbon content and the activity of microbial communities in a contaminated soil (9 % w/w) with oil crude of 24.3 ° according to the classification of the American Petroleum Institute (API). Three treatments were established: a) fertilized soil (F: contaminated soil with organic and inorganic fertilization), unfertilized soil (SF: contaminated soil without fertilization) and abiotic control (TA: contaminated soil fertilized and sterilized). The content of oils and greases, the pristane and phytane biomarkers and their relationships

with hydrocarbons of 17 and 18 carbon atoms to identify biodegradation processes, basal respiration and use of specific organic substrates by microorganisms were determined. We found that the decrease in the content of oils and greases followed the order  $F > SF > TA$ . The biomarker analysis indicated that the conversion of petroleum in the fertilized treatment was higher compared to the other treatments evaluated. Differences in patterns of substrate utilization by microorganisms in treatments fertilized and unfertilized were also found with a decreased in functional diversity in treatment without fertilizer. We conclude that the functional structure of the microbial community was more stable in fertilized soil, and consequently more efficient degrading the oil crude contaminant.

## INTRODUCCIÓN

La contaminación de los suelos por los hidrocarburos de petróleo es uno de los principales objetivos en el desarrollo de tecnologías de remediación debido a los pasivos ambientales que se generan durante las actividades de exploración, producción, transporte y refinación, y los daños que producen a los ecosistemas y al hombre (Infante et al. 2012). En Venezuela se ha empleado la tecnología de biorremediación para recuperar suelos contaminados y tratar grandes cantidades de desechos (Infante et al. 2010). Esta técnica se basa en la estimulación de la actividad microbiana para disminuir o suprimir las fracciones tóxicas de los hidrocarburos (García et al. 2012).

La eficiencia de la biorremediación depende no sólo de la presencia en el suelo de microorganismos con capacidad de biodegradar los hidrocarburos, sino también de condiciones físicas y químicas adecuadas en los suelos, especialmente las condiciones nutricionales que permitan la proliferación y mantenimiento en el tiempo de estos microorganismos, pues nutrientes tales como el fósforo y el nitrógeno, tienden a ser limitantes para la actividad microbiana, afectando el proceso de biodegradación (Das y Chandran 2011).

Los hidrocarburos en el ambiente son biodegradados principalmente por bacterias, levaduras y hongos. En tal sentido, se ha indicado que la eficiencia de biodegradación de estos compuestos está en el intervalo de 6 % a 82 % para los hongos y hasta un 50 % para las bacterias (Pinholt et al. 1979, Das y Chandran 2011). Venezuela cuenta con grandes reservas de petróleo que se encuentran en áreas donde predominan sabanas, en consecuencia son altos los riesgos de degradación de estos ecosistemas por derrames y disposición inadecuada de hidrocarburos. Ello a su vez justifica las investigaciones sobre el efecto de este tipo de contingencias ambientales sobre la actividad microbiana del suelo, pues la estructura funcional de comunidades microbianas basada en las características metabólicas de los microorganismos

como respuesta de su expresión genética, ha sido ampliamente utilizada como indicador biológico debido a su capacidad de proveer información integrando diversos factores ambientales (Zamora et al. 2012a). Así, la diversidad funcional comprende el conjunto de capacidades metabólicas presentes en un ambiente y aun cuando no requiere de conocimientos detallados acerca de la identidad de los microorganismos involucrados, expresa su actividad dentro del ecosistema (Zak et al. 1994), con la ventaja que puede cuantificarse a través de índices, permitiendo comparar diferentes comunidades o la misma comunidad en el tiempo (Zamora et al. 2012b).

Con base en lo antes expuesto, este trabajo se orientó a evaluar los cambios en la actividad de las comunidades microbianas de un suelo de sabana contaminado con un crudo mediano luego de 120 d de tratamiento y las condiciones para mejorar la biodegradación del hidrocarburo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Diseño experimental

El suelo para el ensayo provino de los primeros 15 cm del perfil del horizonte superficial de un Typic Paleustults, franco arenoso, pH de 6.36 (1:1 en agua) y bajos contenidos de N (1.17 %) y P disponible (0.38 ppm), procedente de Santa Bárbara, estado Monagas, Venezuela, localidad en donde predominan ecosistemas de sabanas. El crudo utilizado fue un crudo reformulado mediano de 24.3 ° de acuerdo con la clasificación del American Petroleum Institute (API), proveniente de una mezcla de un crudo pesado (Urdaneta de 19.1 ° API) y un crudo liviano (Mesa de 29.9 ° API). La composición del crudo fue de 36.2 % de saturados, 40.3 % de aromáticos, 19.4 % de resinas y 4.1 % de asfaltenos.

Se establecieron tres tratamientos:

- i) Sin fertilización (SF): suelo contaminado con crudo al 9 % (m/m)

- ii) Con fertilización (F): suelo contaminado con crudo al 9 % (m/m) y fertilizado al inicio del ensayo con fertilizante inorgánico comercial de nitrógeno-fósforo-potasio (NPK): 15:15:15 y hojarasca de mango (*Mangifera indica*) obtenidas en el área de muestreo. La dosis de fertilización fue de 1.73 g de NPK y 12.74 g de hojarasca seca por cada 1 kg de suelo contaminado. La cantidad de fertilizante agregado corresponde a las relaciones C:N 150:1 y N:P:K 4:1:1 recomendadas por Deuel y Holliday (1997). El fertilizante inorgánico aportó el 55 % del N y el 100 % de P y K, mientras que la hojarasca aportó el 45 % del N restante.
- iii) Testigo abiótico (TA): suelo contaminado con crudo al 9 % (m/m), fertilizado de manera similar a F y esterilizado en autoclave (1 h, 121 °C, 1.5 atm).

Cada tratamiento contó con tres réplicas que consistieron en bandejas con 4 kg de las mezclas. Los tratamientos fueron ubicados en un invernadero con temperatura promedio de 27 °C, sometidos a riego (con agua destilada estéril) hasta 60 % de la capacidad de campo del suelo y aireados con rastrillo dos veces por semana durante 120 d. Para evaluar los cambios en las variables seleccionadas se tomaron muestras de cada réplica de los tratamientos al inicio y a los 120 d de iniciado el ensayo. Los análisis microbiológicos se realizaron inmediatamente, mientras que las muestras para los análisis químicos se refrigeraron (4 °C) hasta su procesamiento en el laboratorio. Los análisis realizados fueron:

#### Contenido de aceites, grasas y biomarcadores

Los cambios en el contenido de hidrocarburos se estimaron a través de la determinación de la concentración de aceites y grasas, mediante el método 3540B (EPA 1994), utilizando un sistema de extracción Soxhlet y diclorometano como solvente. Para la extracción se tomaron 5 g de suelo y 200 mL de diclorometano, colocándose esta mezcla en el sistema de extracción Soxhlet durante 8 h en reflujo. Luego, se separó el extracto del solvente aplicándole rotavapor al balón. La masa de aceites y grasas se determinó por la diferencia de peso con el balón de destilación.

De los extractos obtenidos, así como del crudo utilizado, se separaron las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (SARA) de acuerdo con el método 5520 (APHA 1998), usando un equipo Water 600 de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). Para el estudio de los biomarcadores, la fracción de saturados fue analizada en un cromatógrafo de gases HP6890

con columna capilar de metil silicona y detector de ionización a la llama (FID, por sus siglas en inglés). La programación de temperatura durante la cromatografía fue de 8 °C por min, la temperatura del detector se mantuvo en 360 °C, la del inyector fue de 300 °C y la columna de 70 a 340 °C. Se obtuvieron los cromatogramas de los n-alcenos e isoprenoides pristano y fitano. A partir de las áreas se calcularon las relaciones de los biomarcadores con los hidrocarburos normales de 17 y 18 átomos de carbono para identificar procesos de biodegradación (Kaufman et al. 1990, Marteau et al. 2002).

#### Respiración basal

Se empleó el método de la trampa de álcali (Anderson e Ingram 1989). El CO<sub>2</sub> producido por el suelo durante 24 h y absorbido por 5 mL de NaOH 0.1 N, se calculó a través de la titulación con HCl 0.1 N en presencia de fenolftaleína como indicador, previa precipitación del exceso de carbonatos con 5 mL de BaCl<sub>2</sub> 0.5 N.

#### Caracterización funcional de la comunidad microbiana

Se utilizaron ecoplaques Biolog® para determinar los patrones de utilización de sustratos orgánicos en la comunidad microbiana de cada tratamiento, utilizando una modificación del procedimiento de Glimm et al. (1997). Cada placa contenía 31 sustratos orgánicos diferentes y una celda blanco. Las fuentes de carbono incluyeron aminoácidos, carbohidratos, ácidos carboxílicos, polímeros y varios compuestos misceláneos (**Cuadro I**). La utilización de las fuentes de carbono fue medida a través de la reducción de cloruro de tetrazolio, un indicador redox que cambia de color de transparente a púrpura (Zak et al. 1994).

Para la obtención de los inóculos microbianos que se utilizaron en esta prueba se colocaron 5 g de suelo de cada uno de los tratamientos en 45 mL de solución salina estéril (0.85 % de NaCl) y se agitó durante 1 h. La suspensión obtenida se diluyó en solución salina hasta 10<sup>-4</sup>. En cada celda de la ecoplaque se inoculó una alícuota de 150 µL y luego de 72 h de incubación se determinó la absorbancia a 595 nm de cada celda utilizando un fotómetro de microplacas (BioTek®). Se consideraron positivos aquellos valores de absorbancia por encima de 0.2 unidades (Garland y Mills 1991). Para los datos de absorbancia de BIOLOG® se calculó el promedio de desarrollo de color (AWCD, por sus siglas en inglés) para cada celda (Garland y Mills 1991, Glimm et al. 1997). El valor de absorbancia obtenido a las 48 h, fue dividido por el AWCD calculado, para eliminar la influencia

**CUADRO I.** AGRUPACIONES GREMIALES DE FUENTES DE CARBONO DETERMINADAS EN LAS ECOPLACAS DE BIOLOG®

Carbohidratos	Polímeros	Ácidos carboxílicos	Aminas	Aminoácidos
Ácido purúvico-metil-éster	Glicógeno	Ácido D-galactónico- $\gamma$ -lactona	Putrescina	L-treonina
$\beta$ -metil-D-glucósido	Tween 80	D-ácido galacturónico	Feniletilamina	L-serina
i-eritritol	Tween 40	Ácido 2-hidroxibenzoico		L-fenilalanina
D-xilosa	$\alpha$ -ciclodextrina	Ácido 4-hidroxibenzoico		L-asparagina
D-manitol		Ácido $\gamma$ -hidroxibutírico		L-arginina
N-acetil-glucosamina		Ácido D-glucosamínico		Ácido glicil-L-glutámico
D-celobiosa		Ácido D-málico		
$\alpha$ -D-lactosa		Ácido $\alpha$ -ketobutírico		
Glucosa-1-fosfato		Ácido itacónico		
D,L- $\alpha$ -glicerolfosfato				

Fuente: Weber y Legge (2009)

de la densidad del inóculo en las placas. Asimismo, se determinaron la riqueza de sustratos (S) entendida como la variedad de sustratos que son aprovechados por la comunidad microbiana, la diversidad funcional ( $H'$ ) de acuerdo con el índice de Shannon-Weaver ( $H' = -\sum p_i \ln p_i$ , donde  $p_i$  es el valor de densidad óptica por cada sustrato) y la equidad catabólica (E) o el grado de preferencia hacia los diferentes sustratos ( $E = H / H_{\max} = H / \log S$ ) (Zak et al. 1994).

### Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza de un factor para determinar las diferencias en el contenido de aceites y grasas y también se estimó la diversidad funcional en los diferentes tratamientos, tanto al inicio como al final del experimento. Se empleó la prueba de la diferencia honestamente significativa (HSD, por sus siglas en inglés) de Tukey para determinar diferencias estadísticamente significativas con  $\alpha = 0.05$  entre los tratamientos. Con la finalidad de determinar las diferencias de los perfiles fisiológicos entre las comunidades microbianas de los tratamientos, se realizó un análisis de componentes principales (ACP), con base en los valores de absorbancia ajustados. Los análisis estadísticos se realizaron con el programa libre PAST 3.04 (Hammer y Harper 2001).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Contenido de hidrocarburos y efectividad de la biodegradación

El **cuadro II** muestra el contenido de aceites y grasas, así como la reducción del hidrocarburo al final de la incubación. El valor inicial de aceites y grasas fue de 8.8 %, lo que implica una recuperación del 98 %, que es satisfactorio. Luego de 120 d se observó

una disminución en el contenido de aceites y grasas para cada tratamiento, siendo mayor en F, seguido de SF y menor en TA ( $p < 0.05$ ). Este resultado evidencia el papel tanto de los microorganismos como del aporte de nutrientes en el proceso de descontaminación del suelo.

**CUADRO II.** CONTENIDO DE ACEITES Y GRASAS Y REDUCCIÓN EN EL CONTENIDO DE HIDROCARBUROS (HC)  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR EN CADA TRATAMIENTO EVALUADO

Tratamiento	Aceites y grasas (%)		Reducción de HC (%)
	1 d	120 d	
TA		6.83 $\pm$ 0.06 b	22.65 $\pm$ 0.70 a
F	8.83 $\pm$ 0.08a	5.53 $\pm$ 0.10 c	37.37 $\pm$ 1.19 c
SF		6.04 $\pm$ 0.09 d	31.60 $\pm$ 1.04 b

Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas. TA = testigo abiótico, SF = sin fertilización, F = con fertilización

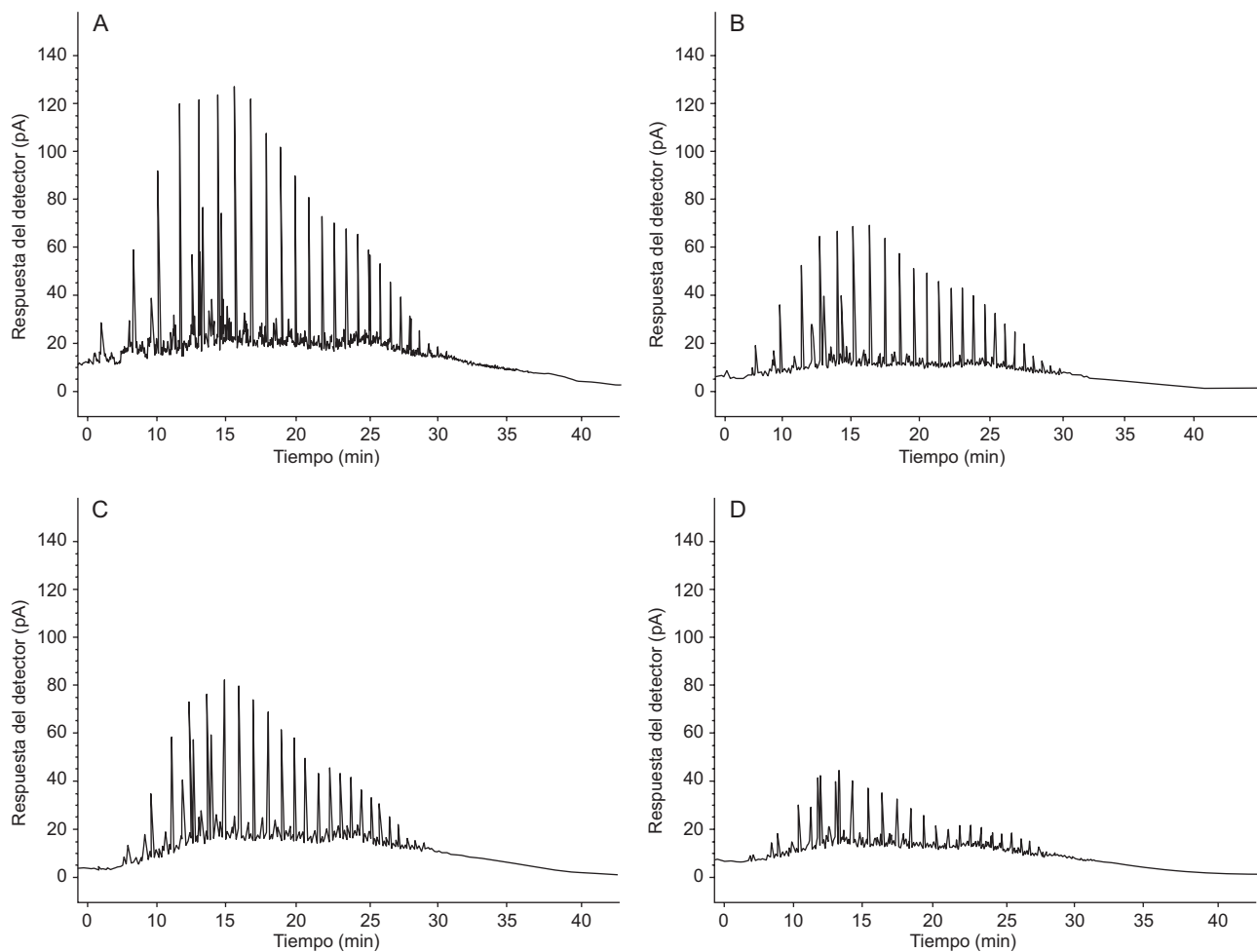
La tasa de descontaminación en el suelo fertilizado (37 %) fue muy similar a la obtenida por Mager y Hernández-Valencia (2013). Estos autores encontraron en un suelo contaminado al 3 % con crudo de 27.2° API, fertilizado y de similares características de textura al de este estudio, que luego de 120 d, el contenido de aceites y grasas se redujo en 39 %. Sin embargo, en el trabajo mencionado se usó apenas un tercio del crudo que se utilizó en este estudio, lo que implica un efecto tóxico menor sobre las comunidades microbianas. Adicionalmente, la fertilización fue fraccionada (0, 15, 30 y 45 d) y con fuentes inorgánicas solubles como urea y fosfato diamónico, de disponibilidad inmediata para los microorganismos. Por otra parte, el crudo utilizado

en este estudio tiene mayor proporción de compuestos recalcitrantes como resinas y asfaltenos. Todos estos elementos apuntan sobre el papel de la hojarasca como fuente alternativa de carbono para los microorganismos, lo que contribuye a la descontaminación del suelo.

La comparación del contenido de aceites y grasas entre los tratamientos con fertilización (F) y sin fertilización (SF), evidencia la importancia de la adición de nutrientes, ya que incrementa el porcentaje de degradación en 13 %. Resultados similares fueron obtenidos por Atlas (1981) y García et al. (2012), quienes encontraron una mayor tasa de biodegradación en suelos fertilizados y aireados frecuentemente, respecto a otros que no presentaron esta condición. Por otra parte, cuando se comparan los valores de aceites y grasas entre TA y F y entre TA y SF, se deduce que los microorganismos contribuyen con un 37 y 32 %, respectivamente en la disminución

del contenido de aceites y grasas. En F la mayor reducción del contenido de aceites y grasas no es sólo favorecida por la fertilización inorgánica, sino también podría estar asociada con la adición de hojarasca que mejora la estructura y aireación del suelo y en consecuencia, la actividad microbiana (Kauppi et al. 2011). En ese sentido, se ha demostrado que el contacto microorganismo-hidrocarburo es clave en el proceso de biorremediación (Andreas 2010). El uso de agentes estructurantes biodegradables, aumenta la retención de la humedad, reduce la lixiviación del hidrocarburo y mejora el contacto entre los microorganismos y el hidrocarburo (García et al. 2012).

Los análisis cromatográficos de n-alcenos e isoprenoides mostrados en la **figura 1**, indican que la transformación del hidrocarburo en F es mayor respecto a SF, TA y a la muestra de crudo inalterada (testigo). Al respecto, el cálculo de las relaciones



**Fig. 1.** Descomposición de saturados determinada a través de cromatografía de gases para los distintos tratamientos al finalizar el periodo de incubación. A = muestra de crudo utilizado, B = testigo abiótico a los 120 d, C = sin fertilización a los 120 d, D = con fertilización a los 120 d



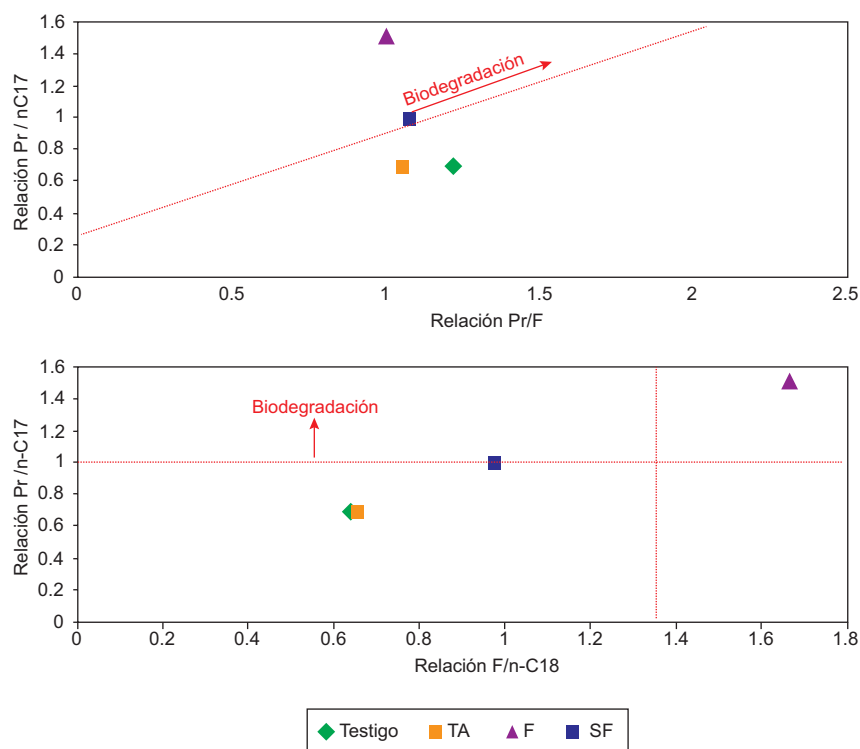
entre los isoprenoides respecto a los n-alcános de 17 y 18 átomos de carbono, permite identificar estos procesos de transformación. Particularmente procesos de evaporación y biodegradación, así como la susceptibilidad de los hidrocarburos remanentes a la degradación (**Cuadro III**). El pristano y el fitano son resistentes a la biodegradación respecto a n-C<sub>17</sub> y n-C<sub>18</sub>, que actúan como coeluyentes (Peters et al. 2005), por lo que las relaciones deben aumentar a medida que avanza el proceso de biodegradación.

**CUADRO III.** RELACIONES ENTRE ISOPRENOIDES Y N-ALCANOS EN LOS TRATAMIENTOS EVALUADOS LUEGO DE 120 DÍAS

Muestra	Pr/F	Pr/n-C <sub>17</sub>	F/n-C <sub>18</sub>	n-C <sub>29</sub> /n-C <sub>17</sub>
Testigo	1.219	0.694	0.639	0.300
TA	1.050	0.688	0.666	0.429
F	1.001	1.507	1.667	0.291
SF	1.079	0.990	0.974	0.372

Testigo = muestra del crudo utilizado, TA = testigo abiótico, SF = sin fertilización, F = con fertilización, Pr = Pristano, F = Fitano, n-C<sub>x</sub> = hidrocarburo normal de x átomos de carbono (n-alcános)

Con base en lo anterior, se encontró que F presentó una relación Pr/n-C<sub>17</sub> mayor respecto a los demás tratamientos y el testigo. Ello indica la biodegradación del hidrocarburo, mientras que en SF la relación Pr/n-C<sub>17</sub> es cercana a la unidad, lo que señala un menor efecto de la biodegradación (**Cuadro III**). Este aspecto también se ve reflejado en las relaciones F/n-C<sub>18</sub>, en las cuales se observa la misma tendencia creciente asociada con procesos de biodegradación (Bonazountas y Kallidromitou 1993, García et al. 2012). Asimismo, la relación entre los hidrocarburos de cadena lineal n-C<sub>29</sub>/C<sub>17</sub> permiten cuantificar en forma diferenciada la biodegradación y el fraccionamiento evaporativo (Marteau et al. 2002, Peters et al. 2005). Se observaron valores altos en cuanto a la relación n-C<sub>29</sub>/n-C<sub>17</sub> en TA respecto a los demás tratamientos, lo que sugiere que podría estar asociado con la transformación del hidrocarburo por evaporación, que parece ser mayor en ausencia de actividad biológica (**Cuadro III**). La relación entre los isoprenoides y los n-alcános obtenida para cada uno de los tratamientos, se muestra en la **figura 2**. Se pueden observar las diferentes transformaciones del hidrocarburo, resaltando que en F se presentó



**Fig. 2.** Comparación de las relaciones entre isoprenoides y n-alcános de los hidrocarburos extraídos de los tratamientos. Pr = pristano, F = fitano, n-C<sub>x</sub> = n-alcano de x átomos de carbono, Testigo = muestra de crudo utilizado, TA = testigo abiótico a los 120 d, SF = sin fertilización a los 120 d, F = con fertilización a los 120 d

una mayor tasa de biodegradación respecto a SF y ello evidencia que la fertilización facilita la biodegradación del hidrocarburo, similar a lo observado por Infante et al. (2010).

### Respuesta de la comunidad microbiana a los tratamientos

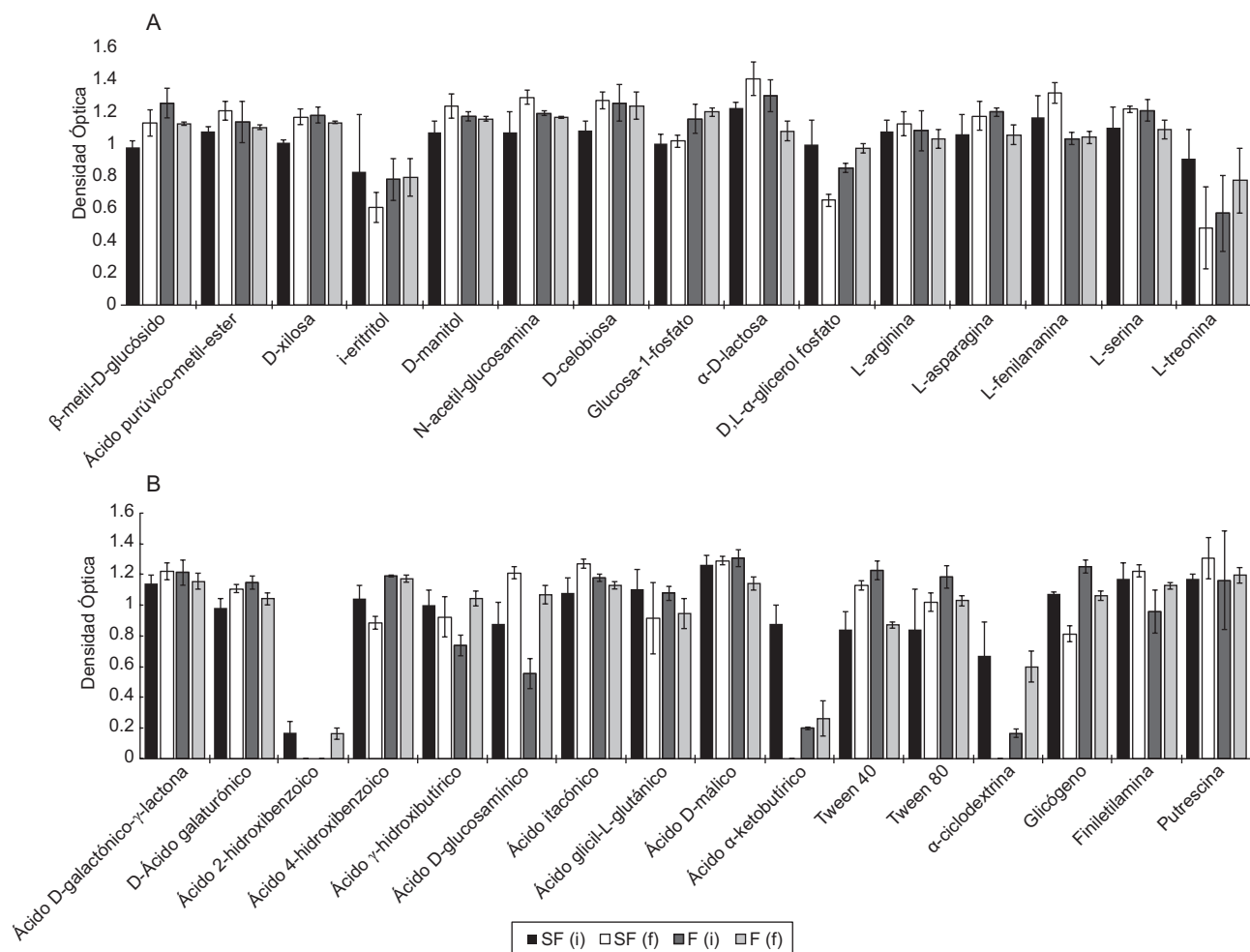
Los resultados del **cuadro IV** muestran que la respiración basal del suelo es similar en SF y F al inicio del experimento, e incrementa luego de 120 d de incubación ( $p < 0.05$ ). Este resultado sugiere que luego de este periodo aún hay C mineralizable proveniente del hidrocarburo en SF y del hidrocarburo y la hojarasca en el caso de F. Adicionalmente, la respiración basal fue mayor en F respecto a SF ( $p < 0.05$ ), hecho que reafirma el papel estimulador de la fertilización sobre la actividad microbiana. En TA no se detectó actividad microbiológica por haber sido esterilizado.

**CUADRO IV.** RESPIRACIÓN BASAL  $\pm$  DESVIACIÓN ESTÁNDAR EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS EVALUADOS

Tratamiento	mgCO <sub>2</sub> / m <sup>2</sup> d	
	Inicio	120 d
TA	ND	ND
F	0.096 $\pm$ 0.02 a	0.246 $\pm$ 0.02 c
SF	0.098 $\pm$ 0.01 a	0.184 $\pm$ 0.01 b

Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas. TA = testigo abiótico, SF = sin fertilización, F = con fertilización, ND = no detectado

La **figura 3** muestra los perfiles de utilización de sustratos orgánicos de las comunidades microbianas asociadas con los tratamientos F y SF para los dos tiempos de incubación evaluados. Mientras que la



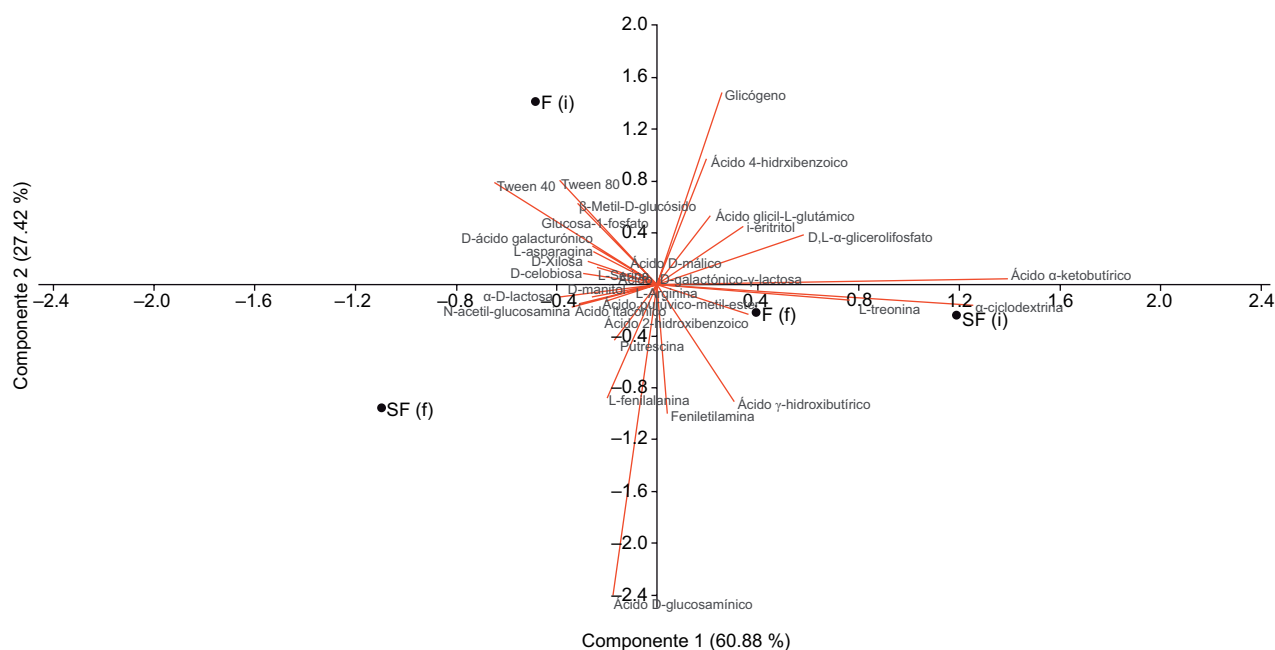
**Fig. 3.** Comparación de los perfiles fisiológicos asociados a la comunidad microbiana en los tratamientos. A = carbohidratos y aminoácidos, B = ácidos carboxílicos, polímeros y aminas, SF = sin fertilización, F = con fertilización, (i) inicio, (f) 120 d. Las barras indican la desviación estándar

**figura 4** representa el análisis de ordenación de los datos de BIOLOG<sup>®</sup>. No se analizó el tratamiento TA, ya que éste fue esterilizado y no mostró actividad microbiológica en la evaluación de respiración basal. Se puede observar las diferentes posiciones de los tratamientos en el plano de los dos primeros componentes (88.3 % de la varianza explicada). La comunidad microbiana en SF al inicio del experimento mostró un perfil fisiológico que refleja el uso de todos los sustratos presentes en la ecoplaca (**Fig. 3**). En especial, el uso de carbohidratos (D,L- $\alpha$ -glicerolfosfato), polímeros ( $\alpha$ -ciclodextrina), aminoácidos (L-treonina) y ácidos carboxílicos (ácido  $\alpha$ -ketobutírico) (**Fig. 4**).

Luego de 120 d de incubación, la riqueza de sustratos utilizados por la comunidad de SF es menor (**Cuadro V**). Se destaca la ausencia de uso de sustratos tales como ácido-2-hidroxibenzoico, ácido  $\alpha$ -ketobutírico y  $\alpha$ -ciclodextrina (**Fig. 3**). En ese sentido,

se determinó que la comunidad mostró un consumo de sustratos diferente. En particular: carbohidratos (D-xilosa,  $\beta$ -metil-D-glucósido), ácidos carboxílicos (ácido 4-hidroxibenzoico, D-ácido galacturónico, ácido itacónico, ácido D-galactónico- $\gamma$ -lactona) y aminoácidos (L-serina y L-asparagina). Este cambio temporal del perfil fisiológico indica un cambio en la estructura funcional de la comunidad, que se reflejó en una menor diversidad funcional (**Cuadro V**).

Por su parte, la comunidad microbiana en F al inicio del experimento mostró un perfil fisiológico representado por una riqueza de sustratos menor a la ofertada en la ecoplaca (**Cuadro V**) y que estuvo asociado con la no utilización de ácido-2-hidroxibenzoico y con una baja intensidad en el uso de ácido  $\alpha$ -ketobutírico y de  $\alpha$ -ciclodextrina (**Fig. 3**). El perfil fisiológico de esta comunidad se caracterizó por el uso de carbohidratos ( $\alpha$ -D-lactosa), aminoácidos (ácido glicil-L-glutámico,



**Fig. 4.** Análisis de componentes principales de los perfiles fisiológicos asociados a la comunidad microbiana en los tratamientos. SF = sin fertilización, F = con fertilización, (i) inicio, (f) 120 d

**CUADRO V.** ANÁLISIS FUNCIONAL DE LAS COMUNIDADES MICROBIANAS EN CADA TRATAMIENTO

	Sin fertilización		Con fertilización	
	Inicio	120 d	Inicio	120 d
Riqueza de sustratos	31	27	28	29
Equidad de sustratos	1.309 ± 0.018a	1.275 ± 0.011b	1.217 ± 0.020c	1.213 ± 0.004c
Índice de diversidad Shannon-Weaver	4.495 ± 0.062a	4.291 ± 0.037b	4.201 ± 0.018c	4.211 ± 0.082bc

Letras distintas para el mismo parámetro indican diferencias significativas. Se presentan las medias ± desviación estándar



L-asparagina), polímeros (glicógeno, tween 80 y tween 40) y ácidos carboxílicos (ácido D-málico) (**Fig. 4**). Luego de 120 d, el perfil fisiológico fue diferente. Se caracterizó por el uso de carbohidratos (D,L- $\alpha$ -glicerolfosfato, i-eritritol), aminoácidos (L-treonina), polímeros ( $\alpha$ -ciclodextrina), aminas (feniletilamina), y ácidos carboxílicos (ácido  $\gamma$ -hidroxibutírico, ácido D-glucosamínico). Destaca el uso de ácido  $\alpha$ -ketobutírico y de  $\alpha$ -ciclodextrina (**Fig. 3**).

Aún cuando el perfil fisiológico fue diferente en F, con un evidente cambio en la estructura funcional de la comunidad (**Figs. 3 y 4**), el valor del índice de diversidad funcional no mostró variaciones significativas (**Cuadro V**). De hecho, los resultados de la H' y de la E, muestran que en SF, ambas estimaciones disminuyen significativamente luego de 120 d de incubación ( $p < 0.05$ ). Lo anterior se atribuye al efecto tóxico de los hidrocarburos sobre la microbiota (Atlas 1981), que promueve la selectividad de algunas poblaciones capaces de tolerar la presencia del hidrocarburo y se modifica la estructura de la comunidad. Resultados similares fueron citados por Zamora et al. (2012a) quienes encontraron que la generación de compuestos tóxicos provenientes de los hidrocarburos, producen cambios en la estructura funcional de la comunidad bacteriana. La comunidad es menos diversa desde el punto de vista funcional, ya que los grupos funcionales son más parecidos entre sí.

Por otro lado en F, la H' y la E no presentaron diferencias significativas entre el inicio y el final del experimento (**Cuadro V**;  $p > 0.05$ ). La diferencia con SF radica en que la fertilización podría favorecer la estabilidad de la comunidad microbiana del suelo. A pesar de que en F el suelo está contaminado con hidrocarburos al igual que en SF, la adición de hojarasca como fertilizante implica una fuente alternativa y no tóxica de sustratos orgánicos para los microorganismos. Esta hojarasca permite la permanencia de un mayor número de grupos funcionales y mitiga el impacto del crudo sobre la actividad microbiana (Nyman 1999). Esto se refleja en una H' y E similar al inicio y al final del experimento. Aunque las **figuras 3 y 4** muestran que los patrones de utilización de sustratos son diferentes en todos los casos, el **cuadro V** indica que la H' tiende a ser menos variable en presencia de hojarasca. Adicionalmente, el análisis de ordenación (**Fig. 4**) muestra que  $F_{(t)}$  es más parecido a  $SF_{(i)}$ , lo cual podría sugerir que la fertilización propicia la resiliencia funcional de la comunidad microbiana del suelo.

Estos resultados muestran que la contaminación con hidrocarburos, así como la biodegradación del contaminante, afectan la dinámica de la comunidad

microbiana del suelo. Se propician cambios en el tiempo en estas comunidades como respuesta a los cambios en la composición del contaminante debido a la degradación o a fenómenos de transporte (Hama-mura et al. 2013). Sobre este aspecto, autores como Kaufmann et al. (2004) y Zamora et al. (2012a), indican que después de la contaminación con hidrocarburos se produce un incremento de la comunidad microbiana y una disminución en la diversidad. Lo anterior dado por la selectividad de algunos organismos capaces de adaptarse y utilizar los nuevos sustratos. Los componentes tóxicos de los hidrocarburos podrían inhibir la expresión de algunos miembros de la comunidad bacteriana al favorecer la dominancia de otros grupos (Yu et al. 2011), lo que se refleja en la diversidad funcional (Zamora et al. 2012a).

## CONCLUSIONES

La fertilización favorece la actividad microbiana y en consecuencia la descontaminación del suelo con un crudo mediano. Los microorganismos contribuyen con el 37 % de la disminución del contenido de aceites y grasas en los suelos fertilizados y en un 32 % en los suelos sin fertilizar. Por su parte, la evaporación de componentes volátiles es mayor en ausencia de actividad microbiológica. La contaminación tuvo un efecto negativo sobre la diversidad funcional de la comunidad microbiana luego de 120 d. Sin embargo, aún cuando los resultados encontrados muestran diferencias en la estructura funcional de las comunidades microbianas, la combinación de fertilizantes inorgánicos y orgánicos atenuó los cambios en la diversidad funcional, al propiciar la resiliencia funcional de la comunidad microbiana del suelo.

## AGRADECIMIENTOS

Al personal del Laboratorio de Tratabilidad de Desechos Sólidos del Instituto de Tecnología Venezolana para el Petróleo (INTEVEP) por su colaboración en la realización de los análisis de laboratorio. A los revisores anónimos cuyos valiosos comentarios contribuyeron a mejorar la redacción de este manuscrito.

## REFERENCIAS

Anderson J. e Ingram J. (1989). Tropical soil biology and fertility: A handbook of methods. CAB International. Wallingford, Inglaterra, 171 pp.

- Andreas H., KajHenriksen K., Mortensen L., Scow K y Moldrup P. (2010). Soil physical constraints on intrinsic biodegradation of petroleum vapors in a layered subsurface. *Vadose Zone J.* 9 (1), 137-147.  
DOI: 10.2136/vzj2009.0010
- Atlas R. (1981). Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiol. Rev.* 45 (1), 180-209.
- APHA (1998). Standard methods for the examination of water and wastewater. 20va ed. Método 5520. American Public Health Association. Washington D.C., EUA, 1325 pp.
- Bonazountas M. y Kallidromitou D. (1993). Mathematical hydrocarbon fate modelling in soil systems. En: Principles and practices for petroleum contaminated soils. (E. Calabrese y P. Kostecki P, Eds). Lewis Publishers. Boca Ratón, EUA, pp. 131-322.
- Das N. y Chandran P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: An overview. *Biotech. Res. Int.* 2011, 1-13. DOI: 10.4061/2011/941810
- Deuel L. y Holliday G. H. (1997). Soil remediation for the petroleum extraction industry. Pennwell, Tulsa, EUA, 242 pp.
- García M.G., Infante C. y López L. (2012). Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro* 24 (2), 93-102.
- Garland J.L. y Mills A.L. (1991). Classification and characterization of heterotrophic microbial communities on the basis of patterns of community level sole-carbon-source utilization. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (8), 2351-2359.
- Glimm E., Heuer H., Engelen B., Smalla K. y Backhaus H. (1997). Statistical comparisons of catabolic profiles. *J. Microbiol. Meth.* 30 (1), 71-80.  
DOI: 10.1016/S0167-7012(97)00046-8
- Hamamura N., Ward D.M. e Inskeep W.P. (2013). Effects of petroleum mixture types on soil bacterial population dynamics associated with the biodegradation of hydrocarbons in soil environments. *FEMS Microbiol. Ecol.* 85 (1), 168-178. DOI: 10.1111/1574-6941.12108
- Hammer Ø. y Harper D.A. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol. Electron.* 4 (1), 9.
- Infante C., Hernández-Valencia I., López L. y Toro M. (2012). Phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils in Venezuela. En: *Phytotechnologies: Remediation of environmental contaminants.* (N.A. Anjum, M.E. Pereira, I. Ahmad, A. C. Duarte, S. Umar. y N.A. Khan, Eds). CRC Press, Nueva York, EUA, pp. 99-112.
- Infante C., Morales F., Ehrmann U., Hernández-Valencia I. y León N. (2010). Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuela Case of Study. En: *Trends in bioremediation and phytoremediation.* (G. Plaza, Ed.). Research Signpost, Kerala, India, pp. 429-451.
- Kaufman R.L., Ahmed A.S. y Elsinger R.J. (1990). Gas chromatography as a development and production tool for fingerprinting oils from individual reservoirs: applications in the Gulf of Mexico. *Memorias 9th Annual Research Conference of the Society of Economic Paleontologists and Mineralogists.* Nueva Orleans, EUA. 1 octubre, 1990, pp. 263-282.
- Kaufmann K., Christophersen M., Buttler A., Harmsy H. y Höhener P. (2004). Microbial community response to petroleum hydrocarbon contamination in the unsaturated zone at the experimental field site Værløse, Denmark. *FEMS Microb. Ecol.* 48 (3), 387-399.  
DOI: 10.1016/j.femsec.2004.02.011
- Kauppi S., Sinkkonen A. y Romantschuk M. (2011). Enhancing bioremediation of diesel-fuel contaminated soil in a boreal climate: Comparison of biostimulation and bioaugmentation. *Int. Biodeter. Biod.* 65 (2), 359-368. DOI: 10.1016/j.ibiod.2010.10.011
- Mager D. y Hernández-Valencia I. (2013). Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)* 30, 52-71.
- Marteau V., Groba C., Romera W., Labayén I.L., Crotti M. y Bosco S. (2002). Utilización de la geoquímica de reservorios para determinar la heterogeneidad de los petróleos de producción de la Formación Rayoso, Cuenca Neuquina. *Memorias. V Congreso de Exploración y Desarrollo de Hidrocarburos, Mar del Plata, Argentina.* 29 de octubre al 2 de noviembre, 2002. CD-ROM
- Nyman J. (1999). Effect of crude oil and chemical additives on metabolic activity of mixed microbial populations in fresh marsh soils. *J. Microb. Ecol.* 37 (2), 152-162.  
DOI: 10.1007/s002489900139
- Peters K., Walters C. y Moldowan J. (2005). The biomarker guide: Biomarkers and isotopes in the environment and human history. Cambridge University Press, Cambridge, Inglaterra, 492 pp.
- Pinholt Y., Struwe S. y Kjoller A. (1979). Microbial changes during oil decomposition in soil. *Holarctic Ecol.* 2 (3), 195-200.
- USEPA (1994). Test methods for evaluating solid wastes physical/chemical methods. Method 3540B. United States Environmental Protection Agency. Manual. CD-ROM
- Weber K. y Legge R. (2009). One-dimensional metric for tracking bacterial community divergence using sole carbon source utilization patterns. *J. Microbiol. Meth.* 79 (1), 55-61. DOI: 10.1016/j.mimet.2009.07.020

- Yu S., Li S., Tang Y. y Wu X. (2011). Succession of bacterial community along with the removal of heavy crude oil pollutants by multiple biostimulation treatments in the Yellow River Delta, China. *J. Environ. Sci.* 23 (9), 1533–1543. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60585-2
- Zak J., Willig M., Moorhrad D. y Wildman H. (1994). Functional diversity of microbial communities: A quantitative approach. *Soil Biol. Biochem.* 26 (9), 1101-1108. DOI: 10.1016/0038-0717(94)90131-7
- Zamora A.C., Ramos J. y Arias M. (2012a). Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 24 (1), 5-12.
- Zamora A., Malaver N. y Ramos J. (2012b). Análisis funcional de microorganismos: un estimador de diversidad y estructura comunitaria. *Acta Biol. Venez.* 32 (1), 57-86.