



# **Trabajo de Diploma en opción al Título de Ingeniero Agrónomo**

**Título del trabajo:** Índice de Impacto Fitotóxico en *Crotalaria juncea* (L.) y *Leucaena leucocephala* (L.) como resultado de la biorremediación por la técnica de biopilas de un suelo contaminado por Hidrocarburos Totales del Petróleo

**Autor:** Ediel Pérez Moreno

**Tutor:** Dr. C. Lázaro J. Ojeda Quintana

**Curso 2021-2022**

## RESUMEN

La investigación se realizó en la Unidad Científico Tecnológica de Base “Suelos”, Barajagua, Cienfuegos. En el estudio se evaluaron los efectos que produce un suelo Pardo grisáceo contaminado con HTP (hidrocarburos totales del petróleo) tras un proceso de biorremediación por la técnica de biopilas con diferentes sustratos, sobre plántulas de las especies de leguminosas: *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria juncea*. Para ello se generó un índice de impacto fitotóxico (IIF) que integró cuatro parámetros, medidos a través de índices relativos de impacto (IRIF(x)) para las variables altura, longitud de la raíz, peso seco de la parte aérea y la raíz. Los bioensayos se realizaron bajo un diseño en Bloques al azar con ocho tratamientos y cinco réplicas, en condiciones semicontroladas. Se encontró que la emergencia de *L. leucocephala* y *C. juncea* resultó baja (40,6% y 22,46%), mientras que la supervivencia alcanzó el 88,24% y el 27,65% respectivamente. El IIF en ambas leguminosas mostró inhibición de todas las variables, con mayor incidencia en los tratamientos: Suelo + Aserrín, Suelo + Cachaza, Suelo + *Thalassia*, Suelo + Estiércol Vacuno y en el Control. Por su parte en *C. juncea* el tratamiento Suelo + Pulpa de café estimuló las variables evaluadas. Resultante del proceso de biorremediación, el IIF alcanzado indicó que *L. leucocephala* no fue tolerante a la contaminación del suelo por HTP, mientras que *C. juncea* resultó tolerante únicamente en la variante de Suelo + Pulpa de café con efectos positivos en los indicadores medidos.

Palabras claves: Índice de fitotoxicidad, legumes, biorremediación, hidrocarburos.

## ABSTRACT

The investigation was carried out in the Technological Unit Scientist of Base "Soils", Barajagua, Cienfuegos. This study assesses the toxic effects produced by a Grizzly Brown soil contaminated with Total Hydrocarbons of Petroleum (THP) resultant of a biorremediation process in biopile with a texture combination, on seedlings of legumes species: *Leucaena leucocephala* and *Crotalaria juncea*. A phytotoxic impact index (IIF) was generated, which includes four parameters measured by relative rates of impact (IRIF(x)) for variables; height, root length, aboveground biomass and root biomass. Bioassays were conducted under semi-controlled conditions out using random blocks with 8 treatments and five replications. It was found that the sprouting was low (40, 6 y 22, 46%), while survival reached percentages between 88, 24% and 27, 65% respectively. The IIF both legumes showed inhibition of all the variables, with greater incidence in the treatments: Soil + Sawdust, Soil + Cachaza, Soil + Cattle manure and in the Control. For its part, in C juncea, the Soil+ Coffe pulp treatment stimulated the variables evaluated. Resulting from the bioremediation process, the IIF index reached indicated that L. leucocephala was not tolerant to soil contamination by HTP while C. juncea was tolerant only in treatment Soil+ Coffe pulp with positive effects on the indicators measured.

Key Word: Phytotoxicity index, legumes, biorremediation, hydrocarbons

## ÍNDICE

RESUMEN .....	2
ABSTRACT .....	3
INTRODUCCIÓN .....	5
CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	9
1.1) Impacto de los hidrocarburos en el suelo .....	9
1.2) Impacto de los hidrocarburos en las plantas .....	12
1.3) Efectos de la biorremediación en los cultivos .....	17
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
CAPÍTULO III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	30
CONCLUSIONES .....	48
RECOMENDACIONES .....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	59

## **INTRODUCCIÓN**

El sector de hidrocarburos se ha expandido de manera importante en los últimos años, convirtiéndose en pieza clave del crecimiento de la economía mundial, el consumo de energía, la exploración, las reservas y la producción han aumentado de manera considerable y este es actualmente considerado como motor del crecimiento económico en varios países del mundo (Castro et al., 2014, p.102). El mayor consumo de energía a nivel mundial son los recursos no renovables como el petróleo (Maldonado et al., 2010, pp.121-136); además, es la fuente de energía más importante con el 33% del consumo mundial (Trujillo et al., 2014, pp.36-45).

Debido al crecimiento que han tenido los hidrocarburos, la contaminación por estos, ha sido de igual forma significativa (Benavides et al., 2006, p.88). Generando de esta manera graves consecuencias ambientales tanto en la flora como en la fauna. Estas sustancias tienden a acumularse y a formar una capa hidrofóbica, induciendo la fragmentación de los agregados del suelo, causando de igual forma reducción, inhibición de la cobertura vegetal y modificación las poblaciones microbianas del ambiente edáfico (Díaz et al., 2013, pp.1039-1052).

En Cuba en el año 2015 se extrajeron de diferentes yacimientos alrededor de 2 822,0 Mt de crudo y se importaron 4 407,7 Mt de petróleo, las cuales fueron transportadas hacia refinerías y centrales termoeléctricas (ONEI, 2016, p.9), grandes volúmenes que, sin un manejo adecuado pueden producir daños al medio ambiente.

El manejo inadecuado de los materiales y residuos ha generado en todo el mundo un problema de contaminación de los suelos y cuerpos de agua. Entre las más severas contaminaciones se destacan las producidas a causa de la extracción y el manejo del petróleo en todos los países productores de hidrocarburos (Wang et al., 2006, pp.339-357).

Los derrames accidentales a gran escala presentan un volumen significativo de contaminantes en todo el mundo. Lastimosamente, son varios los ejemplos que se pueden citar, entre estos está, el derrame del Exxon Valdez en Alaska en 1989 y el derrame de BP Deep water Horizon en el Golfo de México en 2010, catalogados como los dos peores desastres ambientales en la historia de los Estados Unidos, los que aún están afectando algunos de los ecosistemas marinos más productivos y vulnerables (Spier et al., 2013), citado en (Arias, 2017, pp. 411-419).

Serrano et al. (2013), reportó que la contaminación por hidrocarburos de petróleo ejerce efectos adversos sobre las plantas, genera minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, además, conduce a un deterioro de la estructura del suelo; pérdida del contenido de materia orgánica y de nutrientes minerales, tales como potasio, sodio, sulfato, fosfato, y nitrato. De igual forma, el suelo se expone a la lixiviación y erosión. La presencia de estos contaminantes, ha dado lugar a la pérdida de la fertilidad del suelo, bajo rendimiento de cosechas, y posibles consecuencias perjudiciales para los seres humanos y el ecosistema entero(pp.233-244).

Como alternativa de restauración de suelos contaminados con hidrocarburos se ha establecido la utilización de elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de contaminantes. Uno de los métodos de biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos lo constituye la ecotecnología de biopilas. Esta se utiliza para reducir las concentraciones de los Hidrocarburos del Petróleo (HTP), entre ellos los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) en suelos contaminados con hidrocarburos, a través de la biodegradación(Ferrera-Cerrato et al., 2006, pp.179-187).

La biopila se define como un proceso biológico controlado donde los contaminantes orgánicos son biodegradados y mineralizados. El proceso consiste en formar pilas con el suelo contaminado y estimular la actividad microbiana, aireando y/o adicionando nutrientes, y manteniendo la humedad (Van Deuren et al., 1997; Iturbe et al., 2002), citado por (CEAC, 2017, pp.6-7).

Existe evidencia de que las primeras prácticas de biorremediación iniciaron desde 6000 A. C. Sin embargo, el uso moderno de la biorremediación comenzó hace aproximadamente 100 años con la puesta en marcha de la planta de tratamiento de aguas residuales en Sussex, Ucrania, en 1891 (McCullough et al., 1999,p.55).

La fitorremediación como técnica biológica permite llevar a cabo la descontaminación de suelos o la depuración de aguas residuales, debido a la capacidad restauradora de algunas plantas. Dicha técnica engloba un conjunto de métodos encargados de degradar, asimilar, metabolizar o detoxificar contaminantes; mediante tratamientos in situ (Mahar et al., 2016, pp.111-121). De igual forma, la fitorremediación se basa en los procesos que ocurren naturalmente por los cuales las plantas y los microorganismos rizosféricos degradan y secuestran contaminantes orgánicos e inorgánicos (Lin y Kunli, 2016, pp.318-323) Entre los diversos métodos utilizados para fitorremediar están: fitoextracción, fitovolatilización, fitodegradación, fitoinmovilización y fitoestabilización.

Durante la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo, los microorganismos asociados a la rizósfera y aquellos denominados como simbióticos obligados, representan una alternativa biológica para incrementar el potencial de remediación de los compuestos contaminantes. El aislamiento y selección, y posterior inoculación de los ecotipos microbianos mejor adaptados (bioaumentación) a contaminantes orgánicos es una excelente alternativa con bajo costo y nulos efectos ambientales (Ferrera-Cerrato et al., 2006, pp.179-187).

La degradación de compuestos orgánicos puede ser incrementada por el empleo de plantas, la fitorremediación. Se han reportado incrementos en la degradación de hidrocarburos empleando plantas (Kimura, 2005, pp.98-101).

Resulta de gran importancia profundizar estudios sobre los efectos de la contaminación por hidrocarburos en el sistema suelo/planta/ambiente, temática de gran actualidad. A esta prioridad responde el Proyecto Nacional: “Evaluación a escala piloto de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados utilizando texturizantes locales”, ejecutado por el Centro de Estudios Ambientales de Cienfuegos (CEAC) y que responde además a la presencia en la provincia de Cienfuegos de una industria del petróleo en desarrollo, susceptible de incidencias accidentales que pueden comprometer los ecosistemas del territorio.

Derivado de lo anteriormente expuesto, se plantea el siguiente:

### **Problema científico:**

Se desconoce la respuesta de cultivos indicadores cultivados en un suelo petrolizado posterior a un proceso de biorremediación con diferentes sustratos por la técnica de Biopilas.

### **Hipótesis**

El Índice de Impacto Fitotóxico por Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) disminuirá en los cultivos indicadores *Crotalaria juncea* y *Leucaena leucocephala* como resultado de la biorremediación por la técnica de biopilas de un suelo contaminado.

### **Objetivo general**

Determinar el Índice de Impacto Fitotóxico en *Crotalaria juncea* y *Leucaena leucocephala* posterior a la biorremediación por la técnica de biopilas de un suelo contaminado por HTP

### **Objetivos específicos**

1. Registrar variables agromorfológicas en los cultivos indicadores durante su ciclo.

2. Determinar el Índice Relativo de Fitotoxicidad (IRF) y el Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) en cultivos indicadores de un suelo contaminado con HTP tras un proceso de biorremediación.
3. Medir parámetros del suelo contaminado, posterior a la biorremediación y del suelo sin contaminar.

## **CAPÍTULO I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

### **1.1) Impacto de los hidrocarburos en el suelo**

El suelo es un cuerpo natural, parte integrante del escenario donde ocurren los ciclos biogeoquímicos, hidrológicos y de la cadena alimentaria. Así mismo, es el espacio donde se realizan actividades agrícolas y ganaderas, y es la base para el establecimiento de áreas verdes. El suelo es un recurso natural complejo, dinámico y su equilibrio depende de la interacción entre sus propiedades físicas, químicas y biológicas.

Escalante (2000), hace una descripción de las causas y circunstancias que permiten los procesos de mezcla y percolación de los HTP en los diferentes tipos de suelos:

Los factores que afectan la distribución de los hidrocarburos en los suelos son principalmente el volumen del derrame, la viscosidad del petróleo a la temperatura prevaleciente en el ambiente y la composición del suelo. Los compuestos de alta viscosidad como el crudo pesado tienden a moverse horizontalmente, mientras que la gasolina y aceites de baja viscosidad penetran fácilmente en el suelo. (p.23).

Los derivados de hidrocarburos (gasolina, queroseno, aceites, combustibles, parafinas, y el asfalto entre muchos otros) son generalmente de uso común en las actividades humanas que de alguna manera permiten su permeación en el medio ambiente debido a los accidentes (Cubillos et al., 2014, pp.131-146). No sólo impactan la capa superficial del suelo, también corren el riesgo de ser movilizados hasta aguas subterráneas generando así su contaminación, o incluso pueden ser transportados por escorrentía extendiendo aún más el daño ambiental. Uno de los efectos adicionales tanto en cuerpos de agua como suelos es que el petróleo consume oxígeno, aumenta la demanda bioquímica del agua y puede generar condiciones anóxicas, que a su vez pueden producir mortalidad de peces que no hayan sido afectados directamente por el petróleo.

El tipo de suelo (arena, limo y arcilla) y la cantidad de materia orgánica existente determinan el destino de los hidrocarburos del petróleo y la extensión del daño a las plantas (Yu et al., 2013, pp.4261-4267).

El paso de los hidrocarburos a través de la matriz del suelo (lixiviación) depende a su vez de la textura del suelo y la solubilidad de los hidrocarburos en agua. En suelos arcillosos la migración de partículas es más rápida que en suelos francos, dado que los primeros tienen una mayor

porosidad (Morgan et al., 1989, p.258). Además, en suelos muy arcillosos las moléculas polares pueden ser adsorbidas. Menos del 5% de los compuestos del crudo o productos refinados (principalmente aromáticos de bajo peso molecular e hidrocarburos polares) son solubles en agua. Luego, gran parte de los hidrocarburos queda retenida en el suelo. La actividad microbiana transforma los hidrocarburos en metabolitos más solubles y por lo tanto más móviles en el suelo, favoreciendo su solubilización y lixiviación(Escalante, 2000, p. 23).

Martínez et al., (2001) consideran que el ingreso de hidrocarburos al suelo tiende a producir un efecto de hidrofobicidad, lo que resulta en la disminución de la tasa de infiltración. Los hidrocarburos se acumulan en los poros que se forman entre las partículas del suelo produciendo una reducción en la disponibilidad de oxígeno y la permeabilidad. Este autor reporta cambios en la textura de un suelo arcilloso a migajón arcilloso, a concentraciones de 150 mil ppm de combustóleo, por aumento importante de las arenas y disminución de las arcillas, observando además incrementos en la concentración de materia orgánica a mayor concentración de gasolina y combustóleo(pp.9-17)

Los autores anteriormente citados también señalan que el incremento de este parámetro se debe principalmente a la presencia de material petrogénico recalcitrante, lo cual puede representar un riesgo ecotóxico. Para los parámetros pH, conductividad eléctrica y densidad aparente, no reportan variaciones significativas en suelos arcillosos contaminados con diferentes concentraciones de diésel, combustóleo y gasolina.

Serrano et al., (2013) reportó que, la contaminación por hidrocarburos de petróleo ejerce efectos adversos sobre las plantas, generando minerales tóxicos en el suelo disponible para ser absorbidos, además, conduce a un deterioro de la estructura del suelo; pérdida del contenido de materia orgánica; y pérdida de nutrientes minerales del suelo, tales como potasio, sodio, sulfato, fosfato, y nitrato, de igual forma, el suelo se expone a la lixiviación y erosión. La presencia de estos contaminantes, ha dado lugar a la pérdida de la fertilidad del suelo, bajo rendimiento de cosechas, y posibles consecuencias perjudiciales para los seres humanos y el ecosistema entero. Ante la presencia de aceite, por ejemplo, un suelo arenoso saturado por este tipo de derrame tiende a perder parámetros como la permeabilidad o la compactación, puede llegar a sufrir variaciones cuyos comportamientos están asociados a la saturación del aceite en el medio (Serrano et al., 2013, pp.233-244). Además, Shin& Das (2001) encontraron que suelos arenosos

con concentraciones de aceites superiores hasta del 6% pueden reducir drásticamente la capacidad de carga de los suelos(pp.220-227).

La porosidad del suelo tiende a disminuir debido a que los hidrocarburos ocupan los espacios porosos del suelo. Mientras que, el cambio de la textura del suelo es prácticamente mínimo al ser este expuesto a diversas concentraciones de hidrocarburos. Por otro lado, en lo referente a las propiedades químicas, a diferencia de lo que reporta(Serrano et al., 2013, pp.233-244).

El carbono orgánico podría ser incrementado directamente debido a la absorción de gases propano y butano por las partículas de suelo. Suelos contaminados con gas natural o crudo mostraron incrementos en materia orgánica, carbono total y nitrógeno comparados con suelos normales (Ellis y Adams, 1960, pp.197-216).

La materia orgánica es otro de los parámetros con variaciones, aumenta en forma proporcional a la concentración de gasolina y combustóleo. Este aumento para estos casos, no significa que sea benéfico como lo maneja Plice (1948, pp.413-416) ya que dicho aumento se debe a material petrogénico y no biogénico. Esto realmente puede representar un riesgo ecotóxico por la presencia de hidrocarburos aromáticos polinucleares contenidos en mayor proporción en el diésel y combustóleo.

Plice (1948), encontró grandes incrementos en la materia orgánica en suelos que se han contaminado con crudo y también reportó que los suelos contaminados con gas natural tienen pH alrededor del punto neutral. Simultáneamente a los efectos de las propiedades físicas y químicas del suelo, suceden cambios en las condiciones de fertilidad, donde se observaron incrementos en nitrógeno y contenido de materia orgánica(pp.413-416). Respecto a la textura, Martínez y López (2001)observaron que en un suelo arcilloso los valores de arena tienden a aumentar y de arcilla a disminuir en presencia del diesel y combustóleo, en tanto que los limos permanecen sin variación importante(pp.9-17)

Fernández (2003), sugiere modificar el método de Walkley and Black para determinar materia orgánica en suelos contaminados con hidrocarburos, ya que esta metodología sobre estima la materia orgánica del suelo, debido a que la metodología se basa en que la materia orgánica es oxidada por una mezcla caliente de  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$  Luego de la reacción, el exceso de dicromato es valorado con solución de sulfato ferroamónico y se asume que el dicromato reducido es equivalente al C orgánico presente en el suelo. El problema se da porque la mezcla

caliente de  $K_2Cr_2O_7$  y  $H_2SO_4$  puede oxidar moléculas de hidrocarburo y por consiguiente, obtendremos un dato mayor al real(p.68)

Adams et al., (2008) refiere que los hidrocarburos pueden afectar la fertilidad del suelo a través de varios mecanismos como la toxicidad directa a los organismos del suelo, reducción en la retención de humedad y/o nutrientes, compactación, así como cambios en pH y salinidad. La toxicidad de los hidrocarburos de petróleo, tanto alifáticos como aromáticos, es variable pero, en general, aquellos de menor peso molecular son más tóxicos(pp.483-485)

Los hidrocarburos no impiden la solubilización de sales presentes en el suelo, lo cual se manifiesta en valores similares de conductividad eléctrica en suelos contaminados con gasolina, combustóleo y diésel; por lo anterior tampoco hay modificaciones en el pH, densidad aparente, densidad real ni porosidad del suelo contaminado con los hidrocarburos antes mencionados (Martínez y López, 2001, pp.9-17).

## **1.2) Impacto de los hidrocarburos en las plantas**

Durante muchos años, se cuestionó el efecto tóxico de los hidrocarburos del petróleo en el suelo y en algunas plantas, de tal manera que algunos autores consideran benéfica la presencia de éstos cuando la concentración en el suelo es baja (<0.1%), (López, 1991, p.141).González (1995) refiere que el petróleo causa efectos en plantas, como defoliación, disminución de la cobertura vegetal y la duración del periodo de vida de una comunidad vegetativa; de manera conjunta y directa, repercute en la velocidad de recolonización de los terrenos contaminados(p. 33). Resultan evidente las modificaciones en el comportamiento de los microorganismos en su habitat natural con efecto en las poblaciones, modos de vida e interacción con las diferentes plantas hospedantes. Las plantas más tolerantes al petróleo son los cultivos anuales, plantas de vivero, variedades con enraizamiento somero, plantas de mucha superficie foliar o cutícula delgada y plantas sin sistema radicular (líquenes y musgos). Las plantas con reservas (cultivos de raíz), especies caducifolias, plantas provistas con cutícula gruesa y cerosa y de baja densidad estomática como las xerófitas son más resistentes a daños por petróleo (López, 1991, p.141). El petróleo puede afectar más a las partes fotosintéticas de la planta que a las raíces o a la corteza (McGillet al.,1981, p.147).

La gran mayoría de los hidrocarburos de petróleo son considerados compuestos tóxicos, cuyos efectos sobre las plantas son en la mayoría de los casos subletales, es decir que no se manifiestan a través de la mortalidad, sino de manera indirecta modificando el crecimiento, la reproducción y

la fotosíntesis. Los efectos adversos sobre el desarrollo de las plantas varían en función de la estructura química del hidrocarburo, su concentración en el suelo y la especie de planta. La toxicidad disminuye en el siguiente orden: compuestos aromáticos, naftalenos, olefinas y cadenas no ramificadas parafínicas; altas concentraciones de hidrocarburos limitan y/o alteran la germinación de las semillas y el crecimiento de las plantas (Chaineau, et al.,1997), citado por Buendia , 2012, pp.123-130)

Dichos autores reportan además una reducción de más del 80% en la biomasa seca de la parte aérea para dos especies: cebada y frijol, observando además síntomas de clorosis en las hojas y alteración del desarrollo vegetativo. La inhibición del crecimiento fue mayor al incrementarse la concentración del contaminante.

Los hidrocarburos de petróleo pueden ingresar a las semillas y alterar las reacciones metabólicas y/o matar al embrión por toxicidad directa aguda. La inhibición de la germinación también está correlacionada con las propiedades hidrofóbicas de los hidrocarburos, las cuales evitan o reducen el intercambio de gases y agua necesario en esta etapa. Evaluaciones sobre la fitotoxicidad de hidrocarburos señalan que la respuesta a la presencia durante la germinación varía de una especie y otra. El mismo autor señala que la resistencia de semilla de algunas especies vegetales a los efectos de los hidrocarburos muestra el siguiente orden decreciente: girasol, frijol, trigo, trébol, maíz, cebada, lechuga. También indica que la incidencia de infecciones por hongos incrementa conforme aumenta la concentración de hidrocarburos (Chaineau et al.,1997, pp.1478-1483).

Amakiri et al., (1984) observaron que la germinación de semillas de maíz se retrasó y disminuyó en un 10% después de 16 semanas de permanecer remojadas en crudo de petróleo(pp.199-205). Esta misma tendencia fue reportada por Escalante (2000), quien indica además que se observan efectos fitotóxicos en el crecimiento a partir de la concentración de 10% de TPH(p.23).

Buendia(2012), reportó un grupo de plantas con potencial para reducir la concentración de hidrocarburos en los suelos, dentro de las cuales se incluyen: zanahoria (*Daucus carota*), girasol (*Heliantus annus*), soya (*Glycine max*), col (*Festuca arundinacea*), trigo (*Triticum sp.*), maíz (*Zea Mays. L*), guaba (*Inga sp*) y los pastos yerba fina (*Cynodon dactylon*) y pasto grama (*Panicum coloratun*)(pp.123, 130)

Las plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo pueden reducir la concentración de estos contaminantes mediante tres mecanismos: degradación, contención o transferencia (Frick et al., 1999, pp.236 , 265).

Anderson et al., (1993) demostraron que las plantas que viven en suelos contaminados por hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada del agua(pp.2630-2636). Xu y Johnson (1995) indicaron que la contaminación por hidrocarburos reduce el crecimiento de la planta porque los hidrocarburos pueden cubrir las raíces de las plantas influenciando la absorción de agua y nutrimentos, después penetrando dentro de los tejidos vegetales, las moléculas de hidrocarburos pueden dañar las membranas celulares causando un derrame de los contenidos celulares y bloqueando los espacios intercelulares reduciendo el transporte de metabolitos y la tasa de respiración(pp.3-10).

“El estrés hídrico afecta a diversas estructuras anatómicas y morfológicas, procesos fisiológicos y bioquímicos, en alguna etapa del crecimiento de las plantas”(Kramer, 1974), citado por (Hernández, 1997, p.131).

De lo anteriormente citado los efectos pueden ser: disminución en el crecimiento de las hojas, reducción del rendimiento de grano (Begg y Tuner, 1976, pp.161-217), disminución del rendimiento final de la materia seca, disminución de la fotosíntesis, de la transpiración, cierre estomático, disminución de la concentración interna de CO<sub>2</sub> y reducción del área foliar (Boyer, 1976, p.8).

Las fracciones volátiles de los hidrocarburos penetran y eliminan el embrión de las semillas, disminuyendo su porcentaje de germinación, también causan clorosis a las plantas, ya que sufren severas deficiencias requiriendo mayor cantidad de macronutrimentos (González, 1995, p.33).

Quiñones y Ferrera-Cerrato (2000) observaron que las gramíneas establecidas en suelos de Minatitlán, Veracruz, contaminados por hidrocarburos, tuvieron diferentes grados de colonización por micorrizas y en la rizósfera de estas plantas, encontraron especies de HMA correspondientes a *Gigaspora margarita*, *Acaulospora delicata* y dos especies de *Glomus*(p.39), indicando el rol que estos hongos pudiesen jugar en la recuperación de los suelos afectados (Varela et al., 2000,p.58).

Otros autores como Rivera-Cruz et al., (2004) trabajaron con gramíneas y encontraron cambios importantes en la dinámica de los microorganismos rizosféricos de pasto cabezón, establecidos en Gleysol eútrico. Se encontró disminución drástica (654 veces) en la población de bacterias. Las poblaciones de hongos fueron hasta nueve veces mayores en el Gleysol eútrico muy contaminado

con petróleo que el Gleysol eútrico no contaminado. Esto indica el efecto variado que la petrolización puede tener en los componentes microbiológicos del suelo(pp.326-331).

En el suelo contaminado el peso seco de la raíz se reduce significativamente, lo cual coincide con Ramírez (1991) quien encontró hasta 4.5 veces menos peso seco de raíz en suelo contaminado con diferentes concentraciones de hidrocarburo(p.58) Sin embargo, Franco (1993) encontró que el peso seco de las raíces de frijol se ve favorecido por la presencia de hidrocarburos, obteniendo al menos un incremento del doble con respecto al testigo, el cual no tenía hidrocarburo(p.55)

Se ha evaluado la respuesta del maíz a condiciones de contaminación por petróleo y otros compuestos derivados del mismo. Méndez-Natera et al.,(2004) y (2006)evaluaron el efecto de diferentes concentraciones de petróleo(0,3% y 6%) y tres períodos de siembra después de ocurrido el derrame petrolero sobre la germinación de las semillas del maíz cv. Himeca 95(pp. 66-71). En general, encontraron Méndez-Natera et al., (2006) los mejores resultados fueron para las semillas que se sembraron después de 1 a 2 semanas de ocurrida la contaminación petrolera indicando que en suelos afectados por petróleo debería realizarse la siembra un tiempo después de la contaminación y no inmediatamente (pp.102-108) Méndez-Natera et al., (2003) concluyeron que el maíz podría utilizarse como un cultivo recuperador de suelos afectados por petróleo cuando los niveles de contaminación del suelo no sean tan severos(p.118).

Quiñones-Aguilar et al., (2003) realizaron un experimento con la finalidad de conocer la capacidad del maíz para emerger y crecer en un suelo contaminado artificialmente con petróleo crudo. Se estableció un experimento en invernadero en Montecillo, Estado de México, donde se sembraron 10 recolecciones procedentes de Minatitlán, Veracruz, y el híbrido Jornalero en diferentes concentraciones de petróleo en el suelo (0, 15.000, 25.000 y 35.000 mg.kg<sup>-1</sup> de suelo)(pp.585-594).

Las concentraciones de petróleo de 25 000 y de 35 000 mg kg<sup>-1</sup> suelo favorecieron una mayor emergencia del maíz, después del testigo sin contaminar. Esto indica que a concentraciones mayores de 15 000 mg.kg<sup>-1</sup> suelo, las plantas de maíz germinan y emergen sin graves problemas de toxicidad por el petróleo (Quiñones-Aguilar et al., 2003, pp.585-594).

Las plantas cultivadas en el suelo sin contaminar superan significativamente a las plantas de los suelos contaminados (15.000, 25.000 y 35.000 mg.kg<sup>-1</sup> de 150.000 mg.kg<sup>-1</sup>de suelo) en todas las variables de crecimiento (altura de la parte aérea, longitud de la raíz principal, volumen radical, peso seco total). En cuanto a las tres concentraciones, los valores para dichas variables no fueron

diferentes, excepto para la longitud de la raíz principal, cuyo valor disminuía a medida que aumentaba la concentración de petróleo. Este efecto puede atribuirse a que el petróleo formó sobre la raíz una capa hidrofóbica, la cual limitó la absorción de agua y nutrientes. Otros autores atribuyen este particular también a las modificaciones de índole petrogénico que se van sucediendo en el suelo y que afectan el comportamiento de los microorganismos y la solución del suelo (Quiñones et al., 2003, pp.585-594).

Los autores citados anteriormente, encontraron que la germinación de las semillas de maíz se vio afectada de forma directa por la cantidad de petróleo utilizado para contaminar el suelo. A mayor cantidad de petróleo menor fue el porcentaje de germinación, obteniéndose que posterior a 50 mL no se produjo germinación alguna. Este resultado indica que a partir de una contaminación con 50 mL de crudo por cada 0,5 kg de suelo (8,6% p/p) las propiedades del suelo se alteran (sobre todo el pH) de tal manera que no permiten la germinación y desarrollo del maíz.

Los tipos de maíz comparados en este estudio tuvieron una respuesta diferencial en emergencia y crecimiento de las plantas en las distintas concentraciones de petróleo en el suelo. Las recolecciones MV06 y MV08 respondieron mejor que las demás; por tanto, plantas de una misma especie pueden crecer de forma diferente en suelos contaminados con petróleo crudo. Entre y dentro de especies vegetales existen diferencias respecto a su potencial en sistemas de fitorremediación (Wiltse et al., 1998, pp.169-173). Dichos autores reportaron variación intra-específica en genotipos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) al evaluar su crecimiento y capacidad para la recuperación de suelos contaminados con petróleo crudo.

Chaineau et al., (1997) en un experimento con girasol (*Helianthus annuus* L.), frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), trigo (*Triticuma estivum* L.), trébol (*Trifolium repens* L.), maíz (*Zea mays* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), y lechuga (*Lactuca sativa* L.) en un suelo contaminado con dos tipos de petróleo, encontraron que la germinación de las semillas fue afectada por los hidrocarburos de manera distinta en las diferentes especies; la inhibición del crecimiento de las plantas se incrementó con la concentración de hidrocarburos(pp.1478-1483).

Rivera-Cruz et al., (2005) evaluaron cuatro leguminosas (*Crotalaria sp.*, *Leucaena sp.*, *Mimosa sp.* y *Mimosa pigra*) a diferentes concentraciones de petróleo en el suelo:

El crecimiento vegetativo mostró diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos. La altura de las plantas fue severamente afectada por las tres concentraciones más altas de los petróleos intemperizado (79,457 mg, de hidrocarburos

totales.kg<sup>-1</sup> de suelo) y nuevo (100 000 y 150 000 mg de hidrocarburos totales.kg<sup>-1</sup> de suelo)(pp.326-331).

La mayor reducción en la altura se presentó en las leguminosas *Mimosa sp* y *Mimosa pigra*, donde las plantas no lograron sobrevivir al efecto de la concentración más alta de petróleo (150 000 mg.kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos totales), en cambio la planta de *Leucaena sp*.fue menos sensible a la exposición de la concentración más alta de petróleo nuevo, ya que sobrevivió a su efecto y creció un poco al pasar de 8 cm de altura al momento inicial a 13 cm después de 120 días de exposición. Almeida et al., (2015) sugiere el potencial de *Canavalia ensiformis* como fitoestabilizadora del cobre en suelos arenosos(pp.172-182).

### **1.3) Efectos de la biorremediación en los cultivos**

Este proceder ha sufrido transformaciones a lo largo de los años y hasta la actualidad, con un proceso de tecnificación amplio que ha favorecido asimilar grande concentraciones de suelo afectado(McCullough et al., 1999,p.55).

La palabra biorremediación es prácticamente nueva ya que apareció por primera vez en un artículo científico en 1987. La biorremediación es un conjunto de técnicas para el saneamiento de suelos y cuerpos de agua mediante el uso de organismos vivos o de sus enzimas, capaces de acumular, transformar o degradar bioquímicamente contaminantes hasta concentraciones que no produzcan efectos nocivos a la salud o al ambiente en general, en el corto y largo plazo (Fernández, 2003, p.68) y cuyo objetivo es aprovechar los procesos degradantes que ocurren de forma natural para limpiar sitios contaminados.

Como alternativa de restauración de suelos contaminados con hidrocarburos se ha establecido la utilización de elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y completa mineralización de contaminantes (Ferrera-Cerrato et al., 2006, pp.179-187).

En lo referente a la recuperación de suelos Mahar et al., (2016), reportan las técnicas de fitoextracción y fitoestabilización como métodos alternativos prometedores para la recuperación de suelos(pp.111-121).

Considerando el desarrollo de un cultivo como indicador de biorremediación, la mayor emergencia de plántulas (%), altura de planta (cm), volumen de raíz (cm<sup>3</sup>), peso seco de raíz (g) y peso seco de la parte aérea (g), de *Vicia sativa* L. (alverja) fueron significativamente mayores (Tukey 5%) en suelos biorremediados con lodos (Franco,1993, pp.36-39).

Ocampo (2002), refiere que para la utilización de la técnica de landfarming, se dispone de áreas denominadas “unidades de tratamiento” o “celdas de tratamiento”, las cuales se construyen considerando medidas para evitar el transporte de contaminantes hacia otras áreas por infiltración. La base de las celdas de tratamiento se impermeabiliza colocando una capa de arcilla compactada, con un nivel de impermeabilidad de 10<sup>-7</sup>–10<sup>-8</sup>cm/s, o una geomembrana de polietileno de 800 micras( p.81)

El composteo tiene la gran desventaja de altos riesgos de contaminación por exposición, la contaminación residual y que los períodos de composteo van de meses a años y tienen que ser debidamente monitoreados, además de que exigen un manejo técnico riguroso. (Isbister et al., 1984, pp.47,73). Sin embargo, se ha demostrado su eficiencia en la descomposición de explosivos nitroaromáticos, petróleo y gasolina (McFarland et al., 1989, pp.1-5).

La USEPA (2003) recomienda que la ejecución de evaluaciones periódicas en las biopilas es necesaria para asegurar el avance del proceso de remediación y ajustar las principales variables del sistema. La medición continua del oxígeno, la concentración de nutrientes, la concentración de bacterias heterótrofas, el pH y el contenido de humedad permiten adecuar la frecuencia de las aireaciones, la tasa de aplicación de nutrientes, la frecuencia volumen de riego y el pH. Dichas evaluaciones deben incluir también la medición de las concentraciones del contaminante para determinar el progreso del sistema de tratamiento(p.15).

Guerrero (2001), establece que es factible utilizar diferentes formas de materia orgánica de excrementos descompuestos de animales (vaca, cerdo, ovino, gallina, caballo, aves guaneras, etc.), estos componentes son utilizados de diferentes formas en el proceso(p.63)

Arbaiza(2011), consideran que el aserrín es una materia orgánica de origen vegetal, derivado del aserrío de especies maderables duras y suaves, como la bolaina, el pino, capirona y otros(pp.145-146) Este residuo es ampliamente utilizado en los procesos de composteo presentes en la biorremediación. Un aserrín que presente una relación C/N superior a 40 requerirá para su biodegradación un mayor número de generaciones de microorganismos y un mayor tiempo para alcanzar una relación apropiada para su uso agronómico. Si el material del que se dispone no presenta una relación C/N apropiada, se debe proceder a realizar una mezcla con otros materiales, este procedimiento es conocido como balance de nutrientes (Kimura, 2005, pp.98-101).

Guerrero(2002), establece que la humedad debe ser alta durante la etapa de descomposición, en la cual prevalecen las bacterias. Si la humedad decae por debajo de 35% la actividad microbiana

desciende y el proceso se hace más lento, llegando finalmente a la inhibición(pp.21-23). En cuanto a la temperatura Juzcamayta(2007), planteó que se necesita mantener una temperatura del proceso en el rango adecuado (40°C-60°C), por ello es importante la aireación. La descomposición microbiana libera gran cantidad de energía en forma de calor, lo cual incrementa la temperatura(pp.100-105).

Ocampo et al., (2002) refiere que la aireación es necesaria, pero debe ser controlada, debido a que si ésta es excesiva, puede provocar un enfriamiento de la mezcla de residuos, y por ende una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos. La aireación libera calor, vapor de agua y otros gases que se encuentran al interior de la pila, además incorpora O<sub>2</sub>(p.81)

Los microorganismos involucrados en el proceso de degradación requieren nutrientes primarios como carbono, nitrógeno, fósforo, y potasio. El carbono es utilizado como fuente de energía para su crecimiento, mientras que el nitrógeno es indispensable para la síntesis de proteínas y la reproducción de los microorganismos. La relación C/N óptimo para el inicio del proceso de degradación de la materia orgánica debe estar comprendido entre 25-35/1, (APROLAB, 2007, pp.57, 62). Relaciones de C/N menores a 20:1 utilizarán todo el carbono sin haber estabilizado el nitrógeno presente, esto provoca que el nitrógeno se pierda en forma amoniacal, provocando malos olores y la degradación resultante será de menor calidad.

La planta de maíz es un buen indicador para evaluar la reducción de la concentración de hidrocarburos en los suelos contaminados a través de las variables: altura, peso seco foliar y peso seco radicular. El cultivo de maíz ha tenido una mayor altura de planta, mayor peso seco foliar, y peso seco radicular, cuando los suelos contaminados con hidrocarburos han sido tratados de manera conjunta mediante estiércoles más aserrines y menos desarrollo cuando solamente han sido tratados con estiércol o aserrines por independiente (Buendía, 2012, p.75).

Buendía, (2012) para descartar la disminución de Hidrocarburos Totales de Petróleo de un suelo de la Refinería “La Pampilla”, ubicado en la Carretera Ventanilla km 25, distrito de Ventanilla, provincia del Callao, Perú se instaló un experimento a nivel de bioensayo en el Laboratorio de Fertilidad de suelos de la Universidad Nacional Agraria “La Molina” aplicándose un modelo estadístico de Diseño Experimental Completamente al Azar (DCA), con tres repeticiones y doce tratamientos sumando un total de 36 macetas experimentales. Se empleó estiércol y aserrines como sustrato a la planta indicadora de “maíz” (*Zea mays* L.), sembrados y controlados por un ciclo de dos meses:

Este autor considera que la tecnología de la biorremediación de suelos es factible especialmente con materias prima simples como estiércol, aserrín, cuyos costos de remediación son bajos, además indica que la contaminación de hidrocarburos del petróleo puede influir en el equilibrio ecológico de la rizosfera. Cuando las concentraciones son tóxicas, los hidrocarburos del petróleo inhiben la mesofauna del suelo; en casos de toxicidad aguda, se inhibe la germinación y el rebrote de meristemos y la elongación radicular disminuye, así como el contenido de clorofila y la fotosíntesis. No obstante, se ha observado que, a bajas concentraciones, los hidrocarburos estimulan el crecimiento de los vegetales. (pp.123-130)

Los resultados de la dosificación del suelo contaminado por hidrocarburos, estiércol y aserrín en promedio disminuyó 22.5% el contenido de hidrocarburos en el suelo, empleando solo el estiércol la disminución fue de 16.5% y usando solamente aserrines disminuyó 9.6%. Comparando los tratamientos del experimento el que mejor remedió el suelo fue el tratamiento con suelo contaminado más vacaza más aserrín de bolaina, puesto que la concentración inicial de hidrocarburos totales de petróleo (TPH) fue de 21.81 g de TPH.kg<sup>-1</sup> de suelo, y al final alcanzó 16.28 g de TPH.kg<sup>-1</sup>de suelo, que representa una reducción del 25%. Siendo este tratamiento el más recomendable a utilizar (Buendía, 2012, pp.123-130).

Pérez Vargas et al., (2002), consideran que las propiedades físicas del suelo se afectan por la contaminación con hidrocarburos: al aglutinarse las partículas del suelo se generan estructuras más gruesas que cubren la superficie de las partículas y el espacio poroso y afectan la aireación del suelo. La película que cubre las partículas es hidrófoba y disminuye la retención de agua. Por otro lado, el contenido de materia orgánica del suelo se incrementa notablemente, así como la acidificación y la saturación de bases y la capacidad de intercambio catiónico. Todos estos factores acarrearán una disminución de la fertilidad del suelo y repercuten desfavorablemente en el desarrollo foliar de las plantas(pp.297-300).

Freedman (1989) acota que el contacto con el petróleo daña y mata el follaje y algunos tejidos leñosos expuestos. Sin embargo, en muchas especies, no todos los tejidos perennes se dañan hasta el punto de morir y, en muchas ocasiones, la adición de nutrientes a suelos contaminados puede favorecer el establecimiento de plantas y aumentar las poblaciones rizosféricas(p.424)

Amadi et al., (1993) encontraron que la adición de fuentes orgánicas de nutrientes a un suelo contaminado con petróleo (30 000 mg.kg<sup>-1</sup>) benefició el crecimiento del maíz. Las

concentraciones de petróleo de 25 000 y de 35 000 mg.kg<sup>-1</sup>suelo favorecieron una mayor emergencia del maíz, después del testigo sin contaminar(pp.59-76). Esto indica que a concentraciones mayores de 15 000 mg.kg<sup>-1</sup> suelo, las plantas de maíz germinan y emergen sin graves problemas de toxicidad por el petróleo. Estos resultados muestran el potencial que tiene el maíz para crecer en suelos contaminados con petróleo así como la posibilidad para utilizarse en sistemas de fitorremediación para la recuperación de suelos agrícolas contaminados con petróleo(Amadi et al., 1993; Chaineau et al., 1997), citados por (Quiñones-Aguilar ,2003, pp.585-594.)

La germinación y emergencia (90-100%) de semillas de maíz en suelos contaminados con petróleo (100 000 mg.kg<sup>-1</sup> suelo), fue reportada por Damián (1999), quien obtuvo además germinación de maíz en suelos contaminados con diésel, aunque ésta disminuyó a medida que aumentó la concentración del contaminante en el suelo; obviamente, resulta necesario evaluar los efectos dañinos que puede ocasionar el petróleo a las plantas de maíz, durante todo su ciclo de vida. La concentración de petróleo de 25 000 mg.kg<sup>-1</sup> suelo permitió un mejor crecimiento y desarrollo, con base en emergencia, altura de planta, longitud de raíz, pesos secos de follaje, raíz, total y valores adecuados de IABPS e ICL para la mayoría de los tipos de maíz(p.53)

Marín (2016) en el estado Monagas, Venezuela evaluó el uso del extracto de la cáscara de naranja dulce (*Citrus sinensis*) como bioestimulador en un suelo contaminado con petróleo liviano y luego utilizaron la planta de maíz de la variedad reventón (*Zea mays* everta) como indicador de la calidad del suelo posterior al tratamiento(pp.1-13), es decir como un bioindicador que se define como “*un organismo, o parte de un organismo, o una comunidad de organismos, utilizados para obtener información sobre la calidad del medio ambiente*”(Garbisu, et al., 2007, pp.44-49).

Refiere Marín, (2016) que como variables de estudio se consideraron el contenido de aceites y grasas y el tamaño promedio de las plantas de maíz en las muestras contaminadas y biorremediadas y en una variante patrón sin contaminar. Se midió la altura cada 5 días por un periodo de 35 días continuos, comparando su crecimiento con semillas plantadas en una muestra de suelo sin contaminación. Al comparar el crecimiento promedio de las plantas de maíz en los suelos remediados con las plantas en el suelo patrón, el mismo fue igual hasta el día 20, a partir del cual se evidencian diferencia significativa favorable al crecimiento de las plantas en el suelo patrón(pp.1-13)

Los microorganismos existentes en la materia orgánica (estiércol y aserrines) restablecen el equilibrio microbiológico del suelo, mejorando sus condiciones físico-químicas, incrementando la reducción de la contaminación del suelo, la producción de cultivos y su protección. Así mismo aumenta de la velocidad y porcentaje de germinación de las semillas, por su efecto hormonal, similar al del ácido giberélico (Buendía, 2012, pp.123-130).

Ramírez (1991) encontró que en plantas de lechuga (*Lactuca sativa*) se manifestaron manchas de color café con cierto brillo metálico en la base de la planta y nervaduras principales, muy semejantes a una quemadura, que originó por último la muerte de las plantas. El efecto del derrame de petróleo sobre vegetales induce una variedad de síntomas, variando desde amarillamiento y muerte de hojas individuales hasta la completa eliminación temporal de vegetación en el sitio del derrame(p.58)

Plice (1948) constató que la adición de petróleo crudo a un suelo arenoso en proporción de 0.75%, estimulaba el crecimiento de soya, además observó que con un incremento a 4% del hidrocarburo las mismas plantas morían(pp.413-416). La presencia de hidrocarburos en el suelo provoca alteraciones morfológicas y fisiológicas en la planta de frijol cultivada en invernadero, así mismo, en concentraciones de 4 a 24% de hidrocarburo en el suelo se puede provocar la muerte de la planta (Franco, 1993, p.33).

Hernández (1997) en plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) estudió el efecto de una mezcla compleja de hidrocarburos sobre poblaciones microbianas y el crecimiento de las plantas con concentraciones de: 0, 500, 2500 y 5000 mg.kg<sup>-1</sup>. Las plantas permanecieron en invernadero por 91 días. Al final del experimento en rizoplano, rizósfera y suelo sin plantas se evaluaron poblaciones totales de hongos y bacterias, bacterias hidrocarbonoclasticas (deficientes en la degradación de hidrocarburos), bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA), que utilizan hidrocarburos como fuente de carbono. Las mayores poblaciones ocurrieron en el rizoplano y la rizósfera; el decremento del crecimiento de las plantas estuvo relacionado con el aumento de la concentración del contaminante(p. 131)

Bermúdez (2012) evaluó el tratamiento de los residuos petrolizados mediante la técnica de bioaumentación con el uso del consorcio bacteriano BIOIL-FC en el saneamiento ambiental de una zona costera contaminada con hidrocarburos, localizada en la porción centro-norte de la Bahía de Cienfuegos, donde monitorearon las variables microbiológicas, físico-químicas y

ecotoxicológicas antes del tratamiento y a los 45, 90 y 120 días posteriores a la aplicación del bioproducto, utilizando cultivos de maíz y frijol(pp.32,45)

El análisis integral de los parámetros que ponderó el estudio anterior para brindar un criterio sobre el posible efecto tóxico agudo, y su influencia sobre el crecimiento del frijol; comparando, el suelo patrón con los resultantes del tratamiento a los 0, 90 y 120 días, demostró que para el suelo sin tratamiento disminuyen significativamente la altura de la planta, el largo de la raíz, el peso húmedo de la raíz, el % de materia seca de la raíz, el % de nitrógeno total y el % de proteína bruta de la planta. Así, aumenta significativamente el peso húmedo de la raíz y el % de materia seca de la planta, no se afecta el peso seco de la planta, ni el peso seco de la raíz.

Similar análisis, pero para el suelo biorremediado a los 90 días, nos muestra que la planta no recupera la altura, el largo de la raíz, el peso húmedo de la planta, el % de nitrógeno total y el % de proteína bruta. Sin embargo, recupera el % de materia seca de la raíz y aumenta significativamente el peso húmedo y seco de la raíz. En el suelo biorremediado a los 120 días no se restablece ni el % de nitrógeno total y ni el % de proteína bruta; pero si se restablecen la altura de la planta, el largo de la raíz, el % de materia seca de la raíz, el % de materia seca de la planta y aumenta significativamente el peso húmedo y seco de la planta y la raíz La evaluación del estudio de toxicidad sobre el crecimiento de maíz, sugiere que el suelo sin tratamiento disminuye significativamente el peso húmedo de la planta, pero aumenta significativamente el largo de la raíz, no afecta la altura de la planta, el peso seco de la planta, el peso húmedo y seco de la raíz, la materia seca de la planta y de la raíz. En el suelo biorremediado a los a los 90 días, observamos que no se recupera ni el largo ni el peso húmedo de la raíz; mientras que en este mismo estudio, pero a los 120 días, se restablece el largo y el peso húmedo de la raíz (Bermúdez, 2012, pp.32,45).

De manera general los resultados alcanzados por Bermúdez (2012) en los ensayos de germinación de semillas para frijol y maíz a los 120 días, demostraron una recuperación de la capacidad de absorción de agua por parte de las semillas y la no presencia de componentes tóxicos en el medio que inhibiesen la germinación(pp.32,45), de manera similar a los resultados obtenidos en el control utilizado, de igual forma las pruebas de fitotoxicidad sobre el crecimiento para ambas especies tuvieron un comportamiento similar , restableciéndose a los 120 días la altura de la planta, el largo de la raíz, el % de materia seca de la raíz, el % de materia seca de la

planta, el peso húmedo y seco de la panta y la raíz. Lo que demuestra una recuperación de las características iniciales del compartimiento ambiental tratado.

Se emplea además la técnica de fitorremediación, que ofrece la ventaja de usar procesos naturales para degradar el petróleo; y disminuir el impacto ambiental negativo de los derrames de hidrocarburos en los diferentes ambientes (cuerpos de agua y suelos) usando microorganismos, plantas o enzimas de manera estratégica con el fin de restaurar la calidad ambiental (Ñustez,2012, p.16). En este caso, la utilización de plantas en procesos de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos contribuye a transformar, acumular o inmovilizar sustancias tóxicas. Esta técnica biológica aumenta la tasa de transpiración, mejora el flujo de agua en el perfil del suelo y por tanto favorece la aireación dentro del suelo (Maldonado et al., 2010, pp.121-136).

La información revisada ha permitido acceder a resultados científicos que ilustran el estado del arte en esta temática de actualidad y que justifican la necesidad de continuar profundizando en investigaciones que conduzcan a mitigar cada vez más los efectos de la contaminación por hidrocarburos en el sistema suelo/planta/animal a nivel macro y microbiológico. Una situación emergente como la explosión de los tanques reservas de hidrocarburos en Matanzas, Cuba durante el mes de septiembre/2022 que provocaron derrame de Diesel y emisión de nubes densas de humo corrobora la necesidad de profundizar en los estudios de peligro, vulnerabilidad y riesgos por derrame de HTP y métodos para mitigar los mismos.

## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación, se llevó a cabo en un área techada, protegida con una cerca de alambre de púa y tela de mosquitero en la Unidad Científico Técnica de Base “Suelos Cienfuegos”, ubicada en las coordenadas N: 591-260 y E: 259-250 en la hoja cartográfica Barajagua 1: 25 000, municipio de Cumanayagua, provincia de Cienfuegos, región centro sur de Cuba.

Se evaluaron dos especies de leguminosas, *Leucaena leucocephala* Lam y *Crotalaria juncea* Lam, que fueron seleccionadas por ser especies que crecen silvestres en áreas contaminadas con petróleo; la primera presenta tolerancia, mientras que la segunda muestra sensibilidad a altas concentraciones de petróleo (Rivera et al., 2005, pp.326-331).

Se utilizaron bolsas con un peso neto de 2 kg, las cuales fueron colocadas sobre piezas plásticas que permitieron separarlas del suelo y evitar afectaciones por escorrentías de lluvia. Se realizaron previamente pruebas de germinación, que resultaron con 100% de emergencia en ambas plantas indicadoras. Los sustratos incorporados a las bolsas tenían 270 días de proceso de compostaje.

En la siembra de los cultivos indicadores se colocaron ocho semillas por bolsas para dejar cuatro plantas una vez emergidas. Durante el tiempo de duración del experimento se proporcionó agua para mantener la humedad del sustrato a capacidad de campo, con 100 mL de riego en día alternos. No se aportaron nutrimentos minerales de N, P y K, para evitar interferencia sobre el crecimiento de los ejemplares. Decenalmente se rotaron las bolsas para contrarrestar el efecto de borde y cualquier influencia externa que pudiese modificar las variables en estudio.

Para dar respuesta a la hipótesis formulada referente a la combinación de sustratos con un suelo biorremediado por la técnica de biopilas en condiciones semicontroladas se condujeron dos experimentos por independiente con los cultivos indicadores descritos anteriormente: a) *Leucaena Leucocephala* (L.) y b) *Crotalaria juncea* (L.) en un diseño de Bloques al Azar (DBA) con 8 tratamientos y 5 réplicas. Se describen a continuación:

1. Suelo + Residuo Petrolizado + Bagazo
2. Suelo + Residuo Petrolizado +Cachaza
3. Suelo + Residuo Petrolizado +Aserrín.
4. Suelo + Residuo Petrolizado +Pulpa de Café
5. Suelo + Residuo Petrolizado + Estiércol Vacuno
6. Suelo + Residuo Petrolizado +Thalassia
7. Suelo + Residuo Petrolizado Hidrocarburo (Control)

## 8. Suelo (Testigo)

El ciclo del cultivo se extendió hasta 70 días, cuando las dos especies mantenían un aspecto saludable a la apreciación visual.

En la tabla que sigue se muestran los datos de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) del suelo utilizado en el experimento.

**Tabla 1.** Contenido de HTP del suelo empleado en el experimento.

Indicadores	Resultado (mg.kg <sup>-1</sup> )
Grasas y aceites	110.0
Hidrocarburos totales	90.0
Hidrocarburos Saturados	<L.C
Hidrocarburos Aromáticos	<L.C
Resinas	<L.C

En la tabla que sigue se plasma el contenido de metales pesados del suelo Pardo Grisáceo extraído de áreas en barbecho para conformar las Biopilas. De igual forma se incluyen algunos componentes de la fertilidad del mismo

**Tabla 2.**Contenido de metales pesados y componentes de la fertilidad del suelo que se utilizó en las bolsas

Análisis	Resultado	Método
<b>Metales pesados</b>		
Hg	0,180 mg.kg <sup>-1</sup>	Analizador directo del mercurio (DMA-80)
Cd	< 10 mg.kg <sup>-1</sup>	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Pb	< 1,0 mg.kg <sup>-1</sup>	Analizador directo del mercurio (DMA-80)
Cu	10,3 mg.kg <sup>-1</sup>	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Fe	5,43%	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Mn	922 mg.kg <sup>-1</sup>	Analizador directo del mercurio (DMA-80)
Zn	66 mg.kg <sup>-1</sup>	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Ni	6,00 mg.kg <sup>-1</sup>	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Co	19,6 mg.kg <sup>-1</sup>	Espectrometría de masa con Plasma Acoplado inductivamente (ICP-OES)
Al	2,76%	Analizador directo del mercurio (DMA-80)
<b>Componentes de la fertilidad del suelo</b>		
pH(KCl )	5,98 u	Potenciométrico
pH(H <sub>2</sub> O )	6,85 u	Potenciométrico
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9,8 mg.100g <sup>-1</sup>	Colorimétrico
K <sub>2</sub> O	14,4mg.100g <sup>-1</sup>	Fotometría de llama
M.O	1,9%	Volumétrico
Da	1,50 g/cm <sup>3</sup>	Cilindro
CE	0,41 mS	Conductímetro
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	9,8 mg.100g <sup>-1</sup>	Colorimétrico

### Mediciones realizadas a las plantas indicadoras:

a) Variables agromorfológicas en los cultivos indicadores durante su ciclo:

- Emergencia de plántulas en el tiempo: Monitoreo semanal a las bolsas (Desde 6 hasta 70 días).
- Altura: La misma fue medida con una regla en cm posterior a la emergencia, con frecuencia de 14, 21, 28, 42 días y en el momento de la evaluación final a los 70 días.
- Peso verde total de la parte aérea (gramos): En el momento de la evaluación final, cuando fueron cortadas las plantas a 5 cm del suelo de la bolsa.
- Peso seco total de la parte aérea (tallos + hojas). A partir de la toma de muestras en la evaluación final, las que fueron entregadas en el laboratorio para determinar peso seco y el contenido foliar de nitrógeno, fósforo y potasio.

En el **Anexo No.1** se aprecia el momento de las mediciones de las variables agromorfológicas en los cultivos indicadores durante su ciclo

b) Índice Relativo de Fitotoxicidad (IRF) y el Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) en cultivos indicadores de un suelo contaminado con HTP tras un proceso de biorremediación.

En ambas especies se determinó el Índice Relativo de Impacto Fisiológico (IRIF) y el Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) en las variables: altura, longitud radicular, peso seco de la parte aérea y la raíz.

Para medir el efecto de los tratamientos, los  $IRIF_{(x)}$  de cada variable se compararon las variables correspondientes al testigo. El  $IRIF_{(x)}$  se obtiene al restar una unidad al índice de tolerancia (Porta et al., 1999, pp.51-56), ya que éste permite evaluar la respuesta biológica en un suelo contaminado, ambos índices se determinaron con el método de Vázquez-Luna et al., (2010) modificado de (Rivera & Trujillo, 2004, pp.369-376).

El IRIF indica el deterioro de las variables fisiológicas a causa del contenido HTP de cada tratamiento. El IIF indica el efecto fitotóxico total por tratamiento, considerando los IRF de todas las variables fisiológicas. Para ello se aplicaron las siguientes ecuaciones:

$$IRIF(x) = 1 - \left[ \frac{TpR1}{Tt} \right]$$

Dónde:

IRIF (x) = Índice Relativo de Impacto Fisiológico

Tp = Tratamiento con HTP.

Tt = Tratamiento testigo.

$$IIF(x) = \frac{\sum_{i=1}^n IRIF(x)}{n}$$

Dónde:

IIF: Índice de Impacto Fitotóxico.

IRIF (x): Índice Relativo de Impacto Fisiológico para la variable x.

n: número de variables

Los resultados se interpretaron bajo el criterio de: si IRIF (x), es igual a cero: el efecto es neutro (**no afecta a la variable**), pero si es mayor de cero el efecto es negativo (**inhibición**); si el IRF (x) es menor de cero el efecto es positivo sobre la variable (**estimulación**) (Arias et al., 2017, pp.411-419).

b) Parámetros del suelo contaminado, posterior a la biorremediación y del suelo sin contaminar.

A los 70 días en todos los tratamientos fueron realizados análisis de pH, nitrógeno, fósforo y potasio asimilable, materia orgánica al suelo, foliares y de raíces con los análisis Materia seca total, N, P y K y Relación C/N.

En los análisis estadísticos se tuvo en cuenta que todos los caracteres cumplieren los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza para efectuar un ANOVA. La discriminación de las medias según el procedimiento de Tuckey, con significación del 5% en los casos en que el ANOVA resultó significativo. Se empleó como herramienta de trabajo el programa estadístico Statgraphics Centurión, 2012.

### CAPÍTULO III.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Algunos tratamientos mostraban síntomas de clorosis, sin comprometer hasta ese momento su desarrollo. En el Tratamiento 7 a los 39 días se detectó en el tallo una larva viva de prodenia (*Spodoptera sp*) sin que ocasionara daños sensibles, de igual forma se encontraron 2 larvas en el suelo dentro de una bolsa sin afectación.

En la Tabla 3 se expresa la concentración de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) y Grasas y Aceites (G y A) en cada sustrato utilizado a los 270 días del proceso de compostaje en biopilas y los valores antes de comenzar el proceso de biorremediación (tiempo cero).

**Tabla 3.**Concentración de HTP y G y A por cada tratamiento a los 270 días de compostaje.

Tratamientos	HTP			G y A		
	Inicial	270 días	%	Inicial	270 días	%
Bagazo	10 000	6 075	39,3	25 000	11 975	52,1
Cachaza	10 000	6 225	37,8	25 000	13 050	47,8
Aserrín	10 000	6 375	36,3	25 000	12 050	51,8
Pulpa de café	10 000	5 950	40,5	25 000	11 100	55,2
Estiércol vacuno	10 000	4 550	54,5	25 000	9 100	63,6
Thalassia	10 000	5 750	42,5	25 000	10 850	56,6
Control	10 000	4 850	51,5	25 000	9 725	61,1

De la tabla anterior se aprecia que la reducción de los HTP, G y A en esa fecha del muestreo fue superior en las G y A, en ambos casos, los tratamientos con mejor respuesta fueron el estiércol vacuno, thalassia, control y la pulpa de café, en todos los caso con un rango de reducción de los contaminantes entre 40,5 y 54,5% en los HTP y entre 63,6 y 55,2% en las G y A respectivamente, aunque en este último todos los tratamientos redujeron por encima del 45%.

Resulta significativo destacar el comportamiento que tuvo el control, cuyas cifras se redujeron por encima de 5 de las combinaciones de sustratos empleados para biorremediar. Hay que señalar que en el caso de los HTP la norma SERMANAD (2012) regula que concentraciones de hasta 6000 mg.kg<sup>-1</sup> de HTP en suelo son permisibles para uso agrícola, lo que coloca a las variantes control, estiércol vacuno, thalassia y pulpa de café dentro de ese rango, y muy cercano también el tratamiento con bagazo.

El comportamiento, "supuestamente atípico" del control pudiera ser atribuido a la percolación o lixiviación que estuvo presente en una gran parte del tiempo que duró el proceso de compostaje, por demás visible en el fondo del recipiente (aunque en todas las variantes a lo largo del tiempo pudo apreciarse residuos de hidrocarburos depositados en el fondo de las bandejas).

A los 270 días, en el momento de la siembra de las plantas indicadoras, en las bolsas fue perceptible el olor a hidrocarburo en todas las variantes, con menor cuantía en el tratamiento control, lo que puede derivarse del proceso de percolación que mantuvo durante el ciclo de compostaje. De igual forma en los tratamientos de bagazo, thalassia y aserrín, se detectó la presencia de trozos sin descomponer, esto fue visto también al final del ciclo de las plantas indicadoras (70 días), lo que puede indicar un proceso de compostaje inferior a los rangos termófilos establecidos, que no permitió la descomposición plena de los sustratos implicados en el proceso biológico, y que evidentemente pudo influir en el crecimiento y desarrollo de las plantas indicadoras, independiente de la reducción de HTP y de las G y A obtenida.

Ojeda et al., (2020) en biopilas que contenían mezcla de gramíneas (caña y King grass) estiércol vacuno + 5% de leguminosa + flor de agua conformadas a 5 metros de largo por 2 metros de ancho y 1 metro de alto en condiciones abiertas encontraron que la temperatura mantuvo indistintamente en todos los tratamientos la secuencia de fases: Mesófila, Termófila y Mesófila II, con una duración del proceso de compostaje en los tratamientos que contenían

*S. officinarum* y *P. purpurea* entre 105-110 días y un porcentaje de descomposición de 78,2%, 84,6% y 88,6% respectivamente; mientras que, en los tratamientos que contenían *E. azurea* y *O. sativa* la duración estuvo entre 135-140 días, con una descomposición de 68% y 69,4% respectivamente, sin que dicha extensión influyera en la descomposición alcanzada(pp.129-140).

En el proceso de descomposición aeróbica suceden una fase mesófila inicial ( $T < 45^{\circ}\text{C}$ ), al final de la cual se producen ácidos orgánicos; fase termófila ( $T > 45^{\circ}\text{C}$ ); y fase mesófila final, considerando finalizado el proceso cuando se alcanza de nuevo la temperatura inicial. Cada especie de microorganismo tiene un intervalo de temperatura óptima en el que su actividad es mayor y más efectiva:  $15-40^{\circ}\text{C}$  para los microorganismos mesófilos y  $40-70^{\circ}\text{C}$  para los termófilos. (Suleret al., 1977), citado por (Bueno et al., 2017, p.154). Juzcamaita (2007), refiere que la descomposición microbiana libera gran cantidad de energía en forma de calor, lo cual incrementa la temperatura. Es necesario mantener una temperatura del proceso en el rango adecuado ( $40^{\circ}\text{C} - 60^{\circ}\text{C}$ ), por ello es importante la aireación.

Mayea (1992), indicó que el tiempo de duración de la actividad microbiana, se mide a partir de que la temperatura interior de las pilas se iguala o es menor que la del ambiente, dando como concluido el compostaje cuando recesa toda actividad microbiana termófila en las pilas aunque no siempre quiera esto decir que ya el compost esté a punto plenamente descompuesto, sino que puede verse interrumpido su proceso por agentes externos, manejo inadecuado en su ejecución o alteraciones propiamente microbiológicas(p.22).

La relación C/N se considera como un indicador del grado de avance del proceso de compostaje, así al inicio del proceso esta relación debe ser del orden de 30:1 y al final cuando se alcanza la maduración del compost puede ser de 10:1. En el proceso de descomposición de abonos verdes se ha reportado que plantas con relaciones C: N mayores a 27 inmovilizan N, mientras que plantas con una relación C: N menor a 27 mineralizan N, siendo 25 el valor crítico de equilibrio entre inmovilización y mineralización (Martínez y López, 2001, pp.9-17).

La influencia que ejerce la relación C/N en el proceso de compostaje ha sido señalada por Bohórquez et al., (2014), al evaluar la calidad de un compost elaborado con diferentes combinaciones de subproductos del proceso de molienda de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.) en el Ingenio Riopaila-Castilla, Valle del Cauca, Colombia, al determinar que la relación carbono-nitrógeno inicial de las mezclas es fundamental para obtener una buena calidad del compost y puede condicionar el tiempo de compostaje para una adecuada maduración con máximo contenido de nutrientes a los 90 días(pp.73-81)

Sin embargo, es también conocido que como consecuencia de la biodegradación se forman compuestos carboxílicos más polares y solubles que los hace más biodisponibles que los hidrocarburos originales. Esto se traduce en aumento de la toxicidad durante la evolución de un proceso de biorremediación, generando un incremento en los primeros días del proceso y luego una disminución hasta niveles no tóxicos o menos tóxicos (Hubálek et al., 2007, pp.1-7); (Al-Mutairi et al., 2008, pp.142-148); (Ramírez, 1991, p.58). Resulta imprescindible para evaluar el comportamiento de las plantas indicadoras conocer el comportamiento mostrado por las biopilas durante el tiempo que duró el proceso; esa información puede aportar criterios para una mejor comprensión de los resultados.

En la tabla 4 se aprecian algunos componentes de la fertilidad del suelo +sustratos a los 270 días, previo al montaje del experimento.

**Tabla 4.**Componentes de la fertilidad del suelo + sustrato a los 270 días

Tratamientos	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub> (mg.100g <sup>-1</sup> )	K <sub>2</sub> O ( mg.100g <sup>-1</sup> )	pH (Kcl)	M.O (%)
Bagazo	40,55 <sup>c</sup>	22,22 <sup>de</sup>	6,77 <sup>e</sup>	2,97 <sup>b</sup>
Cachaza	100,87 <sup>b</sup>	32,15 <sup>cd</sup>	6,97 <sup>d</sup>	4,55 <sup>a</sup>
Aserrín	33,40 <sup>d</sup>	15,70 <sup>e</sup>	7,08 <sup>d</sup>	4,62 <sup>a</sup>
Pulpa de café	47,15 <sup>c</sup>	145,65 <sup>a</sup>	7,26 <sup>bc</sup>	4,8 <sup>a</sup>
Estiércol vacuno	132,0 <sup>a</sup>	79,95 <sup>b</sup>	7,45 <sup>b</sup>	4,95 <sup>a</sup>
Thalassia	46,3 <sup>c</sup>	41,0 <sup>c</sup>	7,34 <sup>b</sup>	3,62 <sup>b</sup>
Control	14,9 <sup>e</sup>	18,80 <sup>ef</sup>	7,69 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>
Testigo	2,92 <sup>f</sup>	8,85 <sup>f</sup>	5,44 <sup>f</sup>	2,55 <sup>b</sup>
ES	0,034*	0,103*	0,213*	0,125*

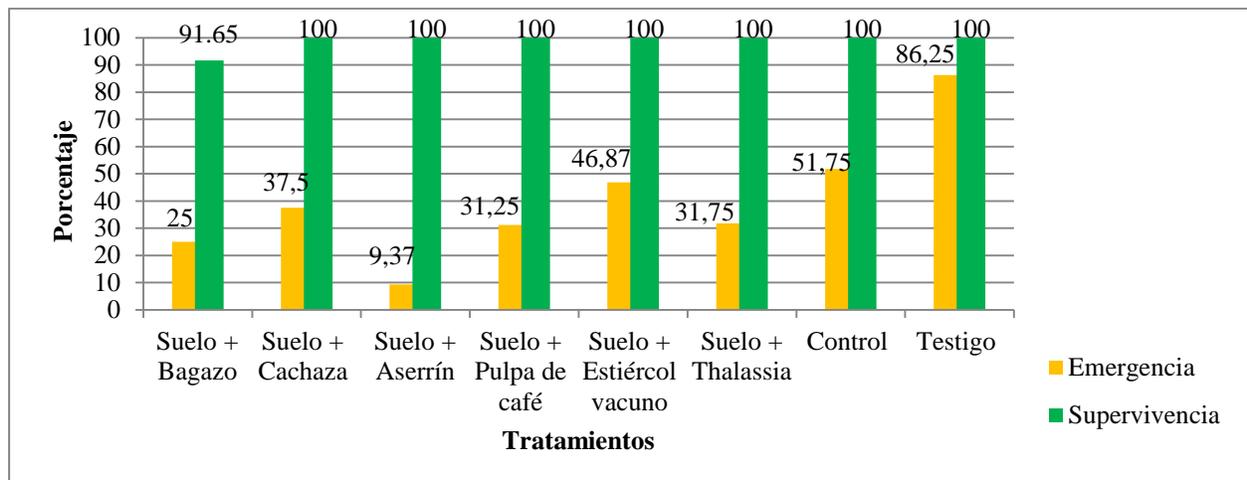
Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey ( $P \leq 0,05$ )

Todos los tratamientos biorremediados con sustratos alternativos, incluido el control superaron al testigo en el contenido de fósforo, potasio asimilable, pH y materia orgánica, con valores muy favorables para el crecimiento y desarrollo de las plantas, donde evidentemente tiene relación con el sustrato utilizado como biorremediador y sus propiedades. En el caso del control, se aprecia el efecto directo de la petrolización en los indicadores evaluados.

El estiércol vacuno mostró el mayor contenido de fósforo asimilable, seguido de la cachaza, pulpa de café, thalassia y bagazo. Los valores más bajos estuvieron en aserrín, el control y el testigo. En todos los casos difirieron significativamente ( $p \leq 0,05$ ). En cuanto al potasio, el tratamiento con pulpa de café mostró el mayor valor, seguida del estiércol vacuno, con diferencias estadísticas entre sí. En orden descendente se comportaron la thalassia, cachaza, bagazo, aserrín, el control y el testigo, este último con diferencia absoluta de todos los tratamientos.

En cuanto al pH, el valor más elevado del mismo se obtuvo en el control (7.69), con significación absoluta del resto de los tratamientos, seguido del estiércol vacuno, thalassia, y pulpa de café, sin diferencias entre sí, aserrín, cachaza, bagazo y el testigo (6.23), con el menor nivel de significación. El contenido de materia orgánica fue mayor en el estiércol vacuno, pulpa de café, control, aserrín, cachaza, thalassia, control y el testigo.

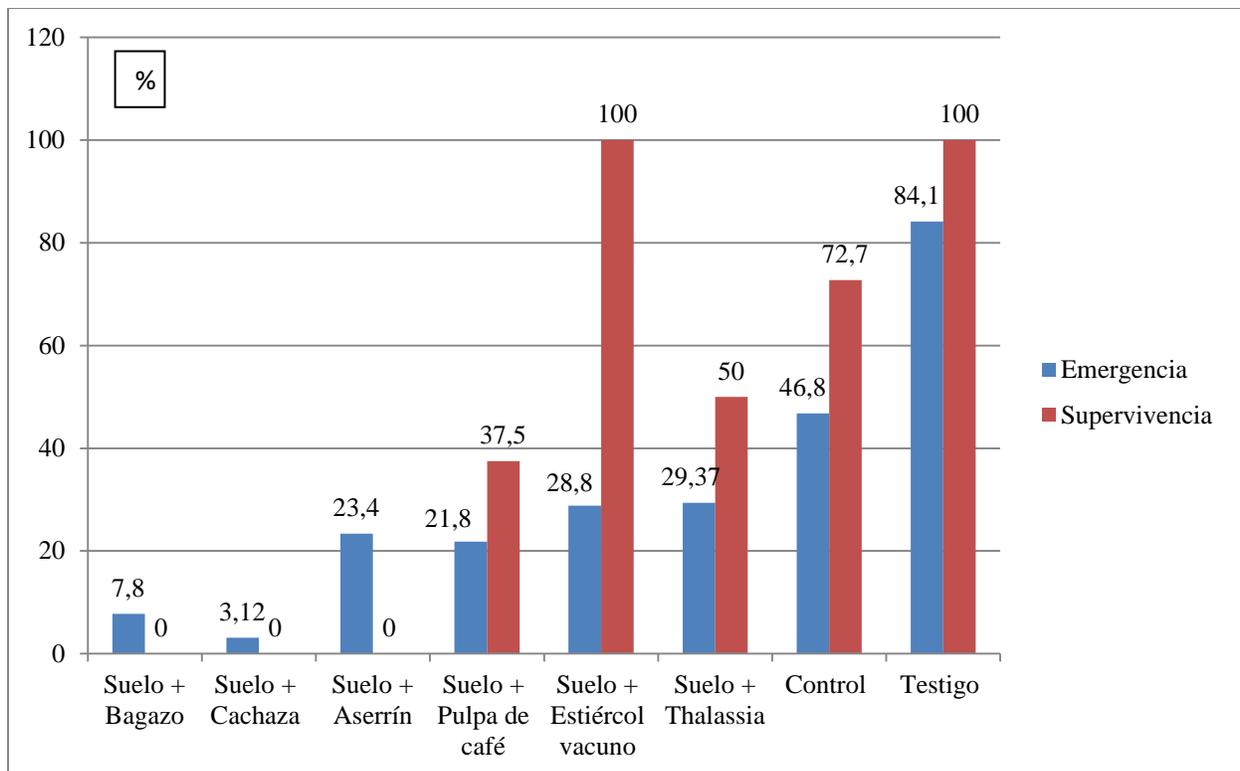
El aumento de estos indicadores, no significa que sea benéfico como lo manejan diferentes autores, ya que dicho incremento se debe a la presencia de material petrogénico y no biogénico, lo que puede representar un riesgo ecotóxico en un plazo menor (Martínez y López, 2001, pp.9-17).



**Figura 1.** Emergencia y supervivencia de *Leucaena leucocephala*

Las pruebas de germinación practicadas previas al montaje del experimento arrojaron un 100% de germinación de las semillas de las dos especies concebidas como plantas indicadoras.

De forma general todos los tratamientos con *Leucaena leucocephala* emergieron, sin embargo el porcentaje alcanzado fue muy variable, encontrando tratamientos inferiores al 30% ( S+B y S+A, ) , entre 30 y 45% ( S+C, S + EV) y superiores al 50% ( S + P C y el Testigo, que alcanzó la mejor emergencia con 86,25%. Estuvo presente una extensión en el tiempo de la emergencia en todas las variantes. La supervivencia de *Leucaena leucocephala* (L.) fue del 100%, excepto en el tratamiento S + B (91,65%).



**Figura 2.** Emergencia y supervivencia de *Crotalaria juncea* (L.)

La *Crotalaria juncea* (L.) mostró una menor emergencia en relación a *Leucaena leucocephala*. En la figura se aprecia que tres tratamientos no sobrevivieron (Suelo + Bagazo, Suelo + Cachaza y Suelo + Aserrín). De los tratamientos emergidos estuvieron por debajo del 30% (Suelo + Bagazo, Suelo + Cachaza, Suelo + Aserrín y Suelo + Pulpa de café), y superiores al 40% el Control y el Testigo. La respuesta de estos dos tratamientos resultó muy similar a la obtenida en *Leucaena leucocephala*. De forma general la emergencia en esta especie fue más concentrada, no hubo un extendido de la misma en el tiempo.

En los tratamientos Suelo + Bagazo, Suelo + Cachaza y + Suelo + hubo una emergencia baja, pero las plántulas murieron en los 5-7 días posteriores, todas con una sintomatología de necrosis apical descendente y pudriciones a nivel del cuello de la planta. Una vez establecidas, lograron una supervivencia del 100%, excepto en los tratamientos Control y Suelo + Thalassia.

En la Tabla 5 se aprecia un consolidado de la emergencia y supervivencia en ambas especies.

**Tabla 5.**Emergencia y supervivencia total por especies.

Especies	Emergencia (%)	Supervivencia (%)
<i>Leucaena leucocephala</i>	40,46	88,24
<i>Crotalaria juncea</i>	22,46	27,65

La emergencia en ambas especies resultó baja (40,6 y 22,46% en *Leucaena* y *Crotalaria* respectivamente), mientras que la supervivencia alcanzó el 88,24% en *Leucaena* y sólo el 27,65% en *Crotalaria*. Hay que decir, que estas dos especies mostraron muy buena germinación de las semillas) del 100% o cercana a este valor), por demás dos especies que destacan su alto poder germinativo, aún en condiciones limitadas.

El comportamiento de estas variables en las condiciones del experimento lo podemos asociar a una influencia negativa de los sustratos utilizados como biorremediadores, que aunque disminuyeron las concentraciones de HTP, no se descompusieron debidamente y al parecer "retuvieron" los hidrocarburos afectando la emergencia de las semillas por el efecto concentrado de los mismos. Esto se contrasta con una mejor respuesta en el control, sin la presencia de cualquier tipo de residuo. Hubo inhibición de la elongación del hipocótilo, daños visibles en los cotiledones y primordios, al parecer por pudrición, y aun cuando emergían las plantas, estas se doblaban podridas. Muy significativo resulta que estamos en presencia de concentraciones bajas de HTP, en su mayoría dentro del rango permisible para utilizar como suelos agrícolas, por lo que no debían existir efectos adversos en la germinación y emergencia de las semillas.

Los efectos negativos pueden estar dados porque la capa hidrofóbica formada por el petróleo disminuye la retención de agua hasta en 50 % respecto a suelos no contaminados que consiste en la hidratación de proteínas y otros coloides e inicia la activación de las enzimas que aumentan el metabolismo, la elongación de las células de la radícula y la emergencia de la plántula(Sawatsky y Li ,1997) y afecta la primera etapa de la germinación (Ross y Salisbury, 2000), citados por (Vázquez et al., 2010, pp.183-191). Resultados similares fueron reportados por Quiñones et al., (2003) en dos variedades de maíz expuestas en suelo con 35 000 mg.kg<sup>-1</sup>de petróleo(pp.585-594). En los tratamientos Suelo + Bagazo y Suelo + Cachaza en *Crotalaria juncea* pudo apreciarse plantas muertas con micelio de hongo blanquecino en el cuello de la planta, muy cercano a la formación de la raíz.

En *Leucaena* a los 53 días se encontró clorosis en los tratamientos Suelo + Cachaza y Suelo+ Estiércol vacuno, mientras que en *Crotalaria juncea* se encontró clorosis a los 33 días en el tratamientos Suelo + Estiércol vacuno. Se destaca, que a pesar de su emergencia deficiente y pobre supervivencia, las plantas que lograron crecer mantuvieron vigor todo el tiempo, incluso el Testigo a los 70 días floreció. Fue característica en esta especie una emergencia más rápida que en *Leucaena*, pero con muertes en un período muy cercano a la emergencia.

**Tabla 6.**Emergencia acumulada en el tiempo por especies.

No	Tratamientos	<i>Leucaena leucocephala</i> / <i>Crotalaria juncea</i>						
		Días (%)						
		6	15	17	24	29	50	70
1	Suelo + Bagazo			50/100	75	90	95	100
4	Suelo + Cachaza	86,6/100	100/10	-	-	-	-	-
7	Suelo + Aserrín	0/50	33,3/50	60/50	70/50	85/50	85/50	
10	Suelo + Pulpa de Café	80,0/62,5	100	-	-	-	-	-
13	Suelo + Estiércol Vacuno	80/57	100	-	100	-	-	-
16	Suelo + Thalassia	60/83,3	80/100	100	-	-	-	-
19	Control	81,8/75	100/100	-	-	-	-	-
22	Testigo	88,4/91	100/100	-	-	-	-	-

De la Tabla anterior se puede apreciar, cómo en los primeros 17 días hubo una mayor emergencia de las plantas en las dos especies, con mayor porcentaje en *Crotalaria juncea*, la cual no continuó la emergencia posterior a este tiempo, mientras que *Leucaena leucocephala* extendió la misma hasta los 24, 29, 50 y 70 días respectivamente. Esto indica que las semillas evidentemente estuvieron sometidas a condiciones no favorables que impidieron su emergencia entre 6-12 días

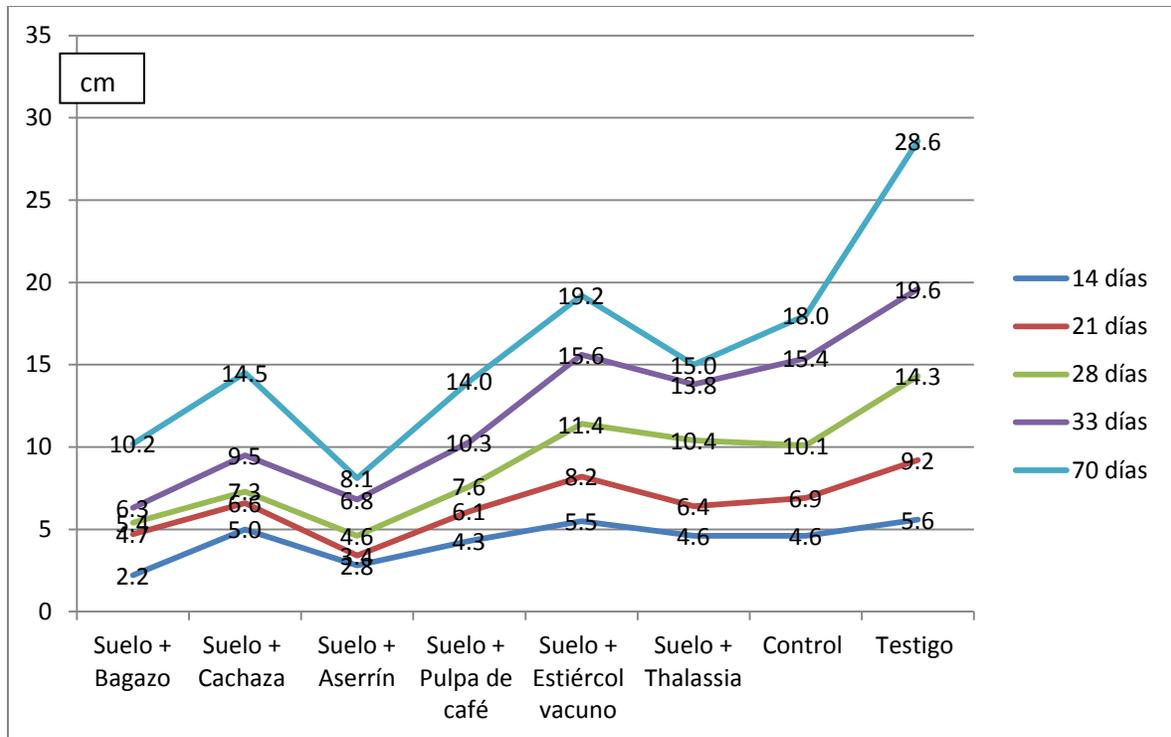
(período en el que habitualmente emergen estas especies de plantas) Resulta evidente la buena calidad de la semilla, al permanecer durante 70 días y lograr completar su emergencia.

Vázquez et al., (2010) evaluaron los efectos tóxicos que produce un suelo Gleysolmólico contaminado con petróleo crudo, sobre plántulas de dos especies de leguminosas en concentraciones desde 10 000- 80 000 mg.kg<sup>-1</sup> en *Leucaena* y 17000- 32 000 mg.kg<sup>-1</sup> para *Crotalaria* el testigo con solo 150 mg.kg<sup>-1</sup>. La emergencia de *Leucaena leucocephala* fue 29% menor con 80 000 mg.kg<sup>-1</sup> de HTP, mientras que *Crotalaria incana* disminuyó 30% con 32 000 mg.kg<sup>-1</sup> de HTP. Respecto a los testigos, ambas especies mostraron un retraso de cinco días en la emergencia de las plántulas cuando se expusieron a altas concentraciones de HTP(pp183-191). Como se aprecia, se trata de concentraciones muy superiores a las presentes en el trabajo, lo que indica que hubo un efecto marcado de inhibición de las semillas, aun en presencia de concentraciones de HTP muy por debajo de las citadas anteriormente.

Vázquez et al., (2010) encontraron que las plántulas de *Crotalaria incana* fueron más sensibles a los HTP que aquellas de *Leucaena leucocephala*, a pesar de que las primeras fueron expuestas a menores concentraciones. Esto indica que esta última especie presenta una tolerancia espontánea al petróleo en el suelo(pp.183-191) Por otra parte, las semillas de *L. leucocephala* son de mayor tamaño que las de *C. incana* y numerosos estudios muestran que existe un efecto protector relacionado al tamaño de la semilla (Dolan, 1984). Leishman et al., (2000), citados por(Vázquez et al., 2010, pp.183-191), mencionan que el tamaño de la semilla es una característica evolutiva.

. Los resultados obtenidos en ensayos con *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria incana* muestran que los HTP en el suelo desencadenan varios daños fisiológicos sobre las plantas expuestas a altas concentraciones, entre ellos el retraso y disminución de las tasas de emergencia (Vázquez et al., 2010, pp.183-191), sin embargo, en estudios realizados por Rivera-Cruz et al., (2005) se mencionan que *Mimosa pigra* y dos especies de *Cyperus* aumentaron la germinación en 200% por efecto del petróleo en el suelo(pp.326-331).

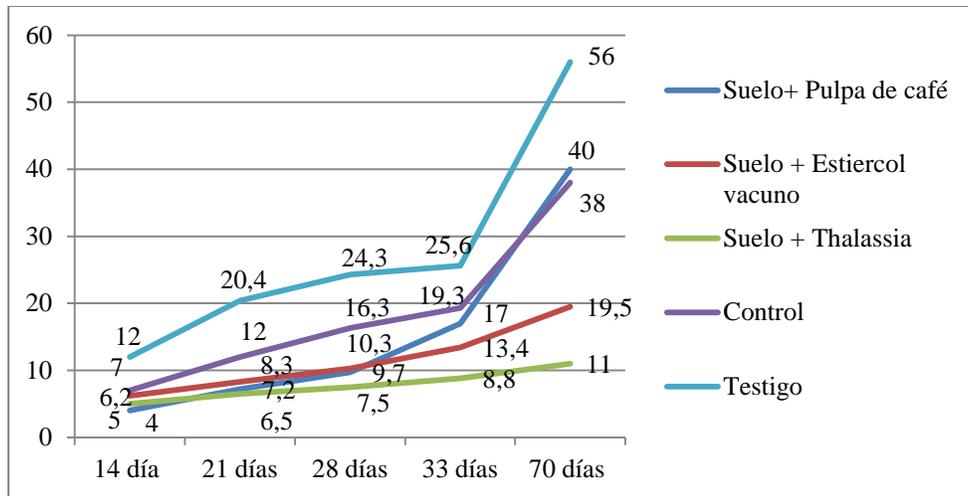
La Figura 3 refleja la dinámica del crecimiento de *Leucaena leucocephala* desde 14 hasta los 33 días y la altura tomada a los 70 días, cuando se realizó el corte. De forma general, pudo apreciarse entre los 14 y 23 días un crecimiento más lento, que se aceleró posteriormente hasta alcanzar la mayor altura en el corte evaluativo.



**Figura 3.** Dinámica de crecimiento *Leucaena leucocephala*

Ojeda et al., (1998) en un suelo pardo Grisáceo con estiércol vacuno descompuesto midieron la dinámica de crecimiento de *Leucaena leucocephala* cv: Perú y observaron que a los 56 días alcanzó los 30 cm, apto para el trasplante, tomando como indicador una altura de 30 cm, resultado muy superior al encontrado en este experimento al comparar el tratamiento S + E V (con residuos de HTP), que a los 70 días, mostraba 19,2 cm de altura(pp.159-164).

Hernández et al., (2019) evaluaron la emergencia y desarrollo del maíz (*Zea mays* l.) en un suelo Pardo grisáceo contaminado con hidrocarburos totales del petróleo en fase inicial y a 340 días posteriores a la biorremediación en biopilas con el empleo de diferentes texturizantes. Encontraron que la altura presentó diferencias estadísticas entre tratamientos en las frecuencias de 7, 14 y 21 días, con tendencias similares: mayor altura en el testigo, seguido por los tratamientos que incluyen estiércol y pulpa de café respectivamente como texturizantes. Se pudo apreciar, un comportamiento general a disminuir en el tiempo la altura de las plantas con relación a la altura inicial(pp.94-102).



**Figura 4.** Dinámica de crecimiento *Crotalaria juncea*

Ojeda et al., (2019) en un suelo Pardo Grisáceo bolsas con similares características del testigo encontraron una altura de *Crotalaria juncea* 92,4cm a los 56 días, con una Tasa de Crecimiento Relativa de 7,23 cm durante todo su ciclo y una Velocidad de Crecimiento de 21,2 cm(pp.23-30).

Hernández et al., (2019) refieren que al igual que *L. leucocephala* y *C. juncea*, el maíz es un cultivo indicador que se utiliza comúnmente para evaluar el efecto de la reducción de la concentración de hidrocarburos en los suelos contaminados a través de las variables: altura de la planta, peso seco foliar y peso seco radicular, los cuales se incrementan cuando los suelos contaminados con hidrocarburos han sido tratados de manera conjunta con estiércol + aserrín y expresan menor desarrollo cuando solamente han sido tratados con estiércol o aserrín por independiente. En el trabajo que se discute no hubo combinaciones de texturizantes, por lo que el efecto obtenido es resultado de cada una de las variables.

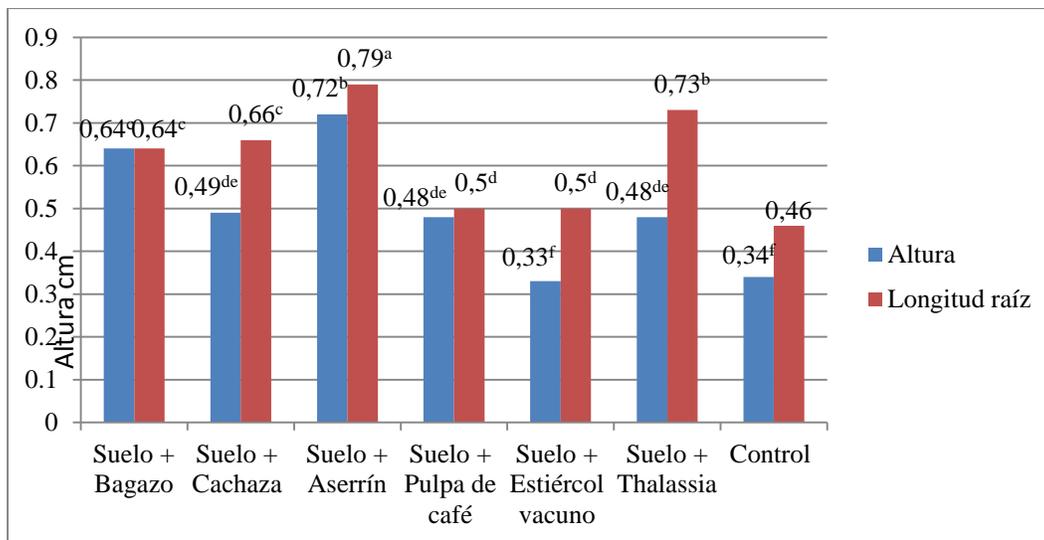
La Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) calculada entre los 21, 28 y 33 días y la ganancia de altura respecto al tiempo (Velocidad de Crecimiento, VC) se expresan en la Tabla que sigue a continuación, donde la TRC fue mayor en *Crotalaria*, coincidiendo las dos especies en todos los tratamientos del Control y en el Testigo. La mayor velocidad de crecimiento estuvo en las dos especies en los tratamiento: Testigo y Control y, con 23,15, 14,2 y 13cm en *Leucaena* y 44, 39,5 33 y 31,5 cm en *Crotalaria*(pp.94-102).

**Tabla 6.** Tasa Relativa de Crecimiento (TRC) y Velocidad de Crecimiento (VC) por especies.

No	Tratamientos	<i>Leucaena leucocephala</i>		<i>Crotalaria juncea</i>	
		Tasa Relativa de crecimiento (TRC cm)	Velocidad de crecimiento (VC cm)	Tasa Relativa de crecimiento (TRC cm)	Velocidad de crecimiento (VC cm)
1	Suelo + Bagazo	2,5- 0,7- 0,9	11,8	-	-
4	Suelo + Cachaza	1,6-0,7- 2,2	9,5	-	-
7	Suelo + Aserrín	0,6- 1,2- 2,2	5,3	-	-
10	Suelo + Pulpa de Café	1,8- 1,5- 2,7	3,7	3,2-2,5-7,3	31,0
13	Suelo + Estiércol Vacuno	2,7- 3,2- 4,2	13,7	2,1-2-3,1	13,3
16	Suelo + Thalassia	1,8-4,0- 2,7	10,4	1,5-1-3,8	6,0
19	Control	2,3- 3,1- 5,3	14,2	5-4,3-12,3	33,0
22	Testigo	3,6- 5,1- 5,6	23,0	8,4-3,9-13	44,0

En el **Anexo No. 2** se observa el crecimiento de las leguminosas en el tiempo.

El Índice Relativo de Impacto Fisiológico (IRF) en la variable altura y longitud radical de *Leucaena leucocephala* se aprecia en la figura que sigue:



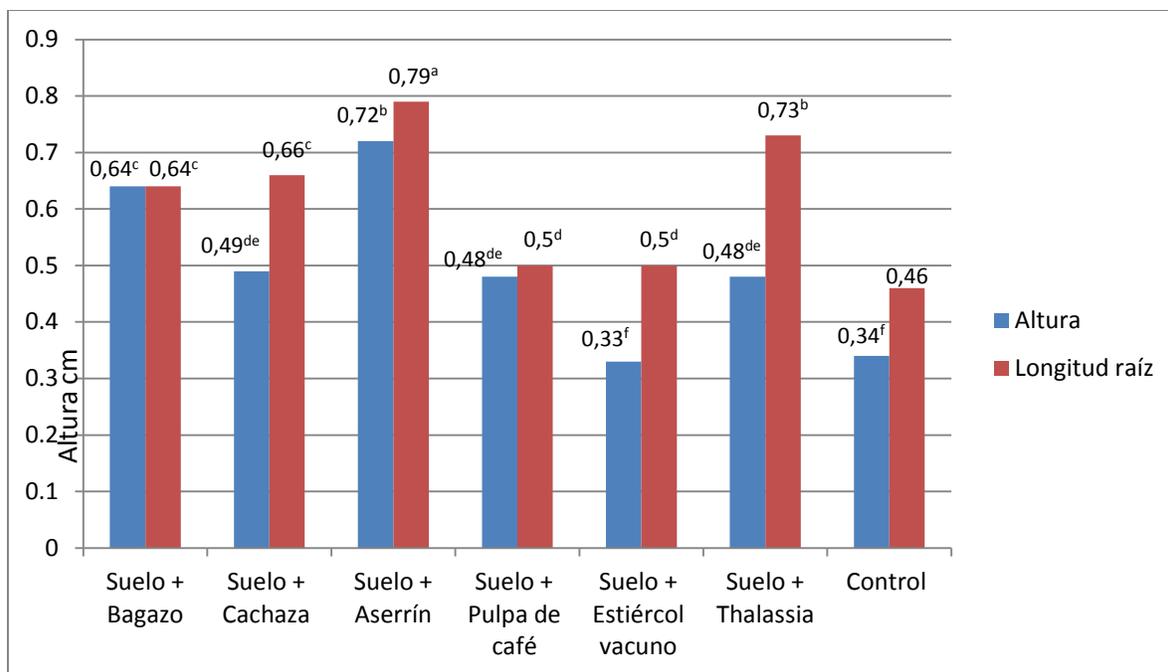
**Figura 5.** Índice Relativo de Impacto Fisiológico (IRIF) respecto a las variables altura y longitud radical en *Leucaena leucocephala*

ES±: 2,129\*

*Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey(P≤0,05)*

El análisis de varianza del IRIF para las variables altura y longitud radicular, mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos, tanto la altura como longitud radicular de *L. leucocephala* fueron inhibidas por el efecto de los HTP. El mayor IRIF respecto a la longitud de la raíz se encontró en el tratamiento S + Aserrín, y el menor índice en el Control, de igual forma se comportó respecto a la altura el tratamiento S + Aserrín como el más alto, mientras que el Suelo + Estiércol Vacuno fue el más bajo. Los mayores IRIF incluyen los sustratos aserrín y thalassia, dentro de los de mayor contenido de HTP, los de menor valor incorporan al control, pulpa de café y el estiércol vacuno (en todos los casos menores contenidos de HTP).

Con anterioridad Rivera et al., (2005), reportaron que la altura de plantas de *Leucaena* fue severamente afectada por las concentraciones más altas de los petróleos intemperizado (79 457 mg.kg<sup>-1</sup> HTP) y nuevo (100 000 y 150 000 mg.kg<sup>-1</sup> de HTP). La mayor reducción se presentó en las leguminosas dormilona (*Mimosa* sp) y zarza (*Mimosa pigra*), donde las plantas no lograron sobrevivir al efecto de la concentración más alta de petróleo (150 000 mg.kg<sup>-1</sup> HTP; en cambio la planta de guaje (*Leucaena* sp.) fue menos sensible a la exposición de la concentración más alta de petróleo nuevo, ya que sobrevivió a su efecto y creció un poco al pasar de 8cm de altura al momento inicial a 13cm después de 120 días de exposición (pp.326-331) Resulta muy significativo cómo en los resultados del trabajo que se discute, la altura pudo ser inhibida en concentraciones tan bajas de HTP y sin embargo crecer en las concentraciones tan elevadas que reportan estos autores.



**Figura 5.** Índice Relativo de Impacto Fisiológico (IRIF) respecto a las variables peso seco aéreo y radicular en *Leucaena leucocephala*.

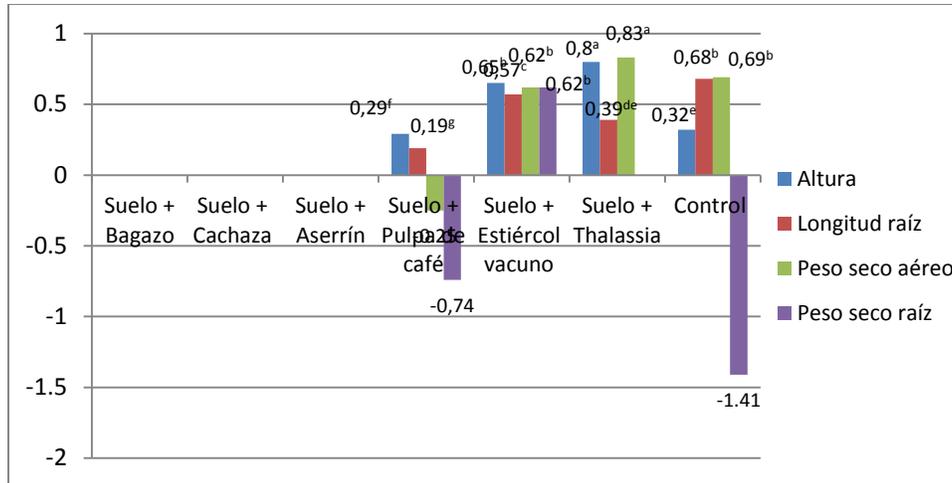
ES±: 3,014\*

Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey ( $P \leq 0,05$ )

De la Figura anterior se aprecia que el IRIF mostró inhibición en las variables evaluadas. De forma general, estos resultados destacan la presencia de niveles de toxicidad con repercusión en el peso seco y aéreo. En este caso los mayores IRIF respecto al peso seco aéreo se encontró en el tratamiento Suelo + Bagazo, los más bajos en Suelo + Pulpa de café y Suelo + Estiércol Vacuno.

El IRIF de las variables altura, longitud de raíz, peso seco aéreo y de raíz en *Crotalaria juncea* se muestra en la Figura 9, donde se aprecia que todos los tratamientos inhibieron el desarrollo de las variables evaluadas, con la excepción de los tratamientos: Control y Suelo + Pulpa de Café, que ejercieron estimulación del peso seco de la raíz y el último además en el peso aéreo. Los mayores IRIF se encontraron respecto a la altura y el peso seco en el sustrato thalassia.

La planta de chipilín (*Crotalaria juncea*) silvestre redujo su crecimiento seis veces por efecto de  $7500 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  HTP en relación al testigo (concentración más cercana a las condiciones del experimento) y tuvo un daño absoluto por el efecto de la concentración  $50\,000 \text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  HTP, que eliminó la planta (Rivera et al., 2005, pp.326-331). Este comportamiento de *Crotalaria* demuestra su sensibilidad a la contaminación por HTP.



**Figura 6.** IRIF de las variables altura, longitud de raíz, peso seco aéreo y de raíz en *Crotalaria juncea*.

ES±: 3,004\*

*Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey(P≤0,05)*

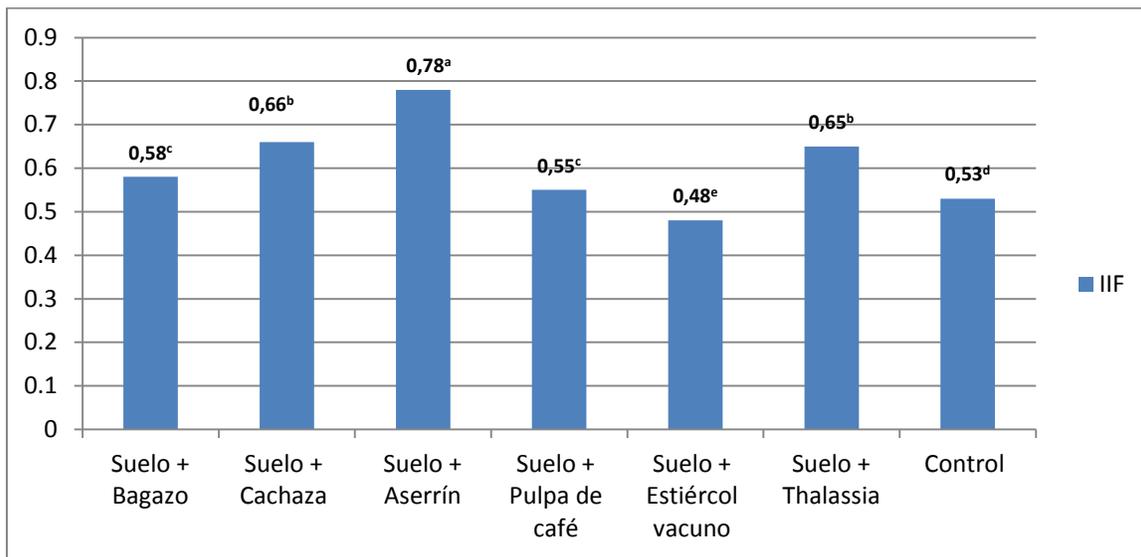
Acosta (2012) en un suelo biorremediado a los 90 días posteriores de la aplicación del bioproducto BIOIL-FC, utilizando cultivos de maíz y frijol, obteniéndose que la planta no recupera la altura, el largo de la raíz, el peso húmedo de la planta, el % de nitrógeno total y el % de proteína bruta. Sin embargo, recupera el % de materia seca de la raíz y aumenta significativamente el peso húmedo y seco de la raíz(pp.32-45)

Ramírez (1991), encontró hasta 4.5 veces menos peso seco de raíz en suelo contaminado con diferentes concentraciones de hidrocarburo(p. 58). Sin embargo, Franco (1993), encontró que el peso seco de las raíces de frijol se ve favorecido por la presencia de hidrocarburos, obteniendo al menos un incremento del doble con respecto al testigo, el cual no tenía hidrocarburo(p.55).

Otros autores, por su parte, han encontrado que las plantas cultivadas en un suelo sin contaminar superaron significativamente a las plantas de los suelos contaminados (15.000, 25.000 y 35.000 mg.kg<sup>-1</sup> de 150.000 mg.kg<sup>-1</sup> de suelo) en todas las variables de crecimiento (altura de la parte aérea, longitud de la raíz principal, volumen radical, peso seco total). En cuanto a las tres concentraciones, los valores para dichas variables no fueron diferentes, excepto para la longitud de la raíz principal, cuyo valor disminuía a medida que aumentaba la concentración de petróleo. Este efecto puede atribuirse a que el petróleo formó sobre la raíz una capa hidrofóbica, la cual limitó la absorción de agua y nutrientes (Quiñones-Aguilar et al., 2003, pp.585-594).

Camarillo et al.,(2015),reportaron la aplicación de índices de germinación y radicular para asignar los valores NOEL (concentración a la que los efectos no son observables) y LOEL (concentración mínima a la que los efectos son observables) de cuatro especies vegetales (*Lactuca sativa*, *Cucumis sativus*, *Brassica juncea* y *Nasturtium officinale*) en jales mineros y observaron que el índice radical es la alternativa más viable para evaluaciones de fitotoxicidad(pp.133-143).

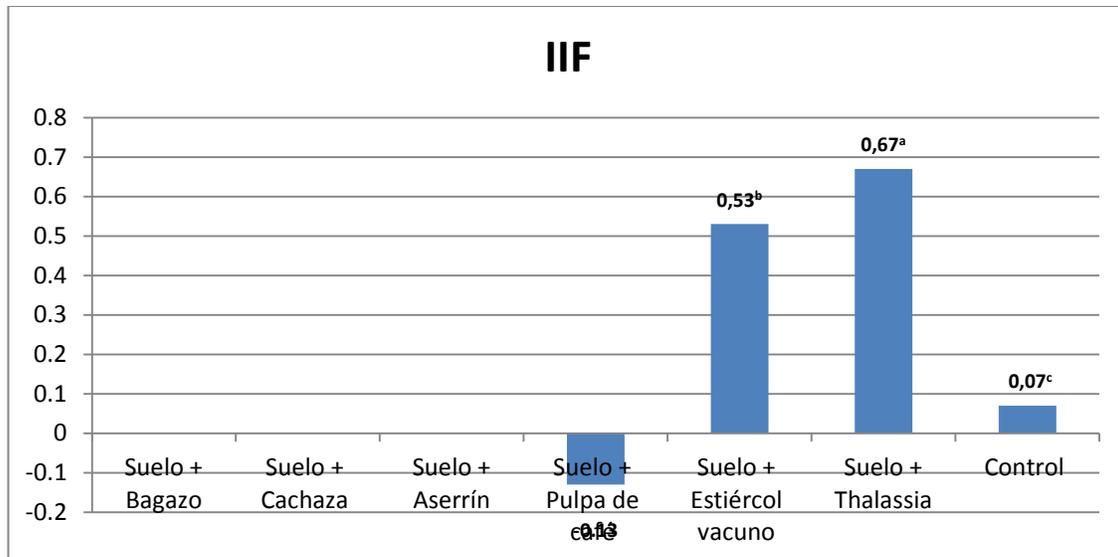
El Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) de *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria juncea* se expresan en las figuras 10 y 11.



**Figura 7.** Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) de *Leucaena leucocephala*

ES±: 1,874\*

Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey ( $P \leq 0,05$ ) *Leucaena leucocephala* alcanzó el mayor IIF en el tratamiento Suelo + Aserrín, con diferencias significativas del resto. No difirieron entre sí los tratamientos Suelo + Cachaza y Suelo + Thalassia, de igual forma Suelo + Bagazo y suelo + Pulpa de café. El menor IIF estuvo en Suelo + Estiércol Vacuno. Algunos autores coinciden en plantear que la toxicidad de un hidrocarburo es el resultado de una interacción compleja y variable entre las características propias del crudo y del suelo (Toro, 2012, p. 10), de acuerdo a este criterio, debe ser tomado en cuenta análisis al suelo una vez concluido el experimento para corroborar estos resultados.



**Figura 8.** Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) de *Crotalaria juncea*.

ES±: 3,146\*

*Letras distintas en la misma columna difieren entre sí, Tuckey(P≤0,05)*

El IIF alcanzado en *Crotalaria juncea* mostró diferencias significativas entre los tres tratamientos con inhibición, con los mayores índices en Suelo + Thalassia y Suelo + Estiércol Vacuno. Se alcanzó estimulación (- 0.59) en el tratamiento Suelo + Pulpa de Café.

Los resultados alcanzados indicaron que en *Leucaena leucocephala* los IIF se incrementaron en los tratamientos con bagazo, cachaza y aserrín, (una mayor concentración de petróleo, con datos a los 270 días), aunque sin diferir de la thalassia, con menor concentración; no así en *Crotalaria juncea* que fue mayor en thalassia y estiércol vacuno, con concentraciones más bajas de HTP. Relacionado con el tema, Luna et al., (2010), al estudiar contaminación simulada de hidrocarburos totales en suelo encontraron que los IIF se incrementaron al aumentar la concentración de petróleo en el sustrato, lo que tuvo repercusiones significativas sobre el crecimiento y desarrollo de *Leucaena leucocephala* y *Crotalaria* y que el IRF para las variables altura, longitud radicular, biomasa aérea, biomasa radicular y biomasa total de plántulas de *L. leucocephala* y *C.juncea* fue siempre mayor a cero en los tratamientos con contaminación de petróleo al ser comparado con el testigo(pp.183-191).

En suelos de textura arenosa, los hidrocarburos no son fácilmente retenidos, aún en presencia de la materia orgánica, por lo que el efecto tóxico es más marcado (Labud et al., 2007,pp.1863-

1871). Este criterio pudiera apuntar a la respuesta que se ha obtenido, aún en presencia de concentraciones de HTP bajas.

Para entender el efecto de los contaminantes del petróleo sobre los suelos es necesario conocer la relación que existe entre la cantidad, composición y grado de afectación sobre los organismos vivos (Al-Mutairi et al., 2008, pp.142-148). Los estudios de contaminación de suelos se pueden realizar por dos vías: mediante análisis químico de los suelos (Kisic et al., 2009, pp.209-216), o bien por la evaluación de la respuesta “in vitro” de plantas que crecen en suelos contaminados (Shahriari et al., 2007, pp. 46-51), lo cual permite evaluar los efectos de los contaminantes sobre los organismos (Porta et al., 1999, pp.51-56). El último es el método empleado en este estudio, por lo que se hacen pruebas de toxicidad en plántulas para medir la respuesta fisiológica a diferentes concentraciones de HTP (hidrocarburos totales del petróleo).

Sanchez (2020) evaluaron el comportamiento del maíz (*Zea mays* L.) en un suelo petrolizado tras un proceso de biorremediación con el uso de diferentes sustratos por la técnica de biopilas con los texturizantes alternativos: bagazo, cachaza, aserrín, pulpa de café, estiércol vacuno y thalassia. La autora encontró que la presencia de hidrocarburos en fase cero de las biopilas no comprometió la emergencia del maíz, pero sí su posterior desarrollo foliar. El peso seco de las raíces se favoreció por la presencia de hidrocarburos en tiempo cero y 340 días, sin correspondencia con el peso seco foliar. El Índice de Impacto Fitotóxico (IIF) confirmó afectaciones de las plantas de maíz en tiempo cero por la presencia de HTP. Después de transcurridos 340 días del proceso en biopilas este índice no mostró afectaciones en la variante estiércol vacuno, sin embargo, hubo efectos negativos en los tratamientos con bagazo, aserrín y cachaza(p.52)

## CONCLUSIONES

1. Los principales componentes de la fertilidad del suelo se incrementaron en los tratamientos contaminados por HTP en relación al Testigo, sin que resulte un efecto benéfico.
2. La emergencia de *L. leucocephala* y *C. juncea* resultó baja (40,6% y 22,46%), mientras que la supervivencia alcanzó el 88,24% y solo el 27,65% respectivamente.
3. El IIF en *L. leucocephala* mostró inhibición de las variables evaluadas, con mayor incidencia en la combinación Suelo + Aserrín, Suelo + Cachaza y Suelo + *Thalassia*, de igual forma en *C. juncea* para los tratamientos Suelo + Estiércol Vacuno, Suelo + *Thalassia* y en el Control hubo inhibición. En este último, el tratamiento Suelo + Pulpa de café el efecto del IIF estimuló las variables evaluadas.
4. Como cultivo indicador a la contaminación por HTP la *L. leucocephala* no resultó tolerante como se recomienda, mientras que *C. juncea* indicador de sensibilidad fue tolerante en la variante de Suelo + Pulpa de café con estímulo de las variables evaluadas.

## **RECOMENDACIONES**

1. Extender la evaluación al sustrato seleccionado como mejor biorremediador con ambos cultivos indicadores.
2. Incorporar nuevas variables para determinar el IRIF que permitan ampliar el criterio de análisis de los resultados que se alcancen.
3. Realizar estudios toxicológicos al suelo para HTP, tanto en la fase previa a la biorremediación como posterior a la siembra de cultivos indicadores.
4. Publicar los resultados alcanzados en el trabajo y divulgar los mismos en espacios vinculados a la actividad agronómica y de mitigación de riesgos por HTP.

## **BIBLIOGRAFÍA**

- Acosta J. B. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba.* (Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Ciencias Técnicas. Mención Ingeniería en Saneamiento Ambiental), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas.
- Adams, R., Zavala-Cruz, J., Morales-García, F. (2008). Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico. II: Afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia.* (33), 483-485.
- Aguilar Q., Cerrato, R. F., Reyes, F. G., Linares, L. F., Vazquez, R. R., y Alarcón, A. (2003). Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia.* 37 (6), 585-594
- Almeida, N., Avelar, P., Soriani, H., Brunetto, G., Nicoloso, F., Antonioli, Z., and Jacques, R. (2015). Interaction between arbuscularmycorrhizal fungi and vermicompost on copper phytoremediation in a sandy soil. *Applied soil Ecology.* 10 (96), 172-182.
- Al-Mutairi N., Bufarsan A. y Al-Rukaibi F. (2008). Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* 74(12), 142-148.
- Amadi A., A. A. Dickson, and G. O. Maate. (1993). Remediation of soils: 1. Effect of organic and inorganic nutrient supplements on the performance of maize (*Zea mays* L). *Water, Air and Soil Pollution.* 66(12), 59-76.
- Amakiri, J. and Onofeghara. (1984). Effect of crude oil pollution on the growth of *Zea mays*, *Abelmoschus esculentus* and *Capsicum frutescens*. *Oil Petrochemical Pollution.* 1(9), 99-105.
- Anderson T., A., E. A. Guthrie, and B. T. Walton. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Sci. Technol.* 27(2) 2630-2636.
- APROLAB, (2007). Manual para la producción de compost orgánico con microorganismos eficaces. Respuesta de cultivos indicadores a la biorremediación de suelos petrolizados.

- Arbaiza. (2011). *Centro Internacional de Tecnología y Transformación de la Madera* (tesis de grado) CITE. Ucayali. Perú.
- Arias A., Rivera, M., y Trujillo, A. (2017). Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (LEGUMINOSAE). *Rev. Int. Contam. Ambiental.* 33(3), 411-419.
- Beegg, J. E. and Turner, N. C. (1976). Crop water deficits. *Adv. Agron.* 28(12), 161-217.
- Benavides, L., Quintero, G., Guevara, A.L., Jaimes, A., Gutiérrez, S.M. y García, J. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA Publicación científica.* 4 ( 5 ) , 88.
- Bermúdez Acosta J. (2012). *Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos a partir del uso de un consorcio bacteriano alóctono en la zona costera de Punta Majagua. Cienfuegos, Cuba.* (Tesis presentada para optar por el grado académico de Master en Ciencias Técnicas. Mención Ingeniería en Saneamiento Ambiental. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas Facultad de Química-Farmacología Departamento de Ingeniería Química).
- Bohórquez, A., Puentes, Y, J. y Menjivar, J. C.(2014). Evaluación de la calidad del compost producido a partir de subproductos agroindustriales de caña de azúcar. *Corpoica Cienc. Technol. Agropecu.* 15 (1), 73-81.
- Boyer, J. S. (1976). *Water deficits and photosynthesis.* Water deficits and plant growth.
- Buendía H. (2012). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante el compost de aserrín y estiércol. *Rev. del Instituto de Investigación (RIIGEO), FIGMMG-UNMSM.* 15( 30), 123- 130.
- Bueno, P., Díaz, M, J y Cabrera, F. (2017) Factores que afectan al proceso de compostaje. Análisis del proceso de compostaje bajo condiciones naturales. *Chemosphere.* 6(25), 154.
- Camarillo Ravelo D., Barajas Aceves M. y Rodríguez Vázquez R. (2015) Evaluación de la fitotoxicidad de jales mineros en cuatro especies empleadas como bioindicadores de metales pesados. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 31 (2), 133-143. DOI: 10.1016/j.egypro.2011.03.149

- Castro, F., Forero, D., Ramírez, J. y Reina, M. (2014). Evaluación de la contribución económica del sector de hidrocarburos colombiano frente a diversos escenarios de producción. FEDESARROLLO para la Unidad de Planeación Minero Energética –UPME. 2 (10), 102.
- CEAC C. d. E. A. d. C. (2017). *Evaluación a escala piloto de la ecotecnología de biopilas para la biorremediación de residuos petrolizados utilizando texturizantes locales*. [www.ceac.cu/proyectos/proyectos-nacionales/biopilas](http://www.ceac.cu/proyectos/proyectos-nacionales/biopilas)
- Chaineau H., C., J. L. Morel, and J. Oudot.(1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ Quality* . 12(6), 1478-1483.
- Cordero-Sanchez, L. (2020). *Comportamiento del maíz (Zea mayz L.) como bioindicador de un suelo petrolizado tras un proceso de biorremediación por biopilas*( Tesis en opción al Grado científico de Maestría en Agricultura sostenible. Universidad de Cienfuegos).
- Cubillos, J., Pulgarín, P., Gutiérrez, J. y Paredes, D. (2014). Phytoremediation of Water and Soils Contaminated by Petroleum Hydrocarbons.*Ingeniería y Competitividad*. 3 (16), 131-146.
- Damian C., F. (1999). *Estudios de ecotoxicidad, biorremediación y fito-biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos* .( Tesis de grado, Facultad de Ciencias, UNAM. México).
- Díaz-Martínez., E., Alarcón, A., Ferrera- Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J. J. y García- Barradas, O.( 2013). Crecimiento de *Casuarina equisetifolia (Casuarinaceae)* en suelo con diesel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Biología Tropical*. 13 (61), 1039- 1052
- Dolan R.W. (1984). The effect of seed size and maternal source on individual size in a population of *Ludwigialeptocarpa .Onagraceae*.*Am. J. Bot.* 71(17), 1302–1307.
- Ellis, R. and Adams, R. S. (1960).Contamination of soil by petroleum hydrocarbons. *SoilSci. Soc. Am. Proc.* 8(26),197-216.
- Escalante, E. (2000). *Estudio de Ecotoxicidad de un suelo contaminado con hidrocarburos*. (Tesis para obtener el grado de maestro en biotecnología. Universidad Autonoma Metropolitana, México. D.F.).

- Fernández Luqueño, F. (2003). *Bioestimulación de suelo contaminado con gasolina y su efecto en el desarrollo de Vicia sativa L.* (Tesis profesional para la obtención del Título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Autónoma de Chapingo, México).
- Ferrera-Cerrato, R., Rojas- Avelizapa, N., Poggi- Varaldo, H. M., Alarcón, A. y Cañizares-Villanueva, R. O. (2006). Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 5(48), 179 – 187.
- Franco, S. E. (1993). *Respuesta de frijol (Phaseolus vulgaris) a la presencia de contaminantes de tipo hidrocarburo.* (Tesis de grado. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México).
- Freedman, B. (1989). Environmental Ecology. The Impacts of Pollution and other Stresses on Ecosystem Structure and Function. *Academic Press*. 12(36). 424
- Frick, C. M., R. E. Farrell y J. J. Germida. (1999). Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. *Petroleum Technology Alliance of Canada*. 58(52). pp. 82-99
- Garbisu, C., Becerril, J., Epelde, L. & Alkorta, I. (2007). Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Revista Ecosistemas*. 16(2), 44-49.
- Gianfreda, L. & Rao, M. A. (2008). Interactions between Xenobiotics and Microbial and Enzymatic Soil Activity. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 38(14), 269–310.
- González R. y G. A. (1995). *Impacto ambiental de la industria petrolera en el estado de Tabasco. Memoria de Práctica Profesional.* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Chiapas. Villaflores, Chis., México).
- Guerrero. (2002). Curso de suelos. Centro de Gestión y Tecnología Ambiental. UNALM-Perú. .
- Guerrero, J. (2001). El Compost un abono orgánico compuesto para mejorar y dar vida a nuestros suelos. Taller de conservación de suelos y agricultura sostenible. UNALM. Lima.

- Hernández, A. E. (1997). *Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en crecimiento de frijol variedad Michoacán 12-A3*. (Tesis de Maestría en Ciencias, IRENAT, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México).
- Hernández Rodríguez, C., Ojeda Quintana, L. J., Arteaga Rodríguez, O., & Sánchez Cordero, L. (2019). Emergencia y desarrollo del maíz (*Zea mays* L.) en un suelo contaminado con Hidrocarburos Totales del Petróleo en fase inicial y a 340 días de biorremediación en biopilas. *Revista Científica Agroecosistemas*. 7(2), 94-102.
- Hubálek, T., Vosahova ,S., Mateju, V., Kovacova, N. and Novotny, C. (2007) Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 52(85), 1-7.
- Isbister, J. D., G. L., Anspach, J. F., Kitchens, and R. C. Doyle.(1984). Composting for decontamination of soil containing explosives.*Microbiol.* 7(25), 47-73.
- Juzcamayta, J. (2007). *Biorremediación de suelos contaminados mediante el uso de organismos vivos*.(Tesis de grado, Lab. de biorremediación de la UNALM. Lima. Perú).
- Kimura, R. (2005). *Evaluación de los efectos del producto “ENZYMPLUS” (activador biológico) en la elaboración de compost utilizando dos tipos de estiércol (vacuno y ovino)*. (Tesis de grado, UNALM. Lima).
- Kisic I., Mesic S., Basic F., Brkic V., Mesic M., Durn G., Zgorelec Z. and Bertovic L. (2009). The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma*. 87(149), 209–216.
- Labud V., García C. y Hernández T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* .66(100), 1863–1871.
- Lin, Y & Kunli, B. (2016).Removal of pharmaceuticals and personal care products by *Eichhorniacrassipe* and *Pistiastratiotes*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*.13 (58), 318-323.
- López, M. A. (1991). *Causas, Procesos y Consecuencias de la contaminación de suelos*. (Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México).

- Luna D. V., Estrada, M. C., Cruz, M. C. R., Ceballos, Á. I. O., y Izquierdo, F. (2010). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 26(3), 183-191.
- Maldonado, E., Chávez-Rivera, M C., Izquierdo, F. y Palma, D J. (2010). Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 26(2), 121-136.
- Marín Velásquez. T. D. (2016). Enfoque UTE, V.7. N.13 [http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/e-ISSN: 1390-6542 / p-ISSN: 139-142](http://ingenieria.ute.edu.ec/enfoqueute/e-ISSN:1390-6542/p-ISSN:139-142)
- Martínez, V y López, F. (2001). Efectos de los hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*. 14 (19), 9-17.
- Mahar, A., Wang, P., Ali, A., Awathi, M.K., Lahori, A., Wang, Q., Li, R. and Zhang, Z. (2016). Challenges and opportunities in the phytoremediation of heavy metals contaminated soils: A review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 16(126), 111-121.
- Mayea, S. (1992). *Tecnología para la producción de compost (biotierra) a partir de la inoculación con microorganismos de diversos restos vegetales*. CIDA. MINAGRI.
- McCullough J., Terry C., Sally M., Blaine M. and Anna C. (1999). *Bioremediation of metals and radionuclides*. Nabir.
- McFarland, M. J., Xiu, J. Q., Aprill, W. A. and Sims, R. C. (1989). Biological composting of petroleum waste organics using the white rot fungus. *Phanerochaete chrysosporium*. *Environmental Biotechnology*. 6 (2), 1-5.
- McGill, W. B., Rowell, M. J. and Westlake, D. W. S. (1981). *Biochemistry, Ecology and Microbiology of petroleum components in soil*. *Soil Biochemistry*. Paul, E. A. and Ladd, J. N. (eds.). Marcel Dekker Inc.
- Méndez-Natera, J. R., Salazar, R y Velasquez, A. (2006). Efecto del derrame petrolero simulado y la aplicación de un remediador sobre la germinación de semillas y desarrollo de plántulas en dos tipos de maíz (*Zea mays* L.). *Revista Científica UDO Agrícola* 6 20(1),102-108.

- Méndez-Natera, J. R., C. Roque; K. Zapata y V. A. Otahola-Gómez. (2004). Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays L.*) cv. Himeca 95. *Revista Científica UDO Agrícola* 4. 15(1), 66-71.
- Méndez-Natera, J. R., C. F. Mujica-Blanco y F. B Pino-Morales. (2003). *Efecto de la contaminación con petróleo sobre la germinación de las semillas de maíz (Zea mays L.) en dos suelos del estado Monagas*. Programa y Libro de Resúmenes del V Congreso Venezolano de Ecología del 03 al 07 de noviembre de 2003. Isla de Margarita, Estado Nueva Esparta.
- Morgan y Watkinson. (1989). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. Columbus.
- Nustez, D. C. (2012). *Biorremediación para la degradación de hidrocarburos totales presentes en los sedimentos de una estación de servicio de combustible*. (Tesis de maestría, Universidad Tecnológica de Pereira. Pereira, Colombia).
- Ocampo, J; Robles, D, y Wu, A. (2002). *El Compostaje como método de Bioremediación de Suelos contaminados con hidrocarburos*. (Tesis de grado, UNALM. Lima).
- Ojeda-Quintana, L.J., Hernández-Rodríguez, C., López- Melian, A. y Frómeta-Milanés, C. (2020). Evaluación de diferentes sustratos enriquecidos con microorganismos para la producción de compost en áreas naturales. *Temas Agrarios*. 25(2) ,129-140.
- Ojeda Quintana, L. J., Hernández Vilches, M. E., Sánchez Cordero, L. y Sainz Lombó, R. (2019). Respuesta de *Crotalaria juncea* (L.) a la inoculación con especies de hongos micorrízico arbusculares en un suelo pardo grisáceo. *Revista Científica Agroecosistemas*. 7(2), 23-30.
- Ojeda, L., Herrera, R., Furrázola, E., Hernández, C y Castellón A. (1998). Inoculación de *Leucaena leucocephala*, cv: Perú con micorrizas arbusculares en la fase de vivero. *Pastos y Forrajes*. 21( 2), 159-164.
- ONEI.(2016). Oficina Nacional de la Estadística e Información. Cuba. Informe anual(2016).
- Pérez-Vargas, J., García-Esquivel, G., y Esparza García, F. (2002). Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avance y Perspectiva* 21(11), 297-300.

- Plice, M. J. (1948). Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 14(8) , 413-416.
- Porta, A., Filliat, N. and Plata, N. (1999). *Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil*. B.C. Alleman y A. Lesson (Eds.). Columbus.
- Quiñones-Aguilar, E. E., R. Ferrera-Cerrato., F. Gavi- Reyes., L. Fernández-Linares., R., Rodríguez- Vazquez y A. Alarcón. (2003). Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*. 37 (6), 585-594.
- Quiñones-Aguilar, E. E. y Ferrera-Cerrato R. (2000). *Presencia de micorriza arbuscular en suelos contaminados con hidrocarburos de Minatitlan, Veracruz*. I Reunión Iberoamericana y III Simposium Nacional sobre la Simbiosis Micorrizica. Comité Nacional de Investigación y Enseñanza de la Micorriza. Guanajuato, México.
- Ramírez, A. J. (1991). *Efecto de contaminantes de tipo hidrocarburo en lechuga (Lactuca sativa) bajo condiciones de invernadero*. (Tesis Profesional. Departamento de Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, México).
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Miranda C.M.A. y Maldonado C.E. (2005). Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30(9), 326-331.
- Rivera, M. del C. y A. Trujillo (2004). Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29 (7), 369-376.
- Sawatsky N. y Li X. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the end point of bioremediated soils. II. Water-repellency in hydrocarbon contaminated soils. *Plants and Soils*. 192(32), 227-236.
- Serrano, M.F., Torrado, L.M. y Pérez, D.D. (2013). Impacto de los derrames de crudo en las propiedades mecánicas de suelos arenosos. *Ciencia y Tecnología*. 36 (11), 233-244.
- Shahriari M.H., Savaghebi-Firoozabadi G., Azizi M., Kalantari F. y Minai-Tehrani D. (2007). Study of growth and germination of *Medicago sativa* (alfalfa) in light crude oil-contaminated soil. *Res. J. Agr. Biol. Sci.* 3(16), 46-51.

- Shin, E.C. and B.M. Das. (2001). Bearing Capacity of Unsaturated Oil-Contaminated Sand. *International Offshore Polar Engineering*. 12 (11), 220-227.
- Toro M. A. T. y Quirama, J. F. R. (2012). Biorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos en Colombia. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental* . 3( 2), 24-26.
- Trujillo-García, A., Rivera-Cruz, M., Lagunes, L., Palma- López, D. J., Sánchez, S. y Ramírez-Valverde, G. (2014). Parámetros biológicos de la restauración de suelos contaminados por petróleo crudo. *Ecosistemas y recursos Agropecuarios*. (1(2), 58-69.
- USEPA OUST.(2003). *Environmental Fact Sheet: Analytical Métodos for Fuel Oxygenates*, EPA 510-F-03001. <http://www.epa.gov/OUST/mtbe/omethods.pdf>.
- Varela F., Quiñones L., Alarcón A. y Ferrera-Cerrato R. (2000) *Hongos Micorrizógenos arbusculares de suelos contaminados con hidrocarburos*. I Reunión Iberoamericana y III Simposium Nacional sobre la Simbiosis Micorrizica. Comité Nacional de Investigación y Enseñanza de la Micorriza. Guanajuato, México.
- Vázquez Luna, D., Castelán Estrada, M., Rivera Cruz, M. C., Ortiz Ceballos, Á. I. y Izquierdo, F. (2010). *Crotalaria incana L. y Leucaena leucocephala Lam.* (especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 26(3), 183-191.
- Wang Z., M. Fingas, C. Yang and J. Christensen.(2006). *Crude Oil and Refined Product Fingerprinting, Principles.En, Environmental Forensics.*(R, Morrison y B.L. Murphy Ed.) Elsevier Science, USA.
- Wiltse C., W. L. Rooney., Z. Chen ., A. P. Schwab. and M. K. Banks. (1998). Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J. Environ. Quality*. 27(6), 169-173.
- Xu, J. G. and R. L. Johnson. (1995). Root growth, microbial activity and phosphatase activity in oil- contaminated, remediated and uncontaminated soils planted to barley and field pea. *Plant and Soil* .173 (21), 3-10.
- Yu, Y., Liu, Y. and Wu, L. (2013). Sorption and degradation of pharmaceuticals and personal care products (PPcPs) in soils. *Environmental Science Pollution Restoration*. 20(56), 4261-4267.

**ANEXOS**  
**Anexo No.1**



**Anexo No.2**

