

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD EN DESECHOS Y SUELOS PETROLIZADOS EMPLEANDO SEMILLAS DE *Lactuca sativa* L

Carmen Infante y Fernando A. Morales García

RESUMEN

Se presentan los resultados de toxicidad evaluados a través de bioensayos empleando semillas de *Lactuca sativa* L, en diferentes muestras de rípios de perforación impregnadas con crudo extrapesado (10°API) y suelos contaminados a nivel de laboratorio, con un crudo mediano (27°API) y uno liviano (32°API). Además, se compara el efecto tóxico de las muestras de suelos contaminadas con crudo antes y después de someterlas al proceso de biorremediación. No se encontró toxicidad en las muestras de rípios impregnadas con el crudo extrapesado, así como ninguna relación entre toxicidad y concentración de aceites y grasas. Las muestras de suelo contaminadas con cru-

do liviano y mediano presentaron toxicidad expresada en función del porcentaje de elongación del hipocotilo con respecto al control (suelo sin hidrocarburo) antes del proceso de biorremediación. Luego de finalizada la biorremediación, se registró una disminución significativa de la toxicidad. Con base en estos resultados se enfatiza la necesidad de incluir análisis de toxicidad mediante la aplicación de bioensayos estandarizados en la caracterización de desechos sólidos petrolizados, tales como los rípios de perforación, además de su uso como criterio de 'limpieza' en la remediación de suelos.

Introducción

Las tecnologías para el tratamiento de suelos y desechos sólidos que contienen hidrocarburos son diversas y varían desde las físico químicas hasta las biológicas, siendo el objetivo principal cumplir con los criterios de limpieza, o exigencias de la normativa ambiental en el país donde se generen. En teoría, ello significa que el suelo o desecho esta 'remediado'. En Venezuela, según el Decreto 2635 (1998) se exige menos de 1% (m/m) o 3% (m/m) de aceites y grasas en un suelo o desecho tratado, según los artículos 50 y 49, respectivamente. Cabe señalar que el término 'aceites y grasas' incluye los hidrocarburos totales del petróleo y aquellos lípidos, carbohidratos y ácidos grasos que se pudiesen extraer del suelo según el solvente empleado. Para los fines de

este trabajo, aceites y grasas (AyG) será equivalente a hidrocarburos totales del petróleo (HTP), ya que se ha demostrado que, en suelos petrolizados, la contribución de otras fracciones orgánicas es despreciable en comparación con los hidrocarburos (Martínez, 2010; García *et al.*, 2012). El nivel o criterio de limpieza usado en Venezuela es independiente del uso del suelo, a diferencia de otros países, como por ejemplo Ecuador (Decreto 1215, 2001) y México (DOF, 2010), donde según sea para uso agrícola, recreacional o residencial, el nivel de exigencia es diferente. En México, por otra parte, no se exige un valor total de HTP, sino el cumplimiento de LMP (límites máximos permisibles) para cinco fracciones del petróleo: fracciones ligera, mediana y pesada del petróleo crudo, concentración de benceno-to-

lueno-etilbenceno-xileno (BTEX) y concentración de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs).

De lo anterior se destaca que no existe uniformidad entre los valores de HTP exigidos en los diferentes países. Adicionalmente, pocos incluyen dentro de sus exigencias el uso de los análisis de toxicidad, empleando bioensayos específicos y estandarizados, como un criterio de remediación o limpieza de suelos y tratamiento de desechos, independientemente de la tecnología empleada. La toxicidad medida mediante bioensayos, en conjunto con los HAPS, BTEX y determinados metales, puede ser utilizada para determinar el riesgo, que es lo que debería definir el criterio de limpieza o remediación de un suelo (McMillen *et al* 2001; Infante *et al.*, 2010; Morales, 2010). En Venezuela, los valo-

res de AyG fueron tomados de aquellos del estado de Louisiana, EEUU (Rule 29-B, 1986), los cuales no están sustentados en un análisis de riesgo. Así por ejemplo, se puede tener 4% (m/m) de AyG o de HTP en un suelo y no ser tóxico, o tener menos de 1% (m/m) y ser tóxico. También es conocido que no existe una correlación directa entre la concentración de HTP y la toxicidad (Dorn y Salanitro, 2000; Plaza *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010), por lo que el análisis de toxicidad debería ser un parámetro obligatorio a ser incluido en los criterios de limpieza de suelos y tratamiento de desechos con hidrocarburos, así como en su caracterización inicial, ya que no basta con conocer la concentración de aceites y grasas o HTP para inferir su toxicidad.

Existen diversos ensayos de toxicidad, los cuales emplean

PALABRAS CLAVE / Bioensayos de Toxicidad / Criterios de Limpieza / Hidrocarburos de Petróleo / *Lactuca Sativa* / Remediación de Suelos /

Recibido: 04/06/2012. Modificado: 10/08/2012. Aceptado: 11/10/2012.

Carmen Infante. Licenciada en Biología y Doctor en Ciencias, Mención Ecología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Profesor, UCV, Venezuela y Universidad Simón Bolívar, (USB),

Venezuela. Dirección: Departamento de Procesos y Sistemas, Unidad de Gestión Ambiental, USB. Apartado Postal 89000. Caracas 1080, Venezuela. e-mail: carmeninfante66@gmail.com

Fernando A. Morales García. Licenciado en Química y M.Sc. en Ciencias Biológicas, USB, Venezuela. Profesor, USB, Venezuela. e-mail: fmoral@usb.ve

SUMMARY

Toxicity of different samples of heavy oil drilled cuttings (10°API) and contaminated soils with medium (27°API) and light (32°API) crude were estimated with *Lactuca sativa* L bioassays. The toxicity of contaminated soil was evaluated before and after a bioremediation process carried out at laboratory scale. The results show no toxicity in samples of cuttings impregnated with extra heavy oil, as well as any relationship between toxicity and oil and grease concentration in soils. By contrast, soil samples contaminated with light and medium

crude oil showed toxicity, expressed in terms of percentage of hypocotyl elongation with respect to the control (soil without oil), before the bioremediation process. After bioremediation there was a marked decrease in toxicity. Based on these results, the need is emphasized to include toxicity analysis by applying standard bioassays as part of the characterization of solid waste such as drilled cuttings, in addition to its use as a cleaning criteria in soil remediation.

AValiação da Toxicidade em Detritos e Solos Petrolizados Empregando Sementes de *Lactuca sativa* L

Carmen Infante e Fernando A. Morales García

RESUMO

Apresentam-se os resultados de toxicidade avaliados através de bio-ensaios empregando sementes de *Lactuca sativa* L, em diferentes amostras de cascalhos de perfuração impregnados com petróleo extra pesado (10°API) e solos contaminados em nível de laboratório, com um petróleo mediano (27°API) e um leve (32°API). Além disso, se compara o efeito tóxico das amostras de solos contaminadas com petróleo antes e depois de submetê-las ao processo de biorremediação. Não se encontrou toxicidade nas amostras de cascalhos impregnadas com o petróleo extrapesado, assim como nenhuma relação entre toxicidade e concentração de óleos e graxas. As amostras de

solo contaminadas com petróleo leve e mediano apresentaram toxicidade expressada em função da porcentagem de alongação do hipocótilo em relação ao controle (solo sem hidrocarboneto) antes do processo de biorremediação. Logo de finalizada a biorremediação, se registrou uma diminuição significativa da toxicidade. Baseados nestes resultados, é enfatizada a necessidade de incluir análises de toxicidade mediante a aplicação de bioensaios padronizados na caracterização de detritos sólidos petrolizados, tais como os cascalhos de perfuração, além de seu uso como critério de 'limpeza' na remediação de solos.

diferentes organismos de la cadena trófica que van desde bacterias hasta plantas superiores (Bowers *et al.*, 1997; Cheung *et al.*, 1989; Dutka, 1989). En muestras sólidas, tales como desechos con hidrocarburos y suelos contaminados por derrames de hidrocarburos, los bioindicadores más comúnmente empleados son lombrices de tierra y plantas (Dorn *et al.*, 1998; Plaza *et al.*, 2005). En los bioensayos con plantas se emplean semillas de lechuga, centeno, maíz, berro, trigo, cebada, entre otros (USEPA, 1989; Plaza *et al.*, 2005; OECD, 2006). En Venezuela, una de las metodologías que más se ha usado recientemente en la determinación de toxicidad en muestras de suelos y desechos contaminados con hidrocarburos, son los bioensayos con semillas de lechuga, *Lactuca sativa* L

(USEPA, 1989). Este bioensayo ha sido ampliamente usado en la evaluación de toxicidad en suelos contaminados con hidrocarburos (Chaîneau *et al.*, 2003; Banks y Schultz 2005; Hubálek *et al.*, 2007). Es un ensayo fácil de preparar, y económico en lo referente a requerimientos de equipos, materiales y mantenimiento de la especie de prueba; sin embargo, se invierten muchas horas de personal en la medición de los parámetros indicadores de toxicidad, de una muestra problema.

La toxicidad de un hidrocarburo es el resultado de una interacción compleja y variable entre las características propias del crudo y del suelo (Tarache, 2011). En general, suelos y desechos con hidrocarburos livianos presentan mayor toxicidad en comparación con crudos pesados y

extrapesados o meteorizados (Salanitro *et al.*, 1997; Dorn y Salanitro, 2000). No obstante, en estos últimos, aún cuando la toxicidad suele ser menor, existe un efecto físico sobre las propiedades del suelo (Infante *et al.*, 2010), como es la disminución de la capacidad de campo e incremento de la repelencia al agua, entre otras propiedades, que merman su fertilidad (Adams *et al.*, 2008). Las características o tipo de suelo afectan significativamente la toxicidad. Aquellos suelos con mayor capacidad de intercambio, materia orgánica o contenido de arcilla, exhiben mayor adsorción del hidrocarburo, y habrá menor efecto tóxico sobre el ecosistema (McBride, 1994; Dorn *et al.*, 1998). Los suelos con mayor contenido de materia orgánica y textura arcillosa pueden adsorber los hidrocarburos, reduciendo su solu-

bilidad y presión de vapor efectivas, debido al reparto entre las fases lipofílicas. De esta manera, disminuye su biodisponibilidad y movilidad (El-Tarabily, 2002; Eibes *et al.*, 2006), lo que se traduce en una menor toxicidad (Dorn *et al.*, 1998). 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)

El objetivo principal del presente trabajo es presentar los resultados de toxicidad evaluados a través de bioensayos con semillas de *Lactuca sativa* L en muestras de suelos y desechos contaminados con hidrocarburos (ripios o cortes de perforación), con la finalidad de mostrar la importancia de incorporar los análisis de toxicidad en la caracterización inicial de este tipo de

muestras, y como un criterio adicional en los estándares o exigencias de limpieza, después de aplicada una técnica de remediación a un suelo o desecho contaminado con petróleo.

Metodos

Muestras evaluadas

Se estimó el efecto tóxico a través de bioensayos con *Lactuca sativa* L, de 14 muestras de desechos de perforación (ripios o recortes) impregnadas con crudo extrapesado de 10°API, procedentes de la Faja Petrolífera de Orinoco, Oriente Venezolano, caracterizados por una textura arenosa y pH ligeramente básico de 7,8 (Morales, 2010). Asimismo, se evaluó el nivel de toxicidad en muestras de suelo provenientes de El Tigre, Estado Anzoátegui, Venezuela, caracterizadas por una textura arenosa y pH ácido de 4,5 (Córdova, 2010; García *et al.*, 2012), las cuales fueron contaminadas con crudo en el laboratorio. Para ello, un lote de suelo de ~7,5kg. se pasó por un tamiz de 2mm. Una porción (~1kg) se usó como testigo o control equivalente a suelo limpio sin contaminar. El restante lote de suelo fue dividido en dos porciones iguales, una parte se contaminó con crudo liviano (32°API) y la otra con crudo mediano (27°API), ambos a una concentración teórica de ~5,5% m/m de TPH. El crudo fue agregado lentamente y se fue mezclando cuidadosamente hasta conseguir homogeneidad. Dado que se trataba de crudos frescos, con altos °API, y un suelo arenoso, fue relativamente fácil el proceso de homogeneización del suelo con el crudo. De cada porción se separaron seis muestras (seis réplicas) de suelo contaminadas con crudo liviano y seis con crudo mediano. A estas 12 muestras, más seis de testigo o control (sin hidrocarburo), se les midió la toxicidad.

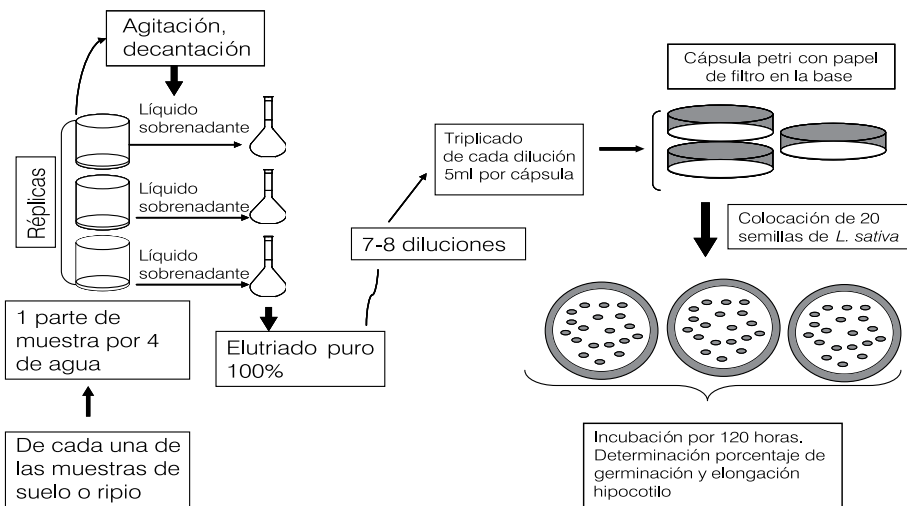


Figura 1. Diagrama del desarrollo del bioensayo con semillas de *L. sativa*.

Adicionalmente, estas mismas muestras contaminadas con el crudo liviano y mediano fueron sometidas a un proceso de biorremediación durante 90 días (García *et al.*, 2008; Córdova, 2010) y posteriormente se le midió la toxicidad. El proceso de biorremediación se llevó a cabo mediante bioestimulación de los microorganismos autóctonos, con fertilización con una relación C:N de 60:1 y C:P de 800:1, ajustando los factores abióticos (Infante, 2009). Para ello, las muestras de suelo contaminadas se colocaron en bandejas de 20cm de largo, por 15cm de ancho y 13cm de altura, simulando un microcosmo. Cada microcosmo (seis para cada crudo) fue aireado con un rastrillo manual, dos veces por semana, a fin de facilitar el intercambio de oxígeno atmosférico con el suelo y mantener el proceso en condiciones aeróbicas. El ensayo se realizó en condiciones de laboratorio, a una temperatura de 24-27°C, y la humedad de la mezcla se mantuvo en 30-40% de la capacidad de campo del suelo. Para el control de la humedad durante el ensayo de biorremediación se repuso el agua evaporada pesando los microcosmos cada tres días. Los microcosmos eran cerrados en su base, por lo que no hubo pérdidas por infiltración, y las pérdidas por fotooxidación se consideraron mínimas ya que los mismos se mantu-

vieron durante todo el ensayo fuera de la incidencia directa de luz.

Los crudos empleados en este estudio poseen una composición SARA (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos) diferente. El crudo liviano se caracteriza por tener un 61% de saturados, 22% de aromáticos, 14% de resinas y 3% de asfaltenos; mientras que el crudo mediano contiene un 54% de saturados, 25% de aromáticos, 11% de resinas y 10% de asfaltenos (López *et al.*, 1998). Por su parte, las muestras de ripios impregnadas con crudo extrapesado (Morales, 2010) presentan un menor contenido de saturados (21%) y aromáticos (21%), y un mayor contenido de resinas y asfaltenos (35 y 21%, respectivamente).

Bioensayos de toxicidad

La evaluación de la toxicidad de las muestras de estudio se realizó a través del bioensayo estandarizado con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L; USEPA, 1989), empleando el elutriado de la muestra correspondiente a la fase acuosa que ha estado en contacto con el suelo o desecho contaminado durante 48h, en una relación suelo:agua de 1:4 (Figura 1). La prueba se desarrolla en condiciones estáticas y permite que se puedan evaluar los efectos fitotóxicos de compuestos del crudo sobre el proceso

de germinación de las semillas, y sobre la elongación del hipocotilo durante los primeros días de crecimiento. La toxicidad puede ser expresada como toxicidad aguda o letal, la cual se estima a través de la concentración a la cual se produce más del 50% de inhibición de la germinación de las semillas, entendiéndose que la falta de germinación es la muerte de las semillas debido al efecto

tóxico en la muestra que se esté evaluando. En contraste, la reducción del crecimiento o elongación del hipocotilo en un periodo de tiempo, en más de un 50% con respecto al control (suelo sin hidrocarburo), constituye la medida del efecto crónico o subletal de la muestra ensayada (USEPA, 1989). La evaluación del parámetro elongación del hipocotilo de las semillas permite ponderar el efecto tóxico de compuestos solubles presentes en niveles de concentración tan bajos, que no son suficientes para inhibir la germinación pero que, sin embargo, pueden retardar o inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o del hipocotilo.

A partir de cada una de las 14 muestras de ripios o cortes de perforación y de las 12 muestras de suelo que fueron contaminadas con hidrocarburo (seis de crudo liviano y seis con crudo mediano) antes del proceso de biorremediación y de las 12 muestras después del proceso de biorremediación, se obtiene el elutriado respectivo (Figura 1). Cada muestra se evalúa por triplicado y el elutriado representa el 100%, a partir del cual se preparan diferentes diluciones con agua (80, 75, 50, 40, 20, 10 y 0%). Seguidamente, en cápsulas de Petri de 100mm de diámetro, las cuales contienen un papel de filtro, se añaden 5ml de cada

dilución, para luego colocar 20 semillas de *L. sativa* y se incuban durante 120h en oscuridad, a $22 \pm 2^\circ\text{C}$. Al cabo de ese tiempo de exposición, se cuantifica la germinación y el largo o elongación del hipocotilo. Como parte de los criterios de calidad que deben cumplir este tipo de bioensayos, se determina el porcentaje de germinación del lote de semillas a ensayar, el cual se mantuvo en el presente caso alrededor de 98%.

Análisis de aceites y grasas

Para la determinación del contenido de crudo (aceites y grasas; AyG) o HTP en las diferentes muestras, se utilizó la extracción Soxhlet, usando diclorometano, grado analítico (Sigma-Aldrich grado HPLC, CAS:75-09-2) como solvente de extracción, según el método EPA 3540 (USEPA, 1986). Para ello se pesaron 10g de muestra (peso seco) y 10g de sulfato de sodio anhidro (Baker, grado reactivo), se mezclaron y colocaron en un cartucho de celulosa dentro del equipo Soxhlet, el cual se acopló a un matraz de 250ml con 100ml de solvente de extracción. Seguidamente, el matraz se colocó en la manta de calentamiento y se ajustó el reostato de manera de completar 4 a 6 ciclos de reflujo por hora durante 16h. Posteriormente, el solvente de los extractos fue evaporado en un rotaevaporador provisto de condensador y se llevó hasta peso constante a $\sim 65^\circ\text{C}$ en una estufa con extracción de vapores. El contenido de extraíbles, o AyG presentes, fue determinado gravimétricamente. Este procedimiento se efectuó para las 14 muestras de cortes de perforación, por

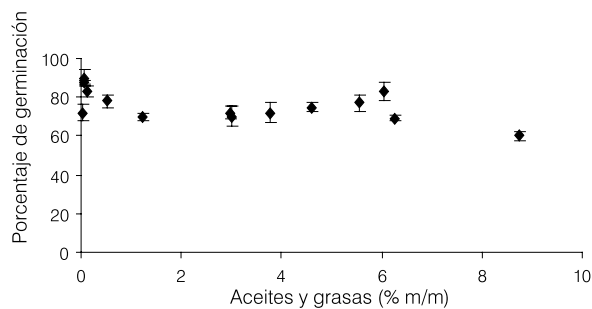


Figura 2. Toxicidad expresada en porcentaje de germinación a diferentes concentraciones de aceites y grasas en las 14 muestras de rípios impregnadas con crudo extrapesado (100% elutriado, caso severo).

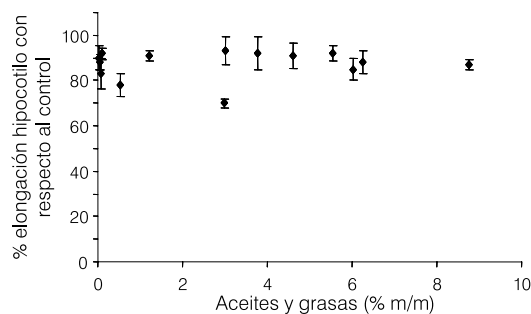


Figura 3. Toxicidad expresada en porcentaje de elongación del hipocotilo a diferentes concentraciones de aceites y grasas en las 14 muestras de rípios impregnadas con crudo extrapesado (100% elutriado, caso severo).

triplicado, y para las seis muestras de suelo contaminadas con el crudo liviano y las 6 contaminadas con el crudo mediano, antes y después del proceso de biodegradación. Los resultados fueron corregidos por el porcentaje de humedad y expresados sobre base seca en m/m. Los análisis fueron realizados en un laboratorio que analiza hidrocarburos y AyG en muestras de suelos y desechos petrolizados de forma rutinaria y con un programa de control de calidad, el cual incluye la medición periódica de muestras dopadas con cantidades conocidas de petróleo crudo evaporado ('topeado') a 65°C . Una proporción del hidrocarburo no es extraído debido a la interacción con el suelo, la cual depende de la textura y del contenido de materia orgánica del mismo. Con base en los resultados históricos del laboratorio de desechos tóxicos de la Universidad Simón Bolívar, Venezuela, y usando este solvente que es de alta capacidad de extrac-

ción, se acepta un porcentaje de extracción de $\sim 80\%$ del crudo dopado.

Procesamiento de datos y análisis estadísticos

Los resultados de los bioensayos de toxicidad se analizaron a través del programa CL_{50} desarrollado para PC, basado en Stephan (1977). Para la comparación entre tipos de muestras se empleó análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey HSD (*honestly significantly different*), con niveles significancia de 5%, para lo cual se empleó el programa STATGRAPHICS Centurión XV.

Los valores promedios con sus respectivas desviaciones estándar del porcentaje de germinación y porcentaje de elongación del hipocotilo, de cada una de las muestras de rípios y de suelos, se presentan gráficamente, con la finalidad de visualizar las muestras que no presentan toxicidad en aquellas que tienen un porcentaje de germinación $\geq 50\%$, o un porcentaje de elongación del hipocotilo $\geq 50\%$ con respecto al control.

Resultados y Discusión

Toxicidad en desechos impregnados con crudo extrapesado y en suelos contaminados en laboratorio

En la Figura 2 se presentan los resultados de toxicidad en función del porcentaje de germinación a las diferentes concentraciones de aceites y grasas (entre 0,02 y 8,75% m/m) de las muestras de desechos (rípios) impregnadas con crudo extrapesado, y en la Figura 3 se muestran los resultados de toxicidad en relación al porcentaje de elongación del hipocotilo. En ambos casos, los resultados correspon-

den al elutriado puro (100%), es decir, al caso más severo. Los resultados correspondientes de las otras diluciones del elutriado (80, 75, 50, 40, 20 y 10%) no se muestran, ya que no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) respecto al elutriado puro.

Se observa en primer lugar que no existe toxicidad en ninguna de las muestras evaluadas, ya que no se registró una disminución mayor al 50% del porcentaje de germinación de las semillas, ni inhibición en más del 50% de la elongación del hipocotilo con respecto a muestras control (sin hidrocarburo), y por lo tanto no se puede calcular un CE_{50} en ningún caso. Posiblemente, estos resultados se deben a que se trata de un crudo pesado; lo cual coincide con datos de la literatura, donde se señala que los crudos pesados son menos tóxicos o no tóxicos en comparación con los crudos livianos y medianos (Dorn *et al.*, 1998; Salanitro *et al.*, 1997). Ello se ha atribuido al menor contenido de hidrocarburos ligeros en los crudos pesados, los cuales son los más solubles en agua y generalmente más tóxicos. A partir de los resultados de las Figuras 2 y 3, también se deduce que no existe correlación alguna entre la concentración de aceites y grasas, y el porcentaje de germinación y porcentaje de elongación del hipocotilo, para estas muestras de rípios con crudo extrapesado. Otros autores (Dorn y Salanitro., 2000; Plaza *et al.*, 2005; García *et al.*, 2010; Tarache, 2011), coinciden en señalar la falta de correlación entre concentración de hidrocarburos en suelo y la toxicidad. Estos resultados permiten inferir que una mayor concentración de hidrocarburos en una muestra de suelo o rípio de perforación, automáticamente no es indicativa de una mayor toxicidad. Otros factores tales como tipo de crudo, características químicas del suelo pudiesen afectar la toxicidad. Es importante resaltar que acorde con el Decreto 2635 de la normativa ambient-

TABLA I
CONTENIDO DE ACEITES Y GRASAS (A y G) EN % (m/m) EN MUESTRAS DE SUELO CONTAMINADO CON CRUDO LIVIANO Y MEDIANO, AL INICIO Y FINAL DEL PROCESO DE BIORREMEDIACIÓN*

Tiempo (días)	A y G en suelo con crudo liviano	A y G en suelo con crudo mediano
0	4,3 ±0,5	4,9 ±0,7
90	1,1 ±0,4	2,8 ±0,3

* Valores promedio de seis muestras ±desviación estándar.

tal venezolana, el límite permitido de aceites y grasas en suelos superficiales, es de 1% (m/m). Esto quiere decir que para aquellas muestras con concentraciones de aceites y grasas >1%, debe aplicarse una técnica de remediación hasta cumplir con dicho límite permitido. Sin embargo, tal como se observa en los resultados presentados en las Figura 2 y 3, una gran cantidad de muestras de rípos de perforación presentan contenidos de aceites y grasas >1%, llegando hasta valores de 8,7% (m/m) inclusive, sin que se observe toxicidad alguna con el tipo de bioensayo empleado.

En el caso de las muestras de suelo contaminadas con crudo liviano (concentración de aceites y grasas en promedio de 4,3% m/m, a los 0 días, Tabla I), y con crudo mediano (concentración de aceites y grasas en promedio de 4,9% m/m, a los 0 días, Tabla I), tampoco se registró una inhibición de la germinación de las semillas mayor al 50% (datos no mostrados), lo cual significa que no presentan toxicidad. Sin embargo, sí se registró una reducción significativa ($p < 0,05$) en el largo del hipocotilo con respecto a las muestras de suelo control con el elutriado al 80% (Figura 4). Nótese que todas las muestras tienen porcentajes de elongación del hipocotilo menor al 50%. En consecuencia las muestras de suelo que fueron contaminadas con los crudos liviano y mediano si presentan toxicidad con el bioindicador empleado. Cabe señalar que no se registraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre los resultados de toxicidad expresada en fun-

ción del porcentaje de elongación del hipocotilo para las muestras de suelo que se contaminaron con crudo mediano y liviano. Otros autores (Salanito *et al.*, 1997; Dorn y Salanito, 2000), han encontrado que los crudos livianos son más tóxicos que los medianos, sin embargo deben considerarse otros factores. Por ejemplo, un crudo liviano de composición parafínica, muy probablemente tendrá menor contenido de compuestos aromáticos de bajo peso molecular, los cuales son los más solubles y tóxicos en comparación con un crudo de la misma gravedad API de composición aromática. En este sentido, cabe destacar que el contenido de hidrocarburos saturados en el crudo liviano es de 61%, mientras en el crudo mediano es de 54%.

Por otra parte, los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de los resultados presentados por Tarache *et al.* (2009) quienes no encontraron toxicidad, con este mismo tipo de bioensayo, en suelos contaminados con un crudo de 29°API (liviano), a concentraciones de hidrocarburos de 5-20% m/m. Sin embargo, dichos autores señalan la utilización de un suelo de textura franco arenosa en sus ensayos. La textura relativamente más fina del suelo, aumentaría la adsorción en la fase sólida, disminuyendo la solubilidad

efectiva de los hidrocarburos en el agua. Es conocido que suelos con mayor capacidad de intercambio, materia orgánica o contenido de arcilla, tendrán mayor adsorción del hidrocarburo, menor biodisponibilidad y menor será su efecto tóxico sobre el ecosistema (McBride, 1994; Dorn *et al.*, 1998; Eibes

et al., 2006). Por el contrario, en suelos de textura arenosa la retención de los hidrocarburos en la fase sólida es muy pobre, desplazándose la partición hacia la fase acuosa y aumentando de esa forma la movilidad y biodisponibilidad de las fracciones solubles (Labud *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos en este trabajo no son concluyentes, pues tendría que evaluarse un número significativo de suelos de diferente textura, así como un mayor número de crudos de gravedad API contrastante. Sin embargo, el resultado de los bioensayos indica que la toxicidad en suelos de la misma textura aumenta con la gravedad API, siendo nula para el crudo de 10°API utilizado en el presente estudio.

Contenido de aceites y grasas y toxicidad en las muestras de suelo, después del proceso de biorremediación

En la Tabla I se muestran los resultados de aceites y grasas (A y G) de las muestras de suelo arenoso contaminadas con crudo liviano y mediano sometidas al proceso de biorremediación antes y después de 90 días, en el cual hubo una reducción estadísticamente significativa ($p < 0,05$) del hidrocarburo. Nótese que para el suelo con crudo liviano, la concentración de A y G a los 90 días se corresponde prácticamente

con la exigida por la normativa ambiental venezolana ($\leq 1\%$ m/m); mientras que con el crudo mediano, la concentración está por encima de lo exigido como criterio de limpieza. Los resultados de toxicidad en función del porcentaje de germinación de las semillas y porcentaje de elongación del hipocotilo con respecto al control, para estas muestras se presentan en

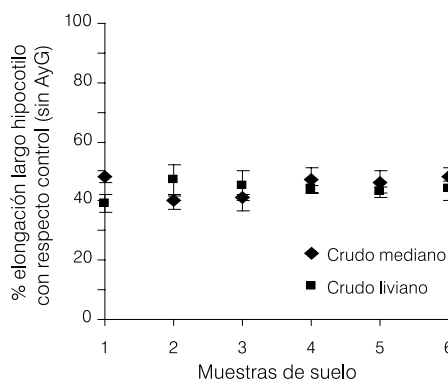


Figura 4. Toxicidad expresada en porcentaje de elongación del hipocotilo en las muestras de suelo contaminadas con crudo mediano y liviano, antes del proceso de biorremediación (elutriado al 80%).

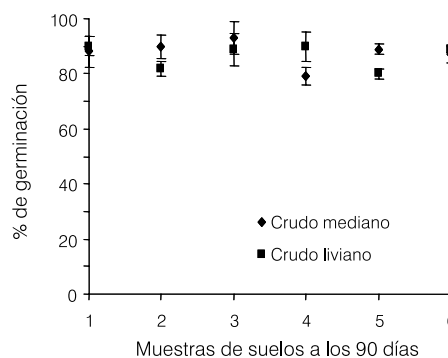


Figura 5. Toxicidad expresada en porcentaje de germinación en las muestras de suelo contaminadas con crudo mediano y liviano después del proceso de biorremediación (100% elutriado, caso severo).

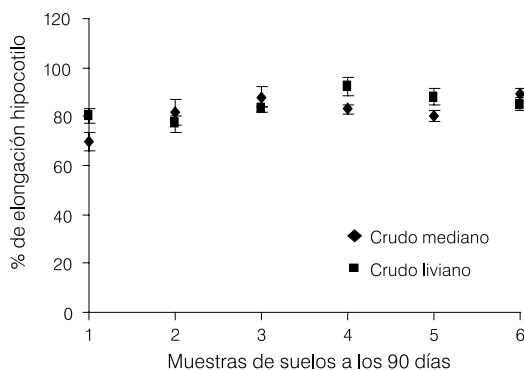


Figura 6. Toxicidad expresada en porcentaje de elongación del hipocotilo en las muestras de suelo contaminadas con crudo mediano y liviano después del proceso de biorremediación (100% elutriado, caso severo).

las Figuras 5 y 6, respectivamente. Se observa que en ambos casos no se registró toxicidad, en ninguna de las 12 muestras evaluadas a los 90 días del proceso de biorremediación con el bioensayo empleado.

El proceso de biorremediación permitió la disminución de la toxicidad de las muestras de suelo que originalmente presentaron toxicidad expresada en función del porcentaje de elongación del hipocotilo (Figura 4). La mayoría de los estudios coinciden en señalar la disminución de la toxicidad por efecto del proceso de biorremediación (Salanitro *et al.*, 1997; Dorn y Salanitro, 2000; Plaza *et al.*, 2005; Hubálek *et al.*, 2007). 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; Al-Mutairi *et al.*, 2008; Ramírez *et al.*, 2008).

Desde el punto de vista de criterios de remediación de suelos, indiscutiblemente la determinación de la toxicidad es fundamental. Cabe destacar que en las muestras de crudo mediano (Tabla I), aún cuando no se había alcanzado el criterio de limpieza en el suelo a los 90 días de la biorremediación, ya éste no era tóxico, lo cual indica que con ese suelo de esas características, y con ese crudo, el nivel de limpieza pudiese ser flexible. Por ejemplo si los suelos van a ser destinados a uso industrial, podría completarse el proceso de tratamiento por dilución con suelo limpio u otro material orgánico acondicionador del suelo, hasta alcanzar el límite exigido por la normativa ambiental. Igualmente, si el uso de la tierra está destinado a uso agrícola, el análisis de toxicidad

es clave junto con otros parámetros biológicos en el suelo como evolución del CO₂, biomasa microbiana, biodiversidad de las comunidades microbianas, actividad enzimáticas (deshidrogenasa, glucosa oxidasas, hidrolasas entre otras), los cuales proporcionan información que integra muchos factores ambientales (Mijangos *et al.*, 2006), y permiten garantizar la 'salud' del suelo. Alkorta *et al.*, (2010) señalan que la meta central de los procesos de remediación en un suelo debe estar orientada no solamente a disminuir la concentración del contaminante, sino a restaurar la salud del suelo que es aún mas importante.

En esta investigación no se evaluaron suelos con niveles de aceites y grasas por debajo del nivel de limpieza exigido por la normativa ambiental venezolana, tales que presentarían toxicidad; lo cual podría ocurrir con crudos livianos o productos refinados. En esta situación, el límite de aceites y grasas debería ser más exigente (mucho menor a 1%) o se debería exigir un límite no basado en el porcentaje de grasas y aceites del suelo sino en su toxicidad. De esta manera, el objetivo de la remediación del suelo no sería solamente la disminución del contenido de hidrocarburos o grasas y aceites, sino la eliminación de los efectos tóxicos debidos al contaminante.

Conclusiones

El elutriado de las muestras de ripios impregnadas con crudo extrapesado, desde 0,02% m/m de aceites y grasas o TPH hasta 8,75% m/m, resultó ser no tóxico expresado en función del porcentaje de germinación y porcentaje de elongación del hipocotilo, empleando el bioensayo estandarizado con semillas de *L. sativa*. En las muestras de suelos de textura arenosa contaminadas a nivel de laboratorio, con un crudo mediano (4,3% m/m) y uno liviano (4,9% m/m), se registró toxicidad expresada en función del porcentaje de elongación

del hipocotilo. Las diferencias en los resultados entre las muestras de ripios impregnadas con crudo extra pesado, y las muestras con crudo liviano y mediano, se deben posiblemente a las características propias de estos crudos junto a la textura arenosa de los suelos y ripios, que determinan la partición de los componentes tóxicos del crudo entre la fase sólida, la fase oleosa y el agua. Por otra parte, se registró una disminución en la toxicidad de las muestras contaminadas con crudo mediano y liviano, como consecuencia del proceso de biorremediación. Basado en los resultados obtenidos, se recomienda el uso de los análisis de toxicidad en la caracterización de desechos, e incorporarlo como un criterio en la limpieza de suelos cuando se aplica una técnica de remediación.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a Mercedes Esclapes, especialista en ecotoxicología ambiental, por su asesoría y revisión del manuscrito, a Mauro Briceño, Orly García, Luis Sánchez por su aporte en el montaje de la técnica y determinación de análisis, a Liliana López de la UCV, por su apoyo en suministrar parte de las muestras del proceso de biorremediación, y a Unidad de Gestión Ambiental de FUNINDES-USB por el financiamiento.

REFERENCIAS

Adams R, Zavala-Cruz J, Morales F (2008) Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II. Afectación a la fertilidad y su recuperación. *Inter-ciencia* 33: 483-489.

Alkorta I, Becerril J, Garbisu C (2010) Recovery of soil health: The ultimate goal of soil remediation processes. En Plaza G (Ed.) *Trends in Bioremediation and Phytoremediation Research* Signpost. Kerala, India. pp. 1-9.

Al-Mutairi N, Bufarsan A, Al-Rukaibi F (2008) Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon based fuels. *Chemosphere* 74: 142-148.

Banks M, Schultz K (2005) Comparison of plants for germination

toxicity test in petroleum-contaminated soils. *Air Soil Pollut.* 167: 211-219.

Bowers N, Pratt JR, Beeson D, Lewis M (1997) Comparative Evaluation of Soil Toxicity using Lettuce Seeds and Soil Ciliates. *Env. Toxicol. Chem.* 16: 207-213.

Chaîneau H, Yepremian C, Vidalie J, Ducreux J, Ballerini D (2003) Bioremediation of crude oil-polluted soil: Biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollut.* 144: 419-440.

Cheung YH, Wong MH, Tam NF (1989) Root and shoot elongation as an assessment of heavy metal toxicity and Zn equivalent value of edible crops. *Hydrobiologia* 188/189: 377-383.

Córdova A (2010) *Comparación de la Eficiencia de Extracción con Solventes de Diferente Polaridad, para un Crudo Mediano a Dos Concentraciones en un Suelo Sometido a Biorremediación*. Tesis. Universidad Central de Venezuela. 169 pp.

Decreto 1215 (2001) *Reglamento Sustitutivo del Reglamento Ambiental para las Operaciones Hidrocarburíferas en El Ecuador*. Registro Oficial N° 265. Ecuador. 171 pp.

Decreto 2635 (1998) *Normas para el Control de la Recuperación de Materiales Peligrosos y el Manejo de Desechos Peligrosos*. Gaceta Oficial de la República de Venezuela. N° 5245. Caracas, Venezuela.

DOF (2010) *NOM-138-SEMARAT/SA1-2008. Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y Lineamientos para el Muestreo y la Remediación*. Diario Oficial de la Federación. México, 23/08/2010. 16 pp.

Dorn P, Salanitro J (2000) Temporal ecological assessment of oil contaminated soils before and after bioremediation *Chemosphere* 40: 419-426.

Dorn P, Vipond T, Salanitro J, Wisniewski H (1998). Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox®, and plants. *Chemosphere* 37: 845-860.

Dutka B (1989) Short-term root elongation toxicity bioassay. En Dutka B (Ed.) *Methods for Toxicological Analysis of Waters, Wastewaters and Sediment*. NWRI - Environment Canada. Burlington, Canadá. pp. 120-122.

Eibes G, Cajthaml T, Moreira M, Feijoo G, Lema J (2006) Enzymatic degradation of anthracene, dibenzothiophene and pyrene by manganese peroxidase in media containing acetone. *Chemosphere* 64: 408-414.

- El-Tarabily KA (2002) Total microbial activity composition of a mangrove sediment are reduced by oil pollution at a site in the Arabian Gulf. *Can. J. Microbiol.* 48: 176-182.
- García O, Infante C, Morales F (2010) Toxicidad y contenido de aceites y grasas en desechos petrolizados. *Mem. I^{er} Congr. Nac. Química del Petróleo* (17-21/05/2010). Valencia, Venezuela. pp. 4-7.
- García M, Infante C, López L (2012) Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferentes textura con y sin agente estructurante. *Bioagro* 24:93-102.
- Hubálek, T, Vosahova S, Mateju V, Kovacova N, Novotny C (2007) Ecotoxicity monitoring of hydrocarbon-contaminated soil during bioremediation: a case study. *Arch. Env. Contam. Toxicol.* 52: 1-7.
- Infante C (2009) Experiencias y Prospectiva de la Biorremediación en Venezuela. En *Biorremediación. Una Alternativa para Enfrentar la Contaminación Ambiental*. XIV RE-LAB. Cuernavaca, México. pp. 30-37.
- Infante C, Morales F, Ehrmann E, Hernández-Valencia I, León N (2010) Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuelan study case. En Plaza G (Ed.) *Trends in Bioremediation and Phytoremediation Research* Signpost. Kerala, India. pp. 429-451.
- Labud V, García C, Hernández T (2007) Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and clay soil. *Chemosphere* 66: 1863-1871.
- López L, Lo Mónaco S, Richardson M (1998) Use of molecular parameters and trace elements in oil-oil correlation studies, Barinas sub basin, Venezuela. *Org. Geochem.* 29: 613-629
- Martínez H (2010) *Correlación entre Propiedades Físico-químicas de Crudos y su Susceptibilidad a la Biodegradación*. Tesis. Universidad Simón Bolívar. Venezuela. 131 pp.
- McBride MB (1994) *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press. Oxford, RU. 391 pp.
- McMillen, R Magaw, R Crovillano (2001) *Risk-Based Decision-Making for Assessing Petroleum Impacts by Exploration and Production Sites*. Petroleum Environmental Research Forum – U.S. Department of Energy. Tulsa, OK, EEUU. 236 pp.
- Mijangos I, Perez R, Albizu I, Gabirsu C (2006) Effects of fertilization and tillage on soil biological parameters. *Enz. Microb. Technol.* 40: 100-106.
- Morales F (2010) *Uso del Análisis de Riesgo para la Evaluación de Opciones de Tratamiento de Desechos Petrolizados y Suelos Contaminados con Hidrocarburos*. Trabajo de ascenso. Universidad Simón Bolívar. Venezuela. 489 pp.
- OECD (2006) *Terrestrial Plant Test: Seedling Emergence and Seedling Growth Test*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD Environment Directorate. París, Francia. 19 pp.
- Plaza G, Nalecz-Jawecki G, Ulfig K, Brigmon R (2005) The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59: 289-296.
- Ramírez L, Ehrmann U, Infante C (2008) Comparación de dos métodos de bioensayos para evaluar la toxicidad en suelo contaminado con hidrocarburo durante un proceso de bioremediación. *Mem. IX Congr. Latinoam. Geoquímica Orgánica*. Margarita, Venezuela. p. 8-11.
- Rule 29-B (1986) *Pollution Control. Drilling and Production*. Ch. XV. Office of Conservation, Department of Natural Resources, State of Louisiana. Baton Rouge, LO; EEUU.
- Salanitro J, Dorn P, Huesemann M, Moore K, Rhodes I, Rice J, Vipond T, Western M, Wisniewski L (1997) Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Env. Sci. Technol.* 31: 1769-1776.
- Stephan C (1977) Methods for calculating an LC₅₀. En Mayer FL, Hamelink JL (Eds.) *Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation*. ASTM STP 634. American Society for Testing and Materials. Philadelphia, EEUU. pp. 65-84.
- Tarache A, Ehrmann U, Infante C (2009) Desempeño del bioensayo con semillas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) para evaluar la toxicidad de un suelo contaminado con un crudo liviano. *IX Congr. Venez. Química (SVQ)*. Cumaná, Venezuela. p. 210.
- Tarache A (2011) *Estudio de la Evolución de Toxicidad de Suelos Petrolizados durante un Proceso de Biorremediación*. Tesis. Universidad Simón Bolívar. Venezuela. 178 pp.
- USEPA (1986) *Test Methods for Extracting Nonvolatile and Semivolatile Organic Compounds from Solids such as Soils, Sludges and Wastes*. Method 3540c. Soxhlet Extraction. U.S. Environmental Protection Agency. Washington DC, EEUU.
- USEPA (1989) *Protocols for Short Term Toxicity Screening of Hazardous Waste Sites*. 600/3-88/029. Corvallis, OR, EEUU.