

---

## Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos

F. R. de la Garza<sup>1</sup>, Y. P. Ortiz<sup>1\*</sup>, B. A. Macias<sup>1</sup>, C. García<sup>2</sup> y D. Coll<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Autónoma de Tamaulipas, Unidad Académica Multidisciplinaria Agronomía y Ciencias, Cd. Victoria, Tamaulipas.

<sup>2</sup>CEBAS, Murcia, España.

---

*Soil biotic activity and oil pollution*

### Abstract

Nowadays soils pollution is one of the most important ecological problems, this one can concern the characteristics of soil. Biological tests, as the enzymatic activity and ATP's production, can serve to characterize the composition and the functioning of edaphic biota, they are an important tool to study the impact of the agents pollutants in the soil. The effect of refinery sludge on the biological activity of soils located in the region Cartagena – La Union of Cartagena, SE Spain was evaluated. From an area that has received refinery sludge, three sites were chosen for soil sampling; the sampling included intact soil. Edaphic respiration, enzymatic activity (Urease and Phosphatase), ATP's production and fitotoxicidad were evaluated; besides soil physical-chemical analysis. Results indicate that ATP's production was major in the soil with more pollution since the presence of hydrocarbons stimulates soil microbial populations, this fact repeated itself in case of the activity of the urease and phosphatase, and the values of these were major in the soils with more refinery sludge in comparison with the not contaminated soils. The germination of the seeds diminished of 100 % in the intact soil to 39.6 % of the most contaminated soil. Hydrocarbons soil pollution affect significantly ( $P>0.005$ ) soil pH; the electrical conductivity increased 5.6 times with relation to not contaminated soil; due to the contribution that they do, the compounds included in the refinery mud observation included the content of total Zn that increased in soil with refinery sludge by 3 fold in relation with the intact soil; the variation in the contents of total Cu was of 69.57 mg of the soil most contaminated with regard to the intact soil. As a conclusion hydrocarbons soil pollution in the shape of refinery sludge, impact physical and chemical aspects as well the biological aspects of the soil, which - with the exception of the germination of seeds - were stimulated by this type of pollution.

*Key words:* Soil, hydrocarbons, biological activity

### Resumen

La contaminación de suelos es uno de los problemas ecológicos más importantes de la actualidad, ésta puede afectar a las características del mismo. Pruebas biológicas, como la actividad enzimática y la producción de ATP, que sirven para caracterizar la composición y el funcionamiento de la biota edáfica, son una herramienta importante para estudiar el impacto de los agentes contaminantes sobre el suelo. En este trabajo de investigación se evaluó el efecto de lodos de refinería sobre la actividad biológica de suelos ubicados en la región de La Sierra-La Unión de Cartagena, del SE de España. Se eligieron cuatro sitios para la toma de muestras en un terreno que ha recibido lodos de refinería, en el muestreo se incluyó suelo intacto, es decir, no contaminado. Se determinó la respiración edáfica, actividad enzimática (actividad de Ureasa y Fosfatasa), producción de ATP e índice de germinación de semillas; además de las características fisicoquímicas del suelo. Los resultados indican que la producción de ATP fue mayor en el suelo con más contaminación ya que la presencia de hidrocarburos estimula a las poblaciones microbianas del suelo, este hecho se repitió en el caso de la actividad de la ureasa y fosfatasa, los valores de éstas fueron mayores en los suelos con mas carga de lodos de refinería en comparación con los suelos no contaminados. La germinación de las semillas disminuyó de 100% en el suelo intacto a 39.6% del suelo más contaminado. La contaminación

---

\* Autor de correspondencia  
E-mail: yortizca@uat.edu.mx

del suelo por hidrocarburos afectó significativamente el pH, ( $P > 0.005$ ); la conductividad eléctrica se incrementó 5.6 veces con relación a suelo no contaminado, debido al aporte que hacen los compuestos incluidos en los lodos de refinería; el contenido de Zn total, en el suelo con mas hidrocarburos, se incrementó 3 veces en relación con el suelo intacto; la variación en los contenidos de Cu total fue de 69.57 mg del suelo más contaminado con respecto al suelo intacto. Se concluye que la actividad biótica del suelo fue estimulada por lo hidrocarburos presentes en los lodos de refinería.

*Palabras clave:* Suelos, hidrocarburos, actividad biótica

---

## Introducción

La calidad del suelo se puede definir como el grado de sustentabilidad de funciones específicas que el suelo desempeña en un ecosistema dado (Diack y Stott, 2001). Éstas son principalmente tres: un medio en el cual crecen las plantas; regulación del flujo hídrico del medio ambiente; capacidad para atenuar los efectos nocivos de los contaminantes, mediante sus procesos, físicos, químicos y biológicos (García et al., 2003).

Estudios recientes referidos a la calidad del suelo y su salud indican que es una temática complicada, ya que se necesita de la integración de propiedades del suelo muy diversas: físicas, químicas, biológicas y bioquímicas para establecer dicha calidad (García et al., 2003). La condición de este puede verse afectada por la incorporación de materiales extraños y otros factores. Se considera contaminante a la sustancia que altera o cambia las propiedades del suelo (Stamatiadis et al., 1999), tales como pH, conductividad eléctrica, concentración de metales pesados, lo cual se refleja en la actividad biológica del suelo detectada como producción de ATP, actividad enzimática, producción de  $\text{CO}_2$ , etc.

La incorporación de ciertas sustancias al suelo puede servir de sustrato para algunos microorganismos (Abaye y Brookes, 2006) cuando un tipo de sustancia es agregada al suelo, como por ejemplo lodos de refinería, el número de microorganismos se incrementa debido a que estos utilizan los hidrocarburos presentes en los lodos como fuente de carbono (Nilsson et al., 2005). Los suelos contaminados con lodos de refinería pueden ser recuperados a través de la biorremediación, que es una técnica que ayuda a disminuir la concentración de los hidrocarburos del suelo, estos compuestos son transformados a  $\text{CO}_2$ , agua y biomasa microbiana (Marín et al., 2005).

La estimación de la actividad microbiológica puede ser un buen indicador del grado de contaminación de un suelo afectado por la adición de sustancias extrañas (Insam et al., 1996; Kuperman and Margaret, 1997), de tal manera que parámetros como ATP, actividad fosfatasa y ureasa, producción de  $\text{CO}_2$  y fitotoxicidad fueron considerados para obtener información sobre el efecto de la adición de hidrocarburos al suelo en el comportamiento de los microorganismos del suelo. El ATP está presente en todas las células vivas y es de ayuda para determinar la biomasa microbiana del suelo (García et al., 2003). El objetivo de este estudio fue determinar el efecto de los lodos de refinería en la actividad biológica del suelo de la zona seleccionada.

## Material y métodos

### *Sitio de muestreo*

El distrito minero Cartagena-La Unión está localizado en el sureste de la Península Ibérica, cubre un área de  $50 \text{ km}^2$ , pertenece a la Sierra de Cartagena-La Unión, también llamada Sierra Minera. El clima semiárido es típicamente mediterráneo con una precipitación anual de alrededor de 250–300 mm y concentrada durante la primavera y el otoño. La temperatura anual promedio es de  $18 \text{ }^\circ\text{C}$  (Conesa et al., 2006).

### *Toma de muestras*

El muestreo de suelo fue realizado en Junio de 2006. Se seleccionaron cuatro sitios en un lugar donde se está llevando a cabo un proceso de landfarming para disminuir la concentración de hidrocarburos de lodos de refinería. Estos sitios de muestreo fueron elegidos basándose en la cantidad de lodos de refinería que contenían tales suelos; el

primero presentaba 2.3 %, el segundo 2.66 % y el tercero 5.03% de hidrocarburos, el cuarto sitio fue el suelo testigo, es decir, libre de hidrocarburos.

En cada sitio de muestreo se tomaron cinco muestras de suelo de los primeros 20 cm, en zigzag, las cuales fueron mezcladas manualmente y divididas en tres submuestras. Las muestras de suelo destinadas a las pruebas bioquímicas fueron almacenadas a 8°C.

#### *Análisis físico-químicos*

Las muestras de suelo fueron secadas al aire, molidas y cribadas con un tamiz de 2 mm y almacenadas en bolsas de plástico hasta su análisis. El pH del suelo fue determinado a partir de mezclas de 1:1 agua/suelo; se usó un pHímetro Crison Basic 20 (Peech, 1965; National Soil Survey Center, 1996). La conductividad eléctrica fue determinada en extracto de saturación (Bower and Wilcox, 1965) usando un conductímetro Crison Micro CM 2200. Se determinó la concentración de zinc y cobre totales en el suelo utilizando una mezcla nítrico-perclórica en un tubo de Kjeldahl (Lindsay and Novell, 1978; Ernst, 1996).

#### *Análisis Bioquímicos*

Se determinó la actividad fosfatasa y ureasa en el suelo; producción de CO<sub>2</sub> así como la fitotoxicidad, medida como índice de germinación de semillas de trigo, con el propósito de obtener información sobre el efecto de la adición de hidrocarburos al suelo.

La actividad de la enzima fosfatasa fue establecida usando el método de Tabatabai y Bremner (1969). Este método se basa en la determinación espectrofotométrica de p-nitrofenol liberado cuando el suelo es incubado a 37°C durante una hora con una solución tampón. La actividad de la enzima ureasa fue medida por el método de Tabatabai y Bremner (1972) modificado por Nannipieri et al. (1978), que se basa en la determinación de amonio liberado después de la incubación del suelo en una disolución de urea a 37°C durante 90 minutos.

Para determinar la producción de ATP se usó el método de Webster et al. (1984) modificado por Ciardi y Nannipieri (1990).

La respiración edáfica fue determinada como producción de CO<sub>2</sub> y fue medida con un aparato PBI Dansensor después de incubar el suelo a 28°C durante 24 horas (García et al., 2003).

Otro indicador de la afectación del suelo, por la presencia de contaminantes, es la germinación de

semillas de vegetales. Se determinó la fitotoxicidad, basado en el índice de germinación, para ello se colocaron semillas de trigo en cajas petri con suelo muestreado, la temperatura se estableció en un rango de 24 – 26°C (Molina-Barahona et al., 2005), después de 7 días se midió la longitud de las plántulas.

Los datos obtenidos fueron analizados estadísticamente usando el Paquete de Diseños Experimentales (Olivares, 1994). Se llevaron a cabo análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey.

#### **Resultados y discusión**

El análisis de suelo (Tabla 1) muestra que el pH de los suelos se ubica en un rango que va de 7.39 (suelo con mas carga de hidrocarburos) a 7.98 (suelo testigo), observándose diferencia significativa ( $P > 0.005$ ) entre los valores de este parámetro, es decir, hubo influencia de los lodos de refinería sobre este indicador. Los valores de conductividad eléctrica varían de 2.89 a 10.96 mS cm<sup>-1</sup>; el valor mas bajo corresponde al sitio sin contaminación con hidrocarburos, mientras que el valor más alto corresponde al sitio con mayor cantidad de lodos de refinería.

En el caso del presente estudio, los suelos con mayor concentración de hidrocarburos presentaron los valores más altos de metales pesados, tanto para la concentración total de zinc y de cobre. De acuerdo con Mulligan et al. (2001) el zinc es el metal que alcanza las concentraciones mas altas en el suelo. Los valores de la actividad de la enzima ureasa variaron desde 0.400 a 2.52  $\mu\text{moles N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco h}^{-1}$ , siendo el valor mas bajo el correspondiente al suelo con concentración de 2.665 de hidrocarburos, y el valor alto se relaciona al suelo con la mayor cantidad de hidrocarburos (Tabla 2). Con respecto a la actividad de la enzima fosfatasa, se observó que fue afectada por la contaminación ya que la actividad más alta fue registrada en los suelos con mayor concentración de hidrocarburos (5.03%). La adición de lodos de refinería estimuló la actividad de las poblaciones del suelo de tal manera que la tasa de respiración por día más alta, fue observada en el suelo con la mayor cantidad de lodos de refinería (muestras 10, 11 y 12 de la Fig. 1), notándose una disminución de ésta en los suelos con cantidades baja y media de hidrocarburos. Los valores variaron de 2 a 251 mg

de CO<sub>2</sub> kg<sup>-1</sup> día<sup>-1</sup>.

Tabla 1. Análisis físico químico del suelo. Se presentan las medias de los valores de los parámetros analizados.

Sitios	Hidrocarburos %	pH	Parámetros		
			C.E. (mS m <sup>-1</sup> )	Zn mg kg <sup>-1</sup>	Cu mg kg <sup>-1</sup>
Testigo	< 0.5 c*	7.98 a	2.89 c	294.75 c	96.51 b
1	2.3 b	7.67 ab	6.55 b	404.33 ab	108.75 b
2	2.66 b	7.82 b	6.88 b	351.87 b	123.06 b
3	5.03 a	7.39 c	10.96 a	567.33 a	166.08 a

\* Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes.

Tabla 2. Análisis Bioquímicos. Se presentan las medias de los valores de los parámetros analizados.

Sitios	Parámetros					
	Hidrocarburos %	Actividad Ureasa	Actividad Fosfatasa	Producción de ATP	Respiración	Germinación
		μmoles N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> g <sup>-1</sup> suelo seco h <sup>-1</sup>	mmoles liberados PNF g <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup>	ng g <sup>-1</sup>	C-CO <sub>2</sub> kg <sup>-1</sup> día <sup>-1</sup>	%
Testigo	< 0.5 c*	1.67 b	3.5060 b	424.43 b	12 b	100 a
1	2.3 b	0.4397 c	2.4023 b	1133.86 b	2 b	83.13 b
2	2.66 b	0.7933 c	2.9450 b	931.33 b	8 b	59.23 c
3	5.03 a	2.53 a	12.8533 a	2,661.70 a	251 a	39.60 d

\*Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes.

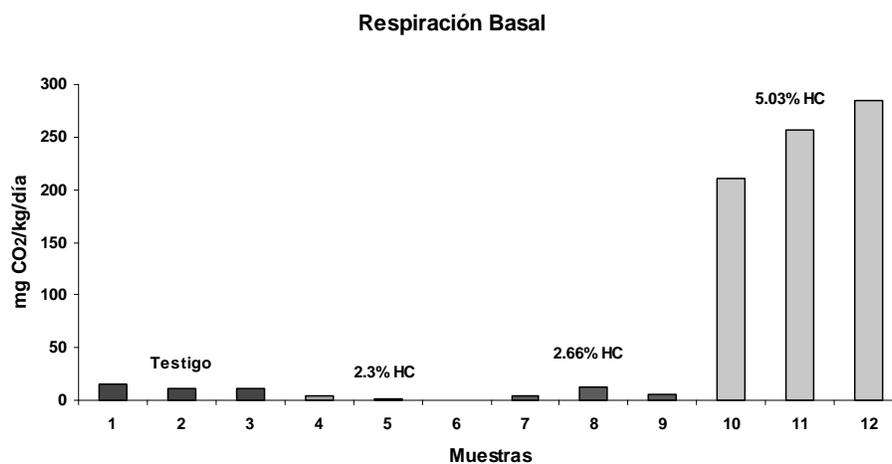


Figura. 1. Respiración Basal. Los datos son medias de la respiración edáfica por día durante 24 días.

Con respecto a los valores de la producción de ATP, indicador de la biota del suelo, se aprecia diferencia estadística solamente en los suelos con mayor concentración de estas sustancias, sitio 4.

La fitotoxicidad de los hidrocarburos presentes en los lodos de refinería fue medida a través de un índice de germinación de semilla de trigo; los valores de este índice fueron de 39 % en los suelos más contaminados contra 100% en el suelo intacto. La adición de lodos de refinería tuvo impacto en el pH del suelo, propiciando las condiciones para el desarrollo de microorganismos que utilizan a los hidrocarburos como fuente de carbono, ya que éstos requieren de un pH cercano a la neutralidad (Atlas, 1988) el cual se presentó en los suelos con lodos de refinería. Los lodos de refinería contienen gran cantidad de cloruros (Marín et al., 2005) se considera, por lo tanto, que son los causantes del aumento en la conductividad eléctrica de los suelos contaminados de este estudio.

Con respecto a los metales pesados, solamente en el caso del zinc se rebasó los límites de The European Union Council Directive, los cuales son: Cu 40 y Zn 300 mg kg<sup>-1</sup> suelo (Suhadolc et al., 2004). En esas concentraciones hay pocos efectos adversos para la biomasa o la actividad microbiana (Barajas et al., 1999). Los ciclos de los elementos más importantes en el suelo son afectados por la introducción de lodos de refinería. Así se observa que la actividad de la enzima ureasa en los suelos en estudio, aumento casi al doble su valor en el suelo con mas carga de lodos de refinería comparado con el suelo intacto. Por otro lado la actividad de la enzima fosfatasa registró valores más altos en los suelos con mayor concentración de lodos; se considera que los registros de los suelos con menor concentración de hidrocarburos fueron estadísticamente iguales al testigo porque al momento de la evaluación los hidrocarburos ya habían sido metabolizados por los microorganismos del suelo. Cuando se incorporan este tipo de materiales (lodos de refinería) al suelo, las poblaciones microbianas del suelo inician su transformación, notándose, entre otros, incrementos en la producción de ATP, indicador de aumento en la población microbiana (Marín et al., 2005), tal y como sucedió en el presente trabajo. La respiración del suelo es un proceso que refleja la actividad biológica del mismo y se manifiesta con el desprendimiento de CO<sub>2</sub>, resultante del metabolismo de los organismos vivos del suelo

(García et al., 2003), en este ensayo los hidrocarburos presentes en los lodos fueron metabolizados por la biota edáfica manifestándose mayor producción de CO<sub>2</sub> en los suelos con mayor cantidad de lodos de refinería, con respecto al suelo intacto. La respiración edáfica fue proporcional a la concentración de hidrocarburos en el suelo; los suelos con menor concentración de éstos presentaron valores más bajos, semejantes al del testigo.

Los lodos de refinería contienen sustancias, compuestos de zinc o cobre, que inhibieron la germinación de semillas, la cual disminuyó conforme se aumentaba la concentración de estos materiales.

## Conclusiones

La actividad biológica del suelo, a excepción de la germinación de semillas, fue estimulada por los hidrocarburos presentes en los lodos de refinería. Este efecto de estimulación fue directamente proporcional a la concentración de hidrocarburos en los suelos en estudio.

## Bibliografía

- Abaye, D.A. and C. Brookes. 2006. Relative importance of substrate type and previous soil management in synthesis of microbial biomass and substrate mineralization. *European Journal of Soil Science* 2006; 57: 179 – 189.
- Atlas, R.M. 1988. *Microbiology and Fundamentals*. McMillansPublishing Co., New York, USA. 352 – 353.
- Barajas Aceves M., C. Grace, J. Ansorena , L. Dendooven, P.C. Brookes. 1999. Soil microbial biomass and organic C in a gradient of zinc concentrations in soils around a mine spoil tip. *Soil Biology & Biochemistry* 31, 867–876.
- Bower CA, Wilcox LV. 1965. Soluble salts. In: Black CA, editor. *Methods of soils analysis: Part 2*. Madison (WI, USA): American Society of Agronomy, 933–40.
- Ciardì, C., Nannipieri, P. 1990. A comparison of methods for measuring ATP in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 22, 725 – 727.
- Conesa, H. M., A. Faz, R. Arnaldos. 2006. Heavy metal accumulation and tolerance in plants from mine tailings of the semiarid Cartagena–La Unión mining district (SE Spain). *Science of the Total Environment*; 1 – 11.
- Diack, M. and D.E. Stott. 2001. Development of soil quality index for the Chalmers silty clay loam form the Midwest USA. In: D.E. Stott, R.H. Mohtar and G.C. Steinhardt (eds). *The Global Farm*. 10<sup>th</sup>. International Soil Conservation Organization Meeting; 550 – 555
- Ernst, W.H.O. 1996. Bioavailability of heavy metals and decontamination of soils by plants. *Applied Geochemistry* 11,163 – 167.
- García, I. C., F. Gil, T. Hernández y M. Muñoz. In: García, I. C., F. Gil, T. Hernández y C. Trasar, editores. 2003. *Técnicas de*

- Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Ediciones Mundi-Prensa. España, 287 – 288.
- Insam, H., Hutchinson, T.C., Reber, H.H., 1996. Effects of heavy metal stress on the metabolic quotient of the soil microflora. *Soil Biology & Biochemistry* 28, 691–694.
- Kuperman, R.G., Margaret, M.C. 1997. Soils heavy metals concentrations: microbial biomass and enzyme activities in a contaminated grassland ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry* 29, 179–190.
- Lindsay W, Novell W. 1978. Development of a DTPA soil test for Zn, Fe, Mn, and Cu. *Soil Science Society America Journal* 42: 421-428.
- Marín, J.A., T. Hernández, C. García. 2005. Bioremediation of oil refinery sludge by landfarming in semiarid conditions: Influence on soil microbial activity. *Environmetal Research* 98: 185 195.
- Martínez-Orozco JM, Valero-Huete F, González-Alonso S. 1993. Environmental problems and proposals to reclaim the areas affected by mining exploitations in the Cartagena mountains (southeast Spain). *Landscape Urban Plan*; 23:195–207.
- Molina, B. L., L. Vega L., M. Guerrero, S. Ramírez, I. Romero, C. Vega J., A. Albores. 2005. Ecotoxicological Evaluation of Diesel-Contaminated Soil Before and After Bioremediation Process. Wiley InterScience; 100 – 109.
- Mulligan, C.N., R.N Yong and B.F. Gibbs. 2001. Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. *Engineering Geology* 60:193-207.
- Nannipieri, P., Jhonson, R.L., Paul, E.A. 1978. Criteria for measurement of microbial growth and activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 10, 223 – 229.
- National Soil Survey Center Soil survey laboratory methods manual. 1966. Soil Survey Investigations Report, No 42, version 3.0. United States Department of Agriculture. Natural resources Conservation Service. U.S. Government Printing Office. Washington DC. EE.UU. 693 pp.
- Nilsson, K.S., R. Hyvönen & G.I. Agren. 2005. Using continuous-quality theory to predict microbial biomass and soil organic carbon following organic amendments. *European Journal of Soil Science* 56: 397 – 405.
- Olivares, S. E. 1994. Paquete de diseños experimentales FAUANL. Versión 2.5. Facultad de Agronomía UANL. Marín, N. L.
- Peech M. 1965. Hydrogenion activity. In: Black CA, editor. *Methods of soils analysis: part 2*. Madison (WI, USA): American Society of Agronomy; 914–26.
- Stamatiadis, S. J.W. Doran, T. Kettler. 1999. Field and laboratory evaluation of soil quality changes resulting from injection of liquid sewage sludge. *Applied Soil Ecology* 12: 263 – 272.
- Suhadolc M., R. Schroll, A. Gattinger, M. Schloter, J.C. Munch, D. Lestan. 2004. Effects of modified Pb-, Zn-, and Cd-availability on the microbial communities and on the degradation of isoproturon in a heavy metal contaminated soil. *Soil Biology & Biochemistry* 36: 1943–1954.
- Tabatabai, M.A. Bremner, J.M. 1969. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil Biology & Biochemistry* 1, 301 – 307.
- Tabatabai, M.A. Bremner, J.M. 1972. Assay of urease activity in soil. *Soil Biology & Biochemistry* 4, 479 - 487.
- Webster, J., Hampton, G., Leach, F. 1984. ATP in soil: a new extractant and extraction procedure. *Soil Biology & Biochemistry* 16, 335 – 342.