

EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE UN SUELO CONTAMINADO CON DIFERENTES TIPOS DE CRUDOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE DOS PASTOS TROPICALES

Ismael Hernández-Valencia¹, Luis Manuel Lárez¹ y José Vicente García²

RESUMEN

La producción petrolera en Venezuela ha generado variados impactos ambientales en donde destacan la contaminación de ecosistemas y de tierras agrícolas. Para establecer el impacto de la contaminación con petróleo sobre la germinación de los pastos forrajeros *Megathyrsus maximus* y *Urochloa brizantha* se realizaron bioensayos de toxicidad a corto plazo en donde se expusieron durante ocho días las semillas de ambos pastos a suelos contaminados con concentraciones crecientes de cuatro crudos de diferente gravedad API. Los crudos utilizados fueron un crudo extra pesado (9,3 °API), un crudo pesado (12,1 °API), un crudo mediano (27,0 °API) y un crudo liviano (30 °API). Al término del ensayo se evaluó el porcentaje de semillas germinadas, la elongación de la radícula, el índice de germinación y la concentración efecto 50 (CE₅₀). Los resultados mostraron que a) con el aumento de la concentración del crudo disminuyeron el número de semillas germinadas, la elongación de la radícula y el índice de germinación, b) con la disminución de la gravedad API, las semillas lograron germinar en concentraciones más altas del crudo, c) para un mismo tipo y concentración de crudo, ambas especies presentaron una respuesta similar en el porcentaje de germinación, elongación de la radícula y el índice de germinación, y d) las CE₅₀ fueron más altas y similares entre los crudos extra pesado y pesado, y menores y similares entre los crudos medianos y livianos, lo cual confirma que los primeros son los menos tóxicos.

Palabras clave adicionales: Bioensayo, germinación, *Megathyrsus maximus*, *Urochloa brizantha*

ABSTRACT

Toxicity of a soil contaminated with crudes and its effect on the germination of two tropical pastures

Oil production in Venezuela has generated a variety of environmental impacts, including contamination of ecosystems and land under agricultural use. In order to establish the impact of oil contamination on the germination of *Megathyrsus maximus* and *Urochloa brizantha*, two tropical pastures used as fodder, short-term toxicity bioassays were performed in which seeds of both grasses were exposed to soil contaminated with increasing concentrations of four crude oils with different API gravity. Crude oils were extra heavy crude (9.3 ° API), heavy crude (12.1 ° API), medium crude (27.0 ° API) and light crude (30 ° API). At the end of the trial the germination percentage of seeds, radicle elongation and germination index were evaluated. The results showed that a) with the increase of the crude concentration decreased the number of germinated seeds, radicle elongation and germination index, b) as the API gravity decreased, the seeds achieved germination at higher concentrations of the crude oil, c) for the same type and concentration of crude, both species presented a response similar in germination percentage, radicle elongation and germination index, and d) EC₅₀ were higher and similar between extra heavy and heavy crude, and smaller and similar between medium and light crude, confirming that the former are the less toxic crudes.

Additional key words: Bioassay, germination, *Megathyrsus maximus*, *Urochloa brizantha*

INTRODUCCIÓN

La contaminación por petróleo y sus derivados es uno de los problemas ambientales más comunes en la actualidad y puede producirse durante todos los procesos de la cadena de valor de la industria petrolera, principalmente por prácticas

inadecuadas o accidentes en las operaciones. La contaminación por petróleo causa daños ecológicos, por lo que la recuperación de ecosistemas contaminados se ha convertido en una materia prioritaria de investigación. Considerando que Venezuela cuenta con las mayores reservas de petróleo en el mundo (OPEC, 2016) y que la

Recibido: Julio 23, 2016

Aceptado: Febrero 2, 2017

¹ Instituto de Zoología y Ecología Tropical. Universidad Central de Venezuela. Apdo. 47058. Caracas. Venezuela. e-mail: ismael.hernandez@ciens.ucv.ve

² Centro de Ecología, Instituto de Tecnología Venezolana para el Petróleo (INTEVEP). Los Teques. Venezuela

industria petrolera es el principal motor de su economía (PDVSA, 2015) se puede concluir que el país es altamente vulnerable a la degradación ambiental por la actividad petrolera y por ello es necesario evaluar los efectos de la contaminación por petróleo sobre los ecosistemas silvestres y agroecosistemas del país.

Diferentes estudios han determinado el efecto de la contaminación por petróleo sobre los ecosistemas. Dicha contaminación ocasiona el deterioro de la calidad del ambiente, amenazas a la salud pública, así como daños a las especies vegetales y animales (Greenpeace, 2012). De acuerdo a la legislación venezolana (República de Venezuela, 1998), es obligatorio por parte de los responsables, la descontaminación de su emplazamiento, lo cual resulta a veces en una operación laboriosa, y por supuesto costosa, que incluye la recolección e interpretación de información histórica acerca de las actividades realizadas en ese lugar y de los posibles niveles de contaminantes que puedan estar presentes en el sitio. En caso de encontrar contaminantes en concentraciones no permitidas se debe realizar un saneamiento ambiental, que incluya en algunos casos, la recuperación vegetal de las áreas afectadas. Por esta razón, es necesario conocer cuales especies vegetales son aptas para descontaminar y/o procurar cobertura a los suelos contaminados, así como conocer las concentraciones de contaminantes que son capaces de tolerar.

El petróleo es una mezcla extremadamente compleja de compuestos orgánicos que pueden contener azufre, oxígeno y nitrógeno y metales pesados tales como níquel, vanadio, cromo y cobre, que pueden estar libres o asociados (Speight, 2014). La composición química de cada tipo crudo varía y puede tener diversos efectos sobre los organismos dentro de un mismo ecosistema. Estas diferencias en los efectos tóxicos se deben a una composición cualitativa diferente, así como a las diferencias de concentración de cada componente (Kyung-Hwa et al., 2004). Los constituyentes del petróleo usualmente se discriminan en cuatro grandes grupos: saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Speight, 2001), en donde los compuestos con mayor potencial tóxico son los saturados y aromáticos (Figueruelo y Marino, 2004; Montes, 2008).

La contaminación por petróleo puede afectar a

las plantas al retardar la germinación de semillas y reducir la altura de la planta, densidad de tallos, tasa fotosintética y la biomasa, o puede producir mortalidad. La intensidad de los daños depende de varios factores bióticos y abióticos, incluyendo el tipo y la cantidad de crudo, la especie, su cobertura, las condiciones climáticas imperantes y la composición del suelo, incluyendo las comunidades microbianas que en él se encuentran (Salanitro, 1997; Lin et al., 2002).

La fitotoxicidad de un compuesto puede ser determinada a través de la evaluación de la germinación de semillas y el desarrollo de las plántulas (Adam y Duncan, 2002). Varias pruebas han sido diseñadas por algunas instituciones dedicadas a la protección del ambiente tales como OECD (2003) y USEPA (1996) y las mismas se consideran como criterio de diagnóstico para determinar el efecto y la tolerancia de un contaminante sobre una especie particular. De especial interés, es evaluar la tolerancia a la contaminación por petróleo de especies de valor económico, como es el caso de los pastos *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) (braquiaria) y *Meagathysus maximus* ((Jacq) B.K. Simon & S.W.L. Jacobs) (gamelote, guinea), dos especies perennes de origen africano muy bien adaptadas a las condiciones ecológicas de las sabanas, y que son muy utilizados en el país como forrajes en la cría de bovinos, actividad muy extendida en la Faja Petrolífera del Orinoco, situación que hace a los suelos susceptibles a la contaminación por petróleo. Por otra parte, ambas especies han mostrado su tolerancia a la contaminación del suelo con bajas concentraciones de petróleo y capacidad para reducir el contenido de hidrocarburos en los mismos (Hernández y Mager, 2003). El objetivo del presente estudio fue evaluar la toxicidad de cuatro crudos venezolanos de diferente composición y gravedad API sobre la capacidad de germinación y crecimiento radicular de los pastos mencionados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron semillas certificadas (germinación > 90 %) de las especies de pasto *U. brizantha* y *M. maximus*. Para evaluar su germinación se utilizó como sustrato un suelo franco arenoso, fuertemente ácido y pobre en

Hernández-Valencia et al. Suelo contaminado con crudos vs. germinación de pastos

nutrientes, tamizado a 2 mm, y cuyas características físicas y químicas fueron descritas por Hernández y Mager (2003). Se utilizaron cuatro tipos de crudo: extra pesado (9,3 °API), pesado (12,1 ° API), mediano (27,0 °API) y liviano (30 ° API). La composición, en cuanto a las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Cuadro 1) fue determinada según el método 5520 de APHA (1998).

Cuadro 1. Contenido (%) de las fracciones de saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos de los crudos evaluados

Tipo de crudo	Saturados	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
Liviano (30° API)	60,1	22,3	14,4	3,2
Mediano (27,0 ° API)	54,7	25,3	12,0	8,0
Pesado (12,1 ° API)	21,4	15,3	11,5	21,4
Extra pesado (9,3 ° API)	25,6	5,9	30,3	38,2

Efecto de la contaminación del suelo sobre la germinación. Para establecer el efecto de la concentración del crudo en el suelo sobre la germinación de las semillas de cada especie se realizó un bioensayo en donde se expusieron las semillas a seis concentraciones diferentes de los crudos seleccionados. Las concentraciones variaron entre 0 y el valor más bajo que ha producido una inhibición total de la germinación; estos valores se adoptaron a partir de los resultados obtenidos por Lárez (2013), los cuales fueron 90 % para el crudo extra pesado, 63 % para el crudo pesado, 12 % para el crudo mediano y 9 % para el crudo liviano. A partir de este valor o concentración mínima se definieron las demás concentraciones de acuerdo a un factor de dilución de aproximadamente 0,3 (Cuadro 2), según protocolo de la USEPA (1986).

Para los ensayos de toxicidad se realizó una modificación del bioensayo de germinación descrito por USEPA (1986). La prueba permitió evaluar los efectos fitotóxicos del crudo sobre la germinación y elongación de la radícula durante los primeros 8 días de crecimiento, tiempo establecido previamente por Lárez (2013),

quien encontró que a partir de ese momento el número de semillas germinadas de estos pastos no varió en suelos no contaminados.

Cuadro 2. Concentraciones de crudo (% en peso) evaluadas para los tratamientos de germinación

Concentración	Extrapesoado	Pesado	Mediano	Liviano
Control	0,00	0,00	0,00	0,00
C1	0,90	0,63	0,12	0,09
C2	2,70	1,89	0,36	0,27
C3	9,00	6,30	1,20	0,90
C4	27,00	18,90	3,60	2,70
C5	90,00	63,00	12,00	9,00

Para cada tratamiento se colocaron en una cápsula de Petri de 90 mm de diámetro, 30 g del suelo sin contaminar o contaminado, según el caso, y se agregó 7 mL de agua destilada. Posteriormente se colocaron 30 semillas directamente sobre los suelos dejando espacio suficiente entre ellas para no obstruir la elongación de las raíces. Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. El bioensayo se mantuvo en condiciones de oscuridad y temperatura de 25 °C. Al término de la prueba se registró el número de semillas que germinaron, considerando como criterio de germinación la aparición visible de la radícula (≥ 1 mm). Posteriormente, usando un papel milimetrado, se midió la longitud de la radícula. Con los datos de germinación y longitud de la radícula se calculó el índice de germinación propuesto por Hamdi et al. (2007), mediante la ecuación:

$$IG = Gt \times Lrt / Gc \times Lrc$$

IG = Índice de germinación

Gt = Número promedio de semillas germinadas en un tratamiento determinado

Gc = Número promedio de semillas germinadas en el tratamiento control (suelo limpio sin petróleo)

Lrt = Longitud promedio de la radícula en plántulas de un tratamiento determinado

Lrc = Longitud promedio de la radícula en plántulas del tratamiento control

Este índice permitió evaluar de manera integral la toxicidad crónica que afectó el crecimiento de la radícula y la toxicidad aguda que afectó la germinación de la semilla.

Análisis estadístico. El diseño experimental fue

aleatorio, en el que se evaluaron dos especies de pastos expuestas a cuatro tipos de crudo en seis concentraciones diferentes, para un total de 48 tratamientos. Se calcularon los porcentajes de germinación, longitud de las radículas e índices de germinación (IG). Las medias obtenidas en cada tratamiento fueron comparadas a través de un análisis de varianza y prueba de LSD utilizando el programa Statistica v. 8.0 (Tulsa, OK, USA). Adicionalmente, se calcularon las concentraciones que inhibieron el 50 % de la germinación (CE₅₀) con ayuda del programa TSK, versión 1.5 (USEPA, 1992) y se realizaron pruebas de correlación lineal (Pearson) entre el CE₅₀ y las fracciones del petróleo (saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos). En los casos donde las varianzas no fueron homogéneas se realizaron comparaciones múltiples a través del método de Games y Howell (Day y Quinn, 1989).

RESULTADOS

Efecto sobre la germinación. Se evidenció un efecto significativo del tipo y concentración del crudo sobre la germinación de *U. brizantha* y *M. maximus*, en donde a medida que se aumentó la concentración de los crudos disminuyó el número de semillas que germinó de ambas especies (Figura 1). Estos resultados ratifican que las semillas de ambos pastos toleraron concentraciones más altas de contaminación del suelo con hidrocarburos extra pesados, y que el intervalo de germinación, así como la tolerancia a concentraciones más altas disminuyó en la medida que aumentó la gravedad API. En cuanto a la respuesta entre las especies para una misma concentración y tipo de hidrocarburo, se observó una tendencia sostenida de mayor tolerancia en *U. brizantha* aunque no se alcanzó significancia estadística (Figura 1).

Efecto de diferentes concentraciones de petróleo sobre la elongación de la radícula. La elongación de la radícula también fue afectada de manera inversa por el incremento en la concentración de los crudos. Adicionalmente, los efectos más severos incrementaron en el orden, crudo extra pesado < pesado < mediano < liviano (Figura 2). Por ejemplo, para *U. brizantha*, con el crudo extra pesado se alcanzó una disminución de la elongación de la radícula de 34,5 % a una concentración de 27 %, mientras que para el crudo

liviano la disminución fue de 75 % para una concentración 10 veces menor (2,7 %). Para una misma concentración y tipo de crudo la longitud de la radícula en ambas especies tuvo un comportamiento semejante al de la variable germinación (Figura 2).

Índice de germinación (IG) y concentración efecto medio sobre la germinación (CE₅₀). Como era previsible, el índice de germinación también disminuyó con el incremento de la concentración de crudo, ya que el índice es una función del porcentaje de germinación y de la elongación de la radícula. De la misma forma, estos cambios fueron más acentuados en los suelos contaminados con el crudo liviano y menos para el crudo extra pesado (Figura 3). No se encontraron diferencias significativas en el IG entre especies para una mismo tipo de crudo y concentración (Figura 3).

Los resultados del CE₅₀ fueron más altos y similares entre los crudos extra pesado y pesado, y menores y similares entre los crudos medianos y livianos (Cuadro 3), lo cual confirma que los primeros son menos tóxicos que los segundos. Los análisis de correlación entre el CE₅₀ y las fracciones del crudo mostraron una relación inversa para la concentración de saturados, aromáticos y saturados + aromáticos, y directa para la concentración de resinas, asfaltenos y resinas + asfaltenos (Cuadro 4).

DISCUSIÓN

Los resultados mostraron que a medida que la gravedad API y la concentración del crudo aumentó, disminuyó la germinación y el crecimiento de la radícula, situación que también se reflejó en el IG, obteniéndose un efecto más tóxico según la secuencia creciente, crudo extra pesado < pesado < mediano < liviano, hecho que está relacionado con el mayor contenido de aromáticos y saturados, respecto a las resinas y asfaltenos (Cuadro 1) y que también se confirma con las correlaciones encontradas entre el CE₅₀ y el contenido de las diferentes fracciones presentes.

Los crudos livianos contienen mayor proporción de componentes volátiles capaces de entrar fácilmente a través de las paredes celulares de las plantas y afectar las membranas celulares (Pezeshki et al., 2000). Estas pequeñas moléculas de hidrocarburos que penetran en la semilla pueden ser

Hernández-Valencia et al. Suelo contaminado con crudos vs. germinación de pastos

tóxicas para el embrión y afectar la germinación. En contraste, los hidrocarburos de petróleo con baja gravedad API, contienen en mayor proporción compuestos de alto peso molecular como las resinas y asfaltenos que resultan menos tóxicos (Adam y Duncan, 2002).

Los compuestos tóxicos pueden afectar la división celular, ya sea por retardo en el desarrollo de mitosis o alteración del proceso de alargamiento de las estructuras germinativas (Adam y Duncan, 2002). También pueden reducir la actividad de las enzimas necesarias para la degradación de los polisacáridos como la amilasa, situación que afecta la división celular, mientras que la inhibición de la fosforilasa podría perturbar las actividades respiratorias en la germinación de las semillas (Achuba, 2006). Si el crudo logra penetrar el tejido de las plantas puede dañar la

membrana de las células, y afectar el intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de la célula. En condiciones extremas puede disolver y producir lisis de la membrana celular (Figueruelo y Marino, 2004), con la consecuente pérdida del contenido celular, además de bloqueo de los espacios intercelulares y la reducción del transporte de nutrientes y metabolitos, así como de la tasa de respiración (Pezeshki et al., 2000). Físicamente el petróleo puede adherirse a la superficie de las raíces y las semillas y reducir la capacidad para absorber agua y oxígeno (Mathew et al. 2006). El efecto también puede ocurrir como resultado de la formación de compuestos polares disueltos en agua que podrían penetrar en la cubierta de la semilla y alterar la estructura y función de las membranas (Wang y Freemark, 1995; Adam y Duncan, 2002).

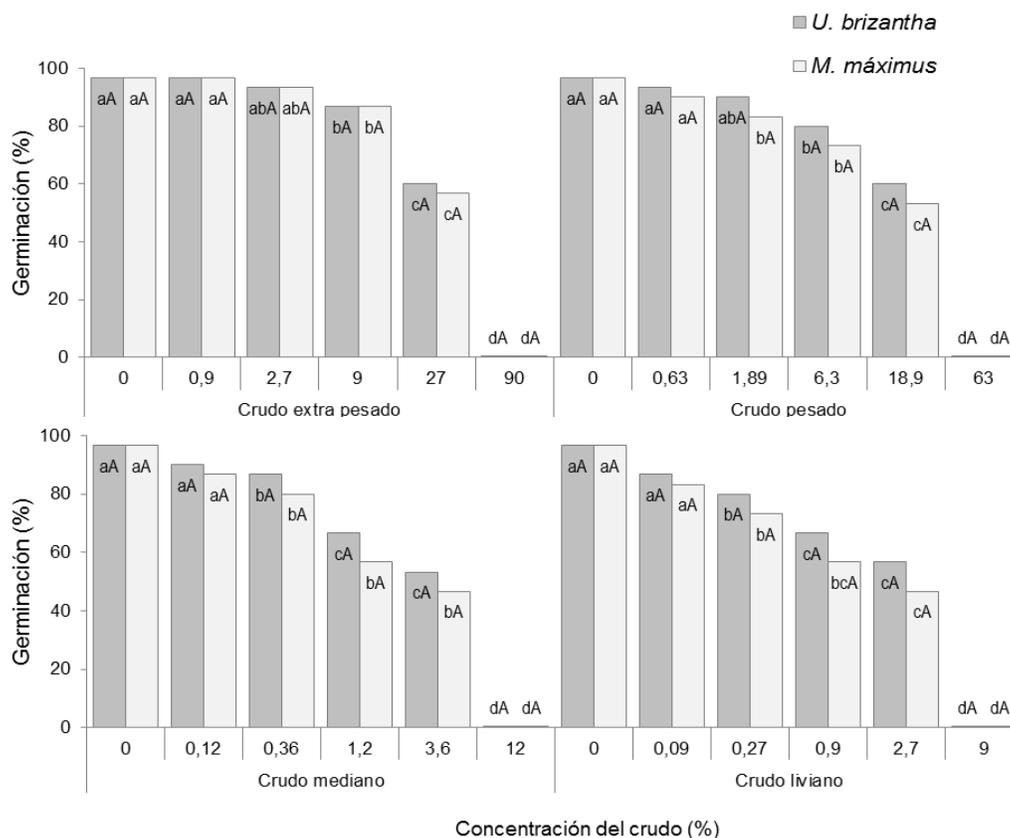


Figura 1. Germinación de semillas de *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximus* ante diferentes tipos y concentraciones de crudo. Letras minúsculas para comparaciones en una misma especie ante diferentes concentraciones de un mismo tipo de crudo. Letras mayúsculas para comparaciones entre especies ante un mismo tipo y concentración de crudo. Prueba LSD ($P \leq 0,05$)

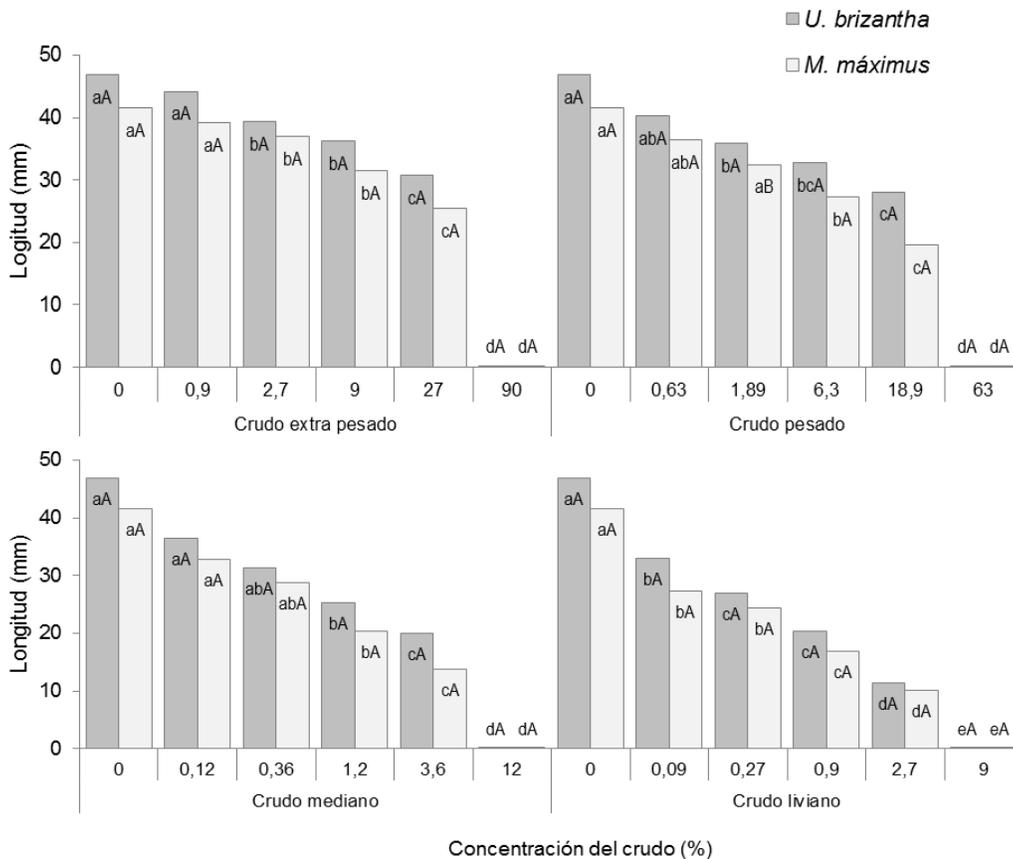


Figura 2. Elongación de la radícula de semillas *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máximus* ante diferentes tipos y concentraciones de crudo. Letras minúsculas para comparaciones en una misma especie ante diferentes concentraciones de un mismo tipo de crudo. Letras mayúsculas para comparaciones entre especies ante un mismo tipo y concentración de crudo. Prueba LSD ($P \leq 0,05$)

Destacan particularmente los intervalos de germinación así como la elongación de la radícula, donde se encontró que los pastos estudiados son capaces de tolerar mayores concentraciones en el suelo de crudos extra pesados que de crudos más livianos. Esto tiene importancia desde el punto de vista práctico. La legislación venezolana establece en el Decreto 2.635 (República de Venezuela, 1998) que a) para que en un suelo contaminado se pueda aplicar el biotratamiento, el contenido de hidrocarburos biodegradables (saturados y aromáticos) no debe exceder el 10 % (Artículo 53), y b) la meta de limpieza de un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo en el suelo se alcanzará cuando el contenido de aceites y grasas sea menor al 1 % (Artículo 50). Los resultados de CE_{50} obtenidos y el intervalo de contaminación permitido por la legislación venezolana, indican

que *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máximus* pueden ser seleccionadas como especies fitorremediadoras, especialmente en aquellos suelos contaminados con crudos pesados y extrapesados cuyos CE_{50} son mayores al 10 % de contaminación. El problema con estos crudos, cuya gravedad API es baja, es que contienen en mayor proporción compuestos polares (resinas y asfaltenos) por lo que son menos biodegradables en comparación con los aromáticos de menor peso molecular y menor resistencia a la biodegradación (McMillen et al., 2004; Infante et al., 2010). Los saturados y aromáticos son considerados como las fracciones más lábiles del crudo y por lo tanto más biodegradables (Simonich y Hites, 1994; Atlas y Bartha, 1998). Adicionalmente, los compuestos de bajo peso molecular tienen un efecto tóxico importante sobre las plantas y microorganismos,

que aunado a la resistencia de los compuestos con alto peso molecular, influyen en la capacidad

fitorremediadora de la planta, atenuando su efecto (Baker, 1970).

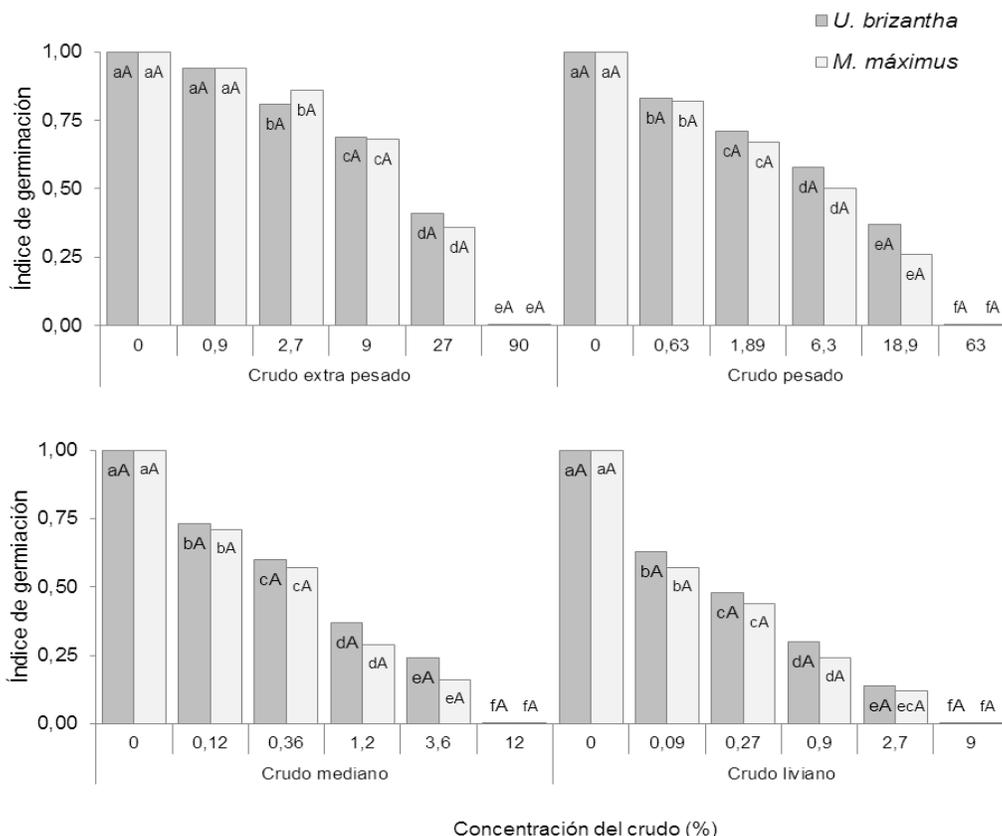


Figura 3. Índice de germinación de semillas *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus máximus* ante diferentes tipos y concentraciones de crudo. Letras minúsculas para comparaciones en una misma especie ante diferentes concentraciones de un mismo tipo de crudo. Letras mayúsculas para comparaciones entre especies ante un mismo tipo y concentración de crudo. Prueba LSD ($P \leq 0,05$)

Cuadro 3. Valores CE_{50} obtenidos para las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus maximus* expuestas a diferentes tipos de crudo

Tipo de crudo	Especie	CE_{50} (%)	Intervalo de confianza 95%
Extra pesado	<i>U. brizantha</i>	27,18 a	21,11-34,99
	<i>M. maximus</i>	26,12 a	20,23-33,71
Pesado	<i>U. brizantha</i>	17,82 a	13,17-24,12
	<i>M. maximus</i>	14,44 a	10,03-20,08
Mediano	<i>U. brizantha</i>	2,63 b	1,82-3,79
	<i>M. maximus</i>	1,95 b	1,28-2,99
Liviano	<i>U. brizantha</i>	1,97 b	1,30-2,99
	<i>M. maximus</i>	1,36 b	0,84-2,20

Comparaciones múltiples de medias con varianzas heterogéneas a través del método de Games y Howell ($P \leq 0,05$)

Algunos trabajos previos han comprobado el potencial fitorremediador de estas especies. Por ejemplo, Mager y Hernández (2013) encontraron

que después de 240 días *Urochloa brizantha* y *Megathyrsus Maximus* eran más eficientes para descontaminar suelos contaminados con crudo

mediano al 3 % de concentración respecto a suelo sin plantas. Por su parte, Merkl et al. (2005) encontraron que luego de 180 días en un suelo contaminado con petróleo pesado al 5 %, que tanto el contenido de hidrocarburos totales de petróleo, así como las fracciones de saturados y aromáticos disminuyeron en los suelos plantados con *Urochloa brizantha*, respecto al suelo sin vegetación, mientras que las fracciones de resinas y asfaltenos no variaron, tanto en los suelos con plantas como en los suelos sin plantas. Asimismo, Navas (2012) evaluó la capacidad de *Megathyrus maximus* para remediar suelos contaminados con crudos extra pesados a un 5 % de concentración y luego de 120 días de estudio observó que la planta logró una disminución en el contenido de aceites y grasas, principalmente por la disminución de los compuestos aromáticos y saturados presentes en el crudo, mientras que las resinas y los asfaltenos no mostraron cambios significativos.

Cuadro 4. Correlaciones entre el CE₅₀ y fracciones de los crudos evaluados. Prueba de Pearson (P<0,05)

Parámetros relacionados	Coefficiente de correlación
CE ₅₀ y contenido de saturados	-0,89
CE ₅₀ y contenido de aromáticos	-0,98
CE ₅₀ y contenido de aromáticos+saturados	-0,95
CE ₅₀ y contenido de resinas	0,77
CE ₅₀ y contenido de asfaltenos	0,98
CE ₅₀ y contenidos de resinas + asfaltenos	0,95

Nuestros resultados tienen otras aplicaciones importantes. Por una parte, se determinó para diferentes tipos de crudo cual sería el impacto sobre la germinación de las semillas de una determinada intensidad de contaminación, establecida esta última como concentración. Por otra parte, se pudo establecer para cada tipo de crudo, cual es la concentración objetivo a lograr a través del saneamiento, para lograr un porcentaje satisfactorio de germinación de las especies evaluadas. Este último es un criterio adicional, ya que legalmente el Decreto 2635 establece que 1 % de aceites y grasas es el límite satisfactorio de limpieza, pero como se ha demostrado en este estudio que los CE₅₀ obtenidos son superiores al

límite establecido por la legislación venezolana. De manera que el uso de estas especies en concentraciones por debajo del CE₅₀ pudiera ser una fase final del tratamiento de suelos contaminados con crudos, que permite además la recuperación vegetal del área, y en consecuencia mejorar el valor escénico de las áreas afectadas. Ello requiere más estudios a diferentes escalas espaciales y temporales para generar un paquete tecnológico eficiente con el uso de estas especies de pastos.

CONCLUSIONES

Para todos los tipos de crudos evaluados, con el aumento de su concentración en el suelo, disminuye el número de semillas germinadas, la elongación de la radícula y el índice de germinación.

Los crudos menos tóxicos para las especies *Megathyrus maximus* y *Urochloa brizantha* fueron el crudo extra pesado y pesado con una concentración CE₅₀ para la germinación que varió entre 14 y 28 %, y los más tóxicos los crudos livianos y mediano cuya CE₅₀ para la germinación estuvo entre 1 y 3 %.

Para un mismo tipo de crudo y concentración del mismo, las especies *Urochloa brizantha* y *Megathyrus maximus* presentaron una respuesta similar a los diferentes indicadores de toxicidad evaluados.

En la medida que disminuyó la gravedad API se ampliaron los intervalos de germinación para ambas *Urochloa brizantha* y *Megathyrus máximus*. Con crudo extrapesado fue entre 0 y 90 %, con crudo pesado entre 0 y 63 %, con crudo mediano entre 0 y 12 %, y con crudo liviano entre 0 y 9 %.

AGRADECIMIENTO

Al Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Investigación de Venezuela, Proyecto Misión Ciencias N° 2007001401, y a Renato de Nóbrega por su apoyo en las evaluaciones estadísticas.

LITERATURA CITADA

1. Achuba, F.I. 2006. The Effect of sublethal concentrations of crude oil on the growth and metabolism of cowpea (*Vigna unguiculata*)

- seedlings. *Environmentalist* 26: 17-20.
2. Adam G. y H. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120: 363-370.
 3. APHA. 1998. Standard methods for the examination of water and wastewater. 20a ed. American Public Health Association. Washington. 1325 p.
 4. Atlas, R. y R. Bartha. 1998. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin Cummings Publ. Co., San Francisco, CA, USA.
 5. Baker, J. 1970. The effects of oils on plants. *Environ. Pollut.* 1: 27-44.
 6. Day R.W. y G.P. Quinn. 1989. Comparisons of treatments after an analysis of variance in ecology. *Ecol. Monogr.* 59(4): 433-463.
 7. Figueruelo, J. y M. Marino-Dávila. 2004. *Química Física del Medio Ambiente y de los Procesos Ambientales*. Editorial Reverté. Ciudad de México. México. 614 p.
 8. Greenpeace. 2012. Impactos ambientales del petróleo. http://www.greenpeace.org/mexico/global/mexico/report/2012/1/impactos_ambientales_petroleo.pdf. (consulta del 20/04/2016).
 9. Hamdi, H., S. Benzarti, L. Manusadzianas, I. Aoyama y N. Jedidi. 2007. Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions. *Soil Biol. Biochem.* 39(8): 1926-1935.
 10. Hernández-Valencia, I. y D. Mager. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro* 15(3): 149-155.
 11. Infante, C., F. Morales, U. Ehrmann, I. Hernández-Valencia y N. León. 2010. Hydrocarbon bioremediation and phytoremediation in tropical soils: Venezuela Case of Study. In: G. Plaza (ed.). *Trends in Bioremediation and Phytoremediation*. Research Signpost. pp. 429-451.
 12. Kyung-Hwa, B., K. Hee-Sik, O. Hee-Mock, Y. Byung-Dae, K. Jaisoo y L. In-Sook. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *J. Environ. Sci. Heal. A.* 39: 2465-2472.
 13. Lárez, L.M. 2013. Estudio sobre la germinación de semillas de *Megathyrsus maximus* (Jacq) B. K. Simon & S. W. L Jacobs) y *Urochloa brizantha* (Hochst. Ex. A. Rich.) en suelos contaminados con diferentes tipos de petróleos crudos. Trabajo de Grado. UCV. Caracas. 67 p.
 14. Lin, Q., I. Mendelssohn, M. Suidan, K. Lee y A. Venosa. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Mar. Pollut. Bull.* 44: 897-902.
 15. Mager, D. e I. Hernández-Valencia. 2013. Actividad microbiana durante la fitorremediación de un suelo contaminado con un crudo liviano. *Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad del Zulia* 30: 52-71.
 16. Mathew, M., X. Yang, M. Baxter y E. Senior. 2006. Bioremediation of 6 % (w/w) diesel contaminated mainland soil in Singapore: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Eng. Life. Sci.* 6(1): 63-67.
 17. McMillen, S., R. Smart y R. Bernier. 2004. Biotreating E&P wastes: lessons learned from 1992–2003. Seventh SPE International Conference on Health, Safety and Environment in Oil and Gas Exploration and Production. Alberta, Canada. <http://www.niochse.net/download/pdf/1007/2015/> (consulta del 10/07/2015).
 18. Merkl, N. 2005. *Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics*. Margraf Publishers. Weikersheim, Alemania. 125 p.
 19. Montes, R. 2008. Efecto ecotoxicológico del petróleo crudo sobre el primer estadio de *Emerita analoga* Stimpson, 1857 (Decápoda: Anomura). *Biologist* 6(2): 101-111.
 20. Navas, G. 2012. Evaluación de la capacidad fitorremediadora de *Panicum maximum* en un suelo de sabana contaminado con un hidrocarburo de petróleo extrapesado. Trabajo de Grado. Universidad Central de Venezuela. Caracas. 72 p.
 21. OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). 2003. *Guideline for testing chemicals 208. Terrestrial plant test: Seedling emergence and seedling*

- growth test. OECD Publications. Paris, Francia. 19 p.
- 22.OPEC (Organization of the Petroleum Exporting Countries). 2016. Annual Statistical Bulletin. Viena, Austria. 125 p.
- 23.PDVSA (Petróleos de Venezuela S.A.). 2015. Informe de gestión 2015. PDVSA. Caracas. 33p.
- 24.Pezeshki, S., M. Hester, Q. Lin, y J. Nyman. 2000. The effects of oil spill and clean-up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: a review. *Environ. Pollut.* 108: 129-139.
- 25.República de Venezuela. 1998. Normas para el control de la recuperación de materiales peligrosos y el manejo de los desechos peligrosos. Decreto N° 2635. Gaceta Oficial de la República de Venezuela No.5.245 Extraordinario del 3-8-1998.
- 26.Salanitro, J., D. Dorn, M. Huesemann, K. Moore, I. Rhodes, T. Vipond, M. Western y H. Wisniewski. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31(6): 1769-1776.
- 27.Simonich, S.L. y R.A. Hites. 1994. Importance of vegetation in removing polycyclic aromatic hydrocarbons from the atmosphere. *Nature* 370: 49-51
- 28.Speight, J.G. 2001. Handbook of Petroleum Analysis. Wiley. Somerset, NJ, USA.
- 29.Speight, J.G. 2014. The chemistry and technology of petroleum. CRC Press. Taylor & Francis Group. Boca Raton, FL, USA. 953p.
- 30.USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1986. Protocols for short tests toxicity screening of hazardous waste sites. USEPA 600/3/88/029. Washington DC. 102 p.
- 31.USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1992. User's guide-Trimmed Spearman-Karber (TSK),” Version 1.5, Environment Monitoring Systems Laboratory. Ecological Monitoring Research Division. USEPA. Cincinnati, OH, USA.
- 32.USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). 1996. Ecological effects Test guidelines. OPPTS 850. Volume 1. USEPA. Washington D.C. 1p
- 33.Wang, W. y K. Freemark. 1995. Use of plants for environmental monitoring and assessment. *Ecotox. Environ. Safe.* 30: 289-301.