

Artículo de Investigación

## Efectos de la exposición al coque retardado de petróleo en algunas enzimas del suelo de sabana al sur del estado Anzoátegui, Venezuela

S. Flores<sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de ecología de suelos, ambiente y agricultura, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Venezuela.

### Resumen

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta biológica y enzimática en mezclas de suelo y coque retardado de petróleo, durante un año de exposición en una sabana. Se ubicaron parcelas de 10.000 m<sup>2</sup> y subparcelas de 2 m<sup>2</sup>, cada subparcela subdividida en 8 cuadrados en los que se insertaron cilindros con mezclas de diferente concentración de coque. Se evaluó: respiración edáfica, actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, fluoresceína diacetato (FDA), deshidrogenasa y fosfatasa ácida. La actividad enzimática mostró una disminución en función del aumento del coque (60 % y 100 %), siendo más marcada para la  $\beta$ -glucosidasa y la deshidrogenasa. No hubo diferencias significativas en la actividad enzimática entre las mezclas de 0 % y 30 % de coque. Se confirma que aún en el 100 % de coque retardado la respiración microbiana y la actividad enzimática no se inhibieron totalmente, demostrando que la comunidad microbiana puede adaptarse y mantener su metabolismo. Estos resultados permiten establecer criterios para el manejo y la gestión ambiental del coque retardado de petróleo.

**Palabras clave:** suelo, enzimas, coque retardado de petróleo.



**Recibido:** 9 de diciembre del 2022

**Aceptado:** 14 de febrero del 2023

**Publicado:** 9 de junio del 2023

**Conflicto de intereses:** los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

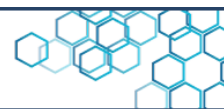
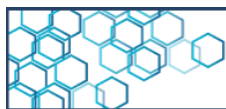
**DOI:**  
<https://www.doi.org/10.5281/zenodo.8355948>

**\*Autor para correspondencia:**

Saúl Flores

**e-mail:**

jassanflores@gmail.com



Research article

## Effects of Delayed Petcoke on Some Savanna Soil Enzymes from the South of Anzoátegui State, Venezuela

S. Flores <sup>1\*</sup> 

<sup>1</sup>Laboratorio de ecología de suelos, ambiente y agricultura, Centro de Ecología, Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe, Venezuela.

### Abstract

The aim of this work is to evaluate the biological and enzymatic response in soil mixtures with delayed petcoke and the mobility of metals from petcoke to soil in these mixtures during an exposure of a year in a savanna. Plots of 10.000 m<sup>2</sup> and subplots of 2 m<sup>2</sup> further divided in 8 squares in which cylinders with mixtures with different concentrations of delayed petcoke were located in the area. The soil respiration and the enzymatic activity of  $\beta$ -glucosidase, fluoresceín diacetate (FDA), dehydrogenase and acid phosphatase were evaluated. The enzymatic activity showed a decrease in relation with petcoke concentration (60 % and 100 %), being more notable in the case of  $\beta$ -glucosidase and dehydrogenase. Enzymatic activity between treatments with 0 % and 30 % of petcoke showed no statistical significant differences. It was confirmed that even in 100 percent of delayed petcoke microbial respiration and enzymatic activity was not totally inhibited, proving that the microbial community can adapt and maintain their metabolism. These results permit the establishment of criteria for the handling and the environmental management of delayed petcoke.

**Key words:** soil, enzymes, delayed petcoke, heavy metals.



**Received:** December 9, 2022

**Accepted:** February 14, 2023

**Published:** June 9, 2023

**Conflict of interest:** the authors declare that there are no conflicts of interest.

**DOI:**

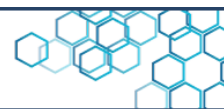
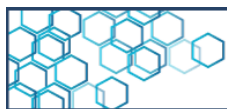
<https://www.doi.org/10.5281/zenodo.8355948>

**\*Corresponding author:**

Saúl Flores

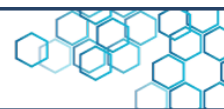
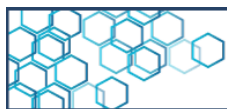
**e-mail:**

[jassanflores@gmail.com](mailto:jassanflores@gmail.com)



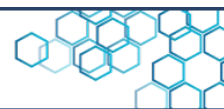
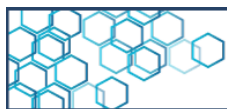
## 1. Introducción

Las enzimas intervienen en la mayoría de los procesos que tienen lugar en el suelo. Las funciones que realizan son de gran importancia, ya que son responsables de la formación de moléculas orgánicas y tienen una participación vital en los ciclos del nitrógeno, fósforo y carbono. Del mismo modo, cumplen un papel vital en diversos procesos, tales como: la mineralización, la inmovilización de nutrientes y la fijación biológica de nitrógeno [1]. Específicamente, en relación con la mineralización, las enzimas participan en la transformación de compuestos orgánicos complejos a sustancias asimilables por las plantas, catalizando etapas limitantes en la mineralización de los nutrientes. Una parte de las enzimas del suelo son extracelulares, liberadas durante el metabolismo y muerte celular, otras son intracelulares y forman parte de la biomasa microbiana o bien están adsorbidas en la materia orgánica y en el sistema coloidal, lo cual sugiere que el suelo puede actuar como un reservorio temporal. Lo anterior implica que, en un momento dado, la actividad enzimática podría no estar ligada necesariamente a la actividad microbiana. Con base en esta información, se planteó como objetivo de este trabajo evaluar la respuesta biológica y enzimática en mezclas de suelo y coque retardado de petróleo. Así como la movilidad de algunos metales pesados desde dichas mezclas al suelo durante un año de exposición en condiciones naturales.



## 2. Metodología

El presente estudio se realizó en un área de sabana a 25 Km de la población de Mapire, al sur del estado Anzoátegui, entre las coordenadas UTM N 7,968167, E 64,713053 y N 7,968309, E 64,712821. La zona se encuentra, aproximadamente, a 60 m.s.n.m. y exhibe una temperatura promedio anual de 27,4 °C, la precipitación promedio anual es de 1.425,8 mm. Se clasifica como una sabana arbustiva rala con algunos elementos de sabana arbustiva densa [2], observándose mayoritariamente especies como: *Roupala montana* Aubl. (Proteaceae), *Curatella americana* L. (Dilleniaceae) y la presencia de especies con hábitos graminoides dentro del estrato herbáceo, pudiendo alcanzar más del 90 % de abundancia. Los suelos presentan baja fertilidad (carbono orgánico, nitrógeno y fósforo) en los primeros 10 cm del perfil, baja capacidad de intercambio catiónico efectiva y valores de pH ácidos [3]. En el área de estudio, se estableció un perímetro 10.000 m<sup>2</sup>, (100 x 100) m, dentro del cual, se delimitaron 5 subparcelas (P1 a P5) de 2 m<sup>2</sup> (2 x 1) m, manteniendo una distancia aproximada entre ellas, de (10–20) m. El área perimetral y de las subparcelas se georreferenciaron con un sistema de posicionamiento global (GPS). Cada subparcela se dividió en 8 cuadrados de (50 x 50) cm, en los cuales se enterraron dos tipos de cilindros plásticos con las siguientes características: diámetro de 7 cm; longitud de 10 cm, con orificios de un diámetro de 4 mm, en las caras superiores e inferiores. Los cilindros se clasificaron en: (a), de control/crecimiento (la pared del cilindro posee orificios de 4 mm de diámetro) y (b), de exclusión (la pared del cilindro carece de orificios). Tanto los cilindros de control/crecimiento como

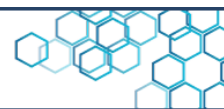
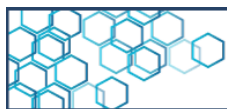


los de exclusión se rellenaron con cada una de las siguientes mezclas: 1) suelo sin coque (0 %); 2) suelo con 30 % de coque retardado de petróleo; 3) suelo con 60 % de coque retardado de petróleo y 4) coque retardado de petróleo (100 %), sin suelo. Se estableció una distribución aleatoria en bloque para los tratamientos y réplicas. De este modo, en cada cuadrado se colocaron 5 cilindros con el mismo tratamiento para poder captar uno de ellos en cada campaña de muestreo ( $T_0$  a  $T_4$ ) (cilindros de sacrificio). Este diseño experimental (4 tratamientos x 5 subparcelas x 2 réplicas x 5 campañas) generó un  $n = 200$ , el cual permitió evidenciar los efectos de la exposición del coque retardado de petróleo sobre el ambiente desde una perspectiva espacial (gradiente de coque entre subparcelas) y temporal (dinámicas estacionales), durante un periodo de 13 meses.

## **2.1 Estudio de la actividad biológica y bioquímica del suelo.**

### **2.1.1 Respiración edáfica**

Se evaluó a lo largo de 6 semanas. Para lograr esto, se incubaron en recipientes cerrados de vidrio de 250 mL, alícuotas de 50 g del suelo, proveniente tanto de los cilindros de control/crecimiento, como de los de exclusión con las mezclas suelo-coque retardado (0 %, 30 %, 60 % y 100 %). Una trampa de 10 mL de NaOH (0,5 M) se colocó en cada recipiente, con el propósito de atrapar todo el  $\text{CO}_2$  liberado. Cada 5 días,



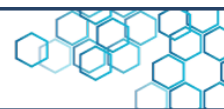
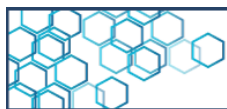
se cuantificó la liberación de  $\text{CO}_2$ , titulando el exceso de álcali con una solución de HCl al 0,5 M.

### 2.1.2 Actividad de la enzima $\beta$ -glucosidasa.

El método está basado en la determinación del p-nitrofenol liberado después de incubar la muestra de suelo con una solución de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido. La actividad de la  $\beta$ -glucosidasa se determinó en una alícuota de 1 g de suelo fresco proveniente de los cilindros de control/crecimiento, incubado por 1 h a 37 °C, usando p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido como sustrato [3]. Al final del período de incubación, se añadió  $\text{CaCl}_2$  al 0,5 M y NaOH al 0,5 M. En el sobrenadante resultante, se determinó la concentración de p-nitrofenol en  $\mu\text{g (p-NF) g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

### 2.1.3 Actividad de la enzima fluoresceína diacetato (FDA)

Se tomó 1 g de suelo fresco proveniente de los cilindros de control/crecimiento, el cual se incubó por 30 min a 37 °C, con un sustrato cuya composición fue de 0,1 mL de FDA + 4 mL de una solución buffer de fosfato de sodio pH = 7,6 [4]. Al final del período de incubación, las muestras fueron extraídas con acetona y determinada colorimétricamente. El producto final de la fluoresceína se expresó en  $\mu\text{g fluoresceína g}^{-1} \text{ h}$ .



### 2.1.4 Actividad de la enzima deshidrogenasa

La actividad de la deshidrogenasa se determinó usando cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) como sustrato en alícuotas de suelo fresco (1 g) proveniente de los cilindros de control/crecimiento, incubados por 24 h a 37 °C [5]. Luego de la incubación, las muestras fueron extraídas con metanol, para determinar colorimétricamente al trifenilformasan (TPF), en  $\mu\text{g (TPF) g}^{-1} 24 \text{ h}^{-1}$ , como producto final.

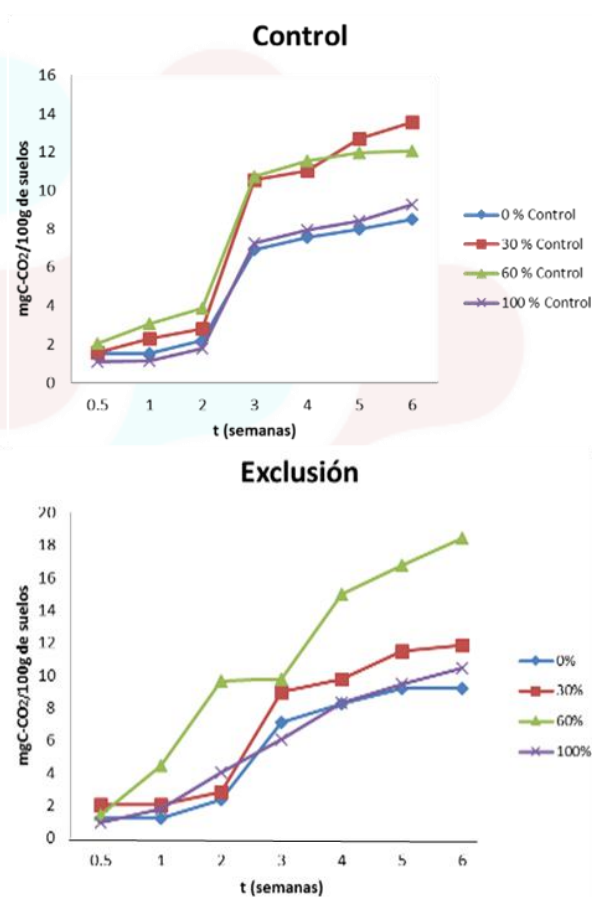
### 2.1.5 Actividad de la enzima fosfatasa ácida.

Se determinó usando p-nitrofenilfosfato como sustrato en incubaciones de suelo fresco (1 g), a 37 °C, durante 30 min [6]. Al final del período de incubación se añadió  $\text{CaCl}_2$  al 0,5 M y una solución de NaOH 0,5 M. En el sobrenadante resultante, se determinó la concentración de p-nitrofenol en  $\mu\text{g (p-NF) g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ .

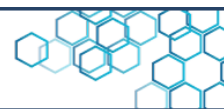
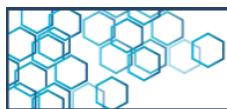
## 3. Discusión de resultados

En la Figura 1, se presenta la emisión de  $\text{CO}_2$  del suelo en las mezclas con coque retardado de petróleo, estas combinaciones mostraron un incremento progresivo, a lo largo del periodo de estudio, en ambas condiciones (control/crecimiento y exclusión). También, se observó un

incremento progresivo en la liberación de  $\text{CO}_2$ , en las mezclas de 30 % y 60 %. En cambio, en el caso del tratamiento con 100 % de coque retardado de petróleo, la respiración mostró valores por debajo del observado para el suelo sin coque retardado de petróleo (0 %), demostrando que a concentraciones de 30 % y 60 %, se puede esperar una respuesta de los microorganismos a la fracción de carbono lábil.

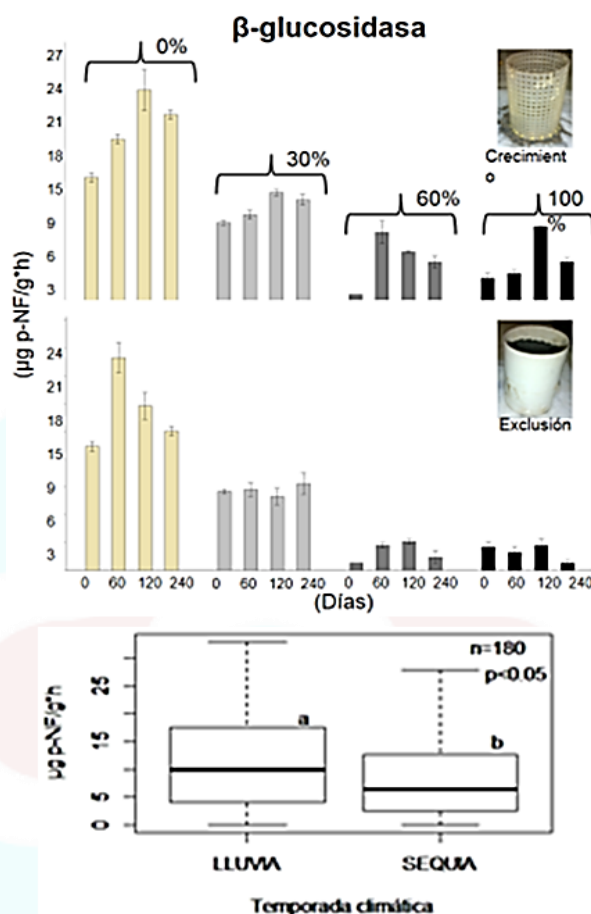


**Figura 1.** Efecto de la adición de coque retardado de petróleo en la liberación de  $\text{CO}_2$  durante 6 semanas de incubación tratamiento control y exclusión



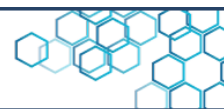
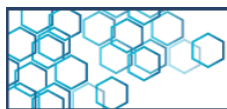
La respiración del suelo es un buen índice de la actividad microbiana y da una idea de la cantidad de sustrato presente que es fácilmente mineralizable [4]. Es probable que, en este estudio, la adición de coque retardado de petróleo condujera a un incremento en una fracción de carbono que pudiese estar siendo aprovechada por los microorganismos del suelo, induciendo con ello a un incremento en la actividad metabólica microbiana. Otra explicación, es que el estrés causado por la adición de coque retardado de petróleo traiga consigo un incremento en la respiración de los microorganismos. Se ha indicado que, con factores estresantes, como altas temperaturas y escasa humedad, los microorganismos deben mantener su maquinaria oxidativa en un nivel alto para obtener energía, de manera que incrementa la pérdida de carbono en forma de  $\text{CO}_2$  [7]. Esto se correlaciona con las medidas de  $\text{CO}_2$  obtenidas, en las que al incrementar la concentración de coque retardado de petróleo (30 % y 60 %), se observa una repuesta en la emisión de  $\text{CO}_2$ . Los resultados mostrados en la Figura 1 corresponden al tiempo ( $t_0$ ), cuando se realizó el montaje de campo en los cilindros. Luego de seis semanas de incubación para la condición de crecimiento, se observaron variaciones en la liberación de  $\text{CO}_2$ , resultando la mayor emisión en las mezclas con coque retardado de petróleo al 30 % y 60 %, cuando se compararon con el tratamiento control.

En la Figura 2, se observa el efecto de las diferentes concentraciones de coque (0 %, 30 %, 60 % y 100 %) sobre la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa. La actividad de esta enzima se reduce significativamente ( $p < 0,01$ ) al aumentar la concentración de coque en el suelo. Sin embargo, se observó actividad aún en presencia de 100 % de coque retardado a los 390 días.



**Figura 2.** Efecto de las diferentes concentraciones de coque retardado de petróleo y de la estacionalidad en la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa

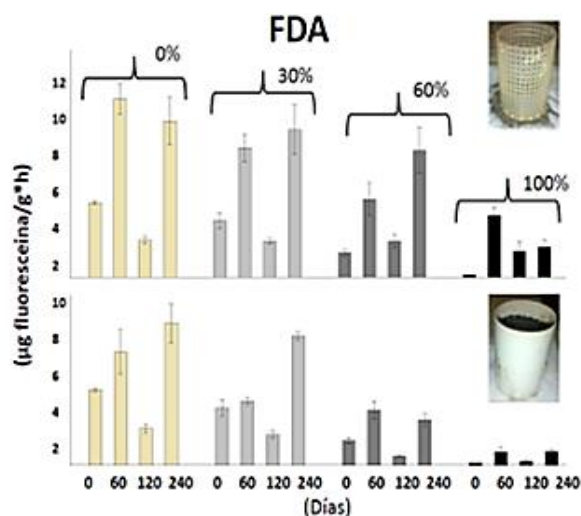
El comportamiento de la  $\beta$ -glucosidasa, en relación a la estacionalidad, mostró diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), siendo la estación lluviosa donde se reportó la mayor actividad. Esto debido a que mejoran las condiciones hídricas de los suelos y a su vez, induce un incremento en la cantidad de microorganismos. En relación al diseño experimental, en las condiciones de control/crecimiento y exclusión, se utilizaron cilindros abiertos, induciendo una mayor concentración de



microorganismos asociados a las raíces. En la Figura 2, también se observó que la actividad de la  $\beta$ -glucosidasa, en cada uno de los muestreos realizados durante 390 días ( $t_1 = 60$ ,  $t_2 = 90$ ,  $t_3 = 270$  y  $t_4 = 390$  días), solo se observan diferencias significativas ( $p < 0,05$ ), para los tiempos  $t_2$  y  $t_4$ . Las enzimas glucosidasas se encuentran prácticamente, en todos los ámbitos de la vida, pero están íntimamente relacionadas con el ciclo del carbono en los ecosistemas. Los microorganismos son una de las principales fuentes de enzimas en el suelo, en el que desempeñan un papel importante, por su relación con la evolución, y procesos degradativos de la materia orgánica y con los ciclos de elementos como el nitrógeno, el fósforo, el carbono y el azufre.

En las bacterias y las células procariotas, se encuentran tanto en forma de enzimas intracelulares como extracelulares. Adicionalmente, están muy involucradas en el proceso de adquisición de carbono, que al inicio del experimento, en los tratamientos de 30 %, 60 % y 100 % de coque retardado de petróleo, no condujeron a un patrón definido en la actividad enzimática y biológica del suelo. Los efectos sobre estos parámetros han sido observados a largo plazo. Por ejemplo, se encontró que los hidrocarburos, en general, tienen un efecto inhibitorio sobre la respiración microbiana [8].

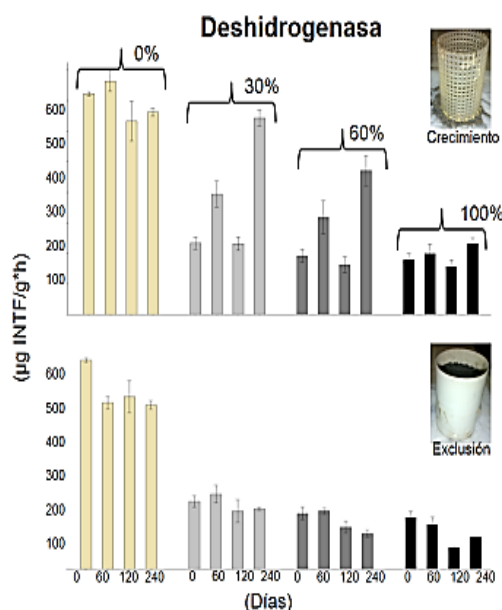
En la Figura 3, se muestra el comportamiento de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA) en presencia de diferentes concentraciones de coque retardado de petróleo (0 %, 30 %, 60 % y 100 %), en suelos de sabana y bajo condiciones de control/crecimiento.



**Figura 3.** Efecto de las diferentes concentraciones de coque retardado de petróleo y de la estacionalidad en la actividad de las hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA)

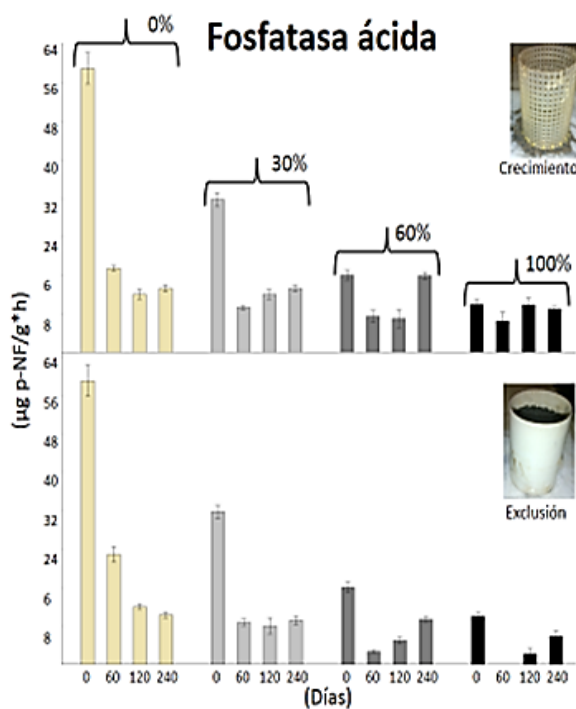
Los resultados muestran que, al aumentar la concentración de coque retardado, hay un efecto inhibitorio de la actividad de la enzima para concentraciones altas de coque retardado ( $p < 0,01$ ). Entre los tratamientos de 0 % y 30 %, no se observó diferencia significativa. Sin embargo, a concentraciones de 60 % y 100 %, se observó una disminución progresiva de la actividad, demostrando que en estas concentraciones hay un efecto sobre la microbiota del suelo, disminuyendo su actividad biológica. Estudios previos indican que la evaluación de la hidrólisis del diacetato de fluoresceína (FDA), es un método ampliamente utilizado para evaluar cambios en la actividad microbiana del suelo, provocados por el efecto de pesticidas y otros contaminantes [4].

En la Figura 4, se observa la actividad de las deshidrogenasas, donde, al aumentar la concentración de coque, disminuye la actividad de la enzima, indicando que el coque presente en los cilindros mezclados con el suelo, tiene un efecto sobre las poblaciones microbianas presentes. Estas, particularmente son oxidativas intracelulares, que transfieren grupos hidruro a partir de un sustrato a un aceptor, tal como  $\text{NAD}^+$ . Se consideran, generalmente, sustrato específicas, desempeñando un rol clave en el proceso de descomposición, en particular, para las bacterias, que generalmente son los consumidores y mineralizadores de compuestos aromáticos. Dado que no se acumulan, su actividad es considerada representativa de la biomasa presente en el suelo.



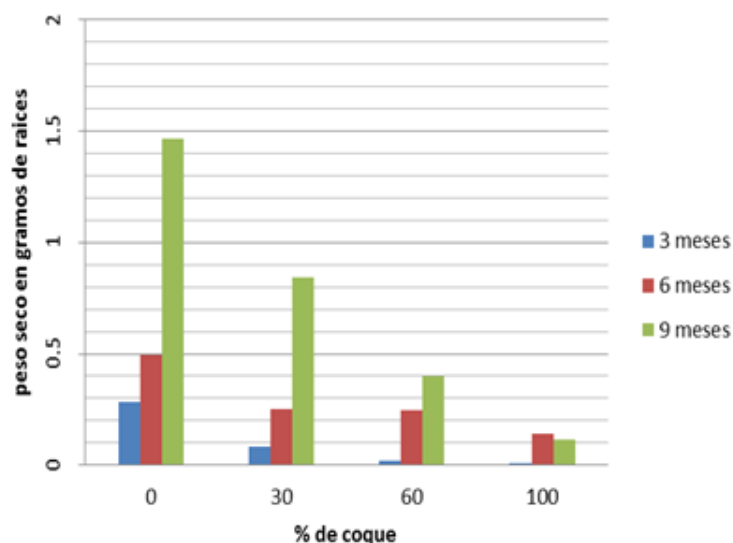
**Figura 4.** Efecto de las diferentes concentraciones de coque sobre la deshidrogenasa en el tiempo y los cilindros de crecimiento y exclusión

La respiración microbiana como las actividades enzimáticas no se inhibieron totalmente, demostrando que aún en estas condiciones extremas, la comunidad microbiana es capaz de adaptarse y mantener su metabolismo. Estos resultados, en escala de campo a largo plazo, complementan estudios realizados en el país en condiciones de laboratorio e invernadero, lo cual permite el establecimiento de criterios integrales para el manejo y la gestión ambiental del coque retardado de petróleo. En la Figura 5 se muestra que la actividad de la fosfatasa ácida, presentó la misma tendencia que las otras enzimas, donde se observó que al aumentar la concentración de coque disminuye la actividad de dicha enzima.



**Figura 5.** Representación gráfica del comportamiento de la actividad de la fosfatasa ácida respecto a t (días), obtenidas al medir en los tratamientos crecimiento/control, durante 240 días

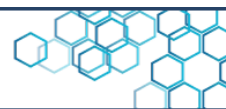
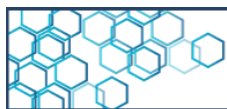
En la Figura 6 se muestra la disminución en la cantidad de raíces con el aumento de la concentración de coque respecto al tiempo, lo que evidencia un efecto negativo en el suelo, retardando el crecimiento radical de las raíces presentes en el suelo.



**Figura 6.** Representación gráfica del peso seco en gramos de raíces respecto al % de coque, para  $t = 3, 6$  y 9 meses.

## 4. Conclusiones

Las actividades enzimáticas mostraron una disminución en función del aumento del coque en las mezclas, siendo más marcado en la  $\beta$ -glucosidasa, la deshidrogenasa, FDA y la fosfatasa, demostrando que no hubo diferencias significativas entre el tratamiento de 0 % y 30 % de coque retardado de petróleo. En general, se confirma que aún en los



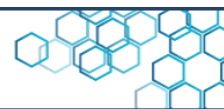
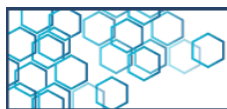
tratamientos con 100 % de coque retardado, tanto la respiración microbiana como las actividades enzimáticas no se inhibieron totalmente, demostrando que incluso bajo condiciones extremas, la comunidad microbiana es capaz de adaptarse y mantener su metabolismo. Estos resultados en escala de campo a largo plazo complementan estudios realizados en el país en condiciones de laboratorio e invernadero, lo cual permite el establecimiento de criterios integrales para el manejo y la gestión ambiental del coque retardado de petróleo.

### **Agradecimientos**

Al señor José Luis Vallés, por su invaluable ayuda en los trabajos de campo.

### **5. Referencias**

- [1] Dick W, Tabatabai M. Significance and Potential Uses of Soil Enzymes. Soil microbial ecology: applications in agricultural and environmental management. 1993;95:127.
- [2] Dezzee N, Flores S, Zambrano-Martínez S, Rodgers L, Ochoa E. Estructura y composición florística de bosques secos y sabanas en los Llanos Orientales del Orinoco, Venezuela. INCI . 2008 Oct; 33( 10 ): 730-740. [http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0378-18442008001000007&lng=es](http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-18442008001000007&lng=es).



- [3] Casida LE Jr, Klein DA, Santoro T. Soil dehydrogenase activity. *Soil Sci.* 1964;98(6):371-6. <http://dx.doi.org/10.1097/00010694-196412000-00004>.
- [4] Schnürer J, Rosswall T. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982;43(6):1256-61. <http://dx.doi.org/10.1128/aem.43.6.1256-1261.1982>.
- [5] Eivazi F, Tabatabai MA. Glucosidases and galactosidases in soils. *Soil Biol. Biochem.* 1988;20(5):601-6. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(88\)90141-1](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(88)90141-1).
- [6] Tabatabai MA, Bremner JM. Use of p-nitrophenyl phosphate for assay of soil phosphatase activity. *Soil. Biol. Biochem.* 1969;1(4):301-7. [http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717\(69\)90012-1](http://dx.doi.org/10.1016/0038-0717(69)90012-1).
- [7] Buchmann N. Biotic and abiotic factors controlling soil respiration rates in *Picea abies* stands. *Soil. Biol. Biochem.* 2000;32(11-12):1625-35. [http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717\(00\)00077-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0038-0717(00)00077-8).
- [8] Labud V, García C, Hernández T. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere.* 2007;66(10):1863-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>