

## INFLUENCIA DE LA CONTAMINACION DE SUELOS CON HIDRO-CARBUROS SOBRE SU CALIDAD BIOQUIMICA

M. QUEVEDO DIOSES, T. HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ, C. GARCÍA IZQUIERDO

Departamento de Conservación de Suelos y Manejo de Residuos Orgánicos. Centro de Edafología y Biología Aplicada Segura, CEBAS-CSIC. Campus Espinardo 30100 Murcia-España. E-mail: recsuelo@cebas.csic.es

**Abstract.** Two soils, with different amounts of organic matter were contaminated with two different products derived from petroleum (fuel oil and mineral oil). We investigated the influence of these pollutants on the biochemical activity of the soil, measured through several enzymatic activities such as the oxidoreductases (dehydrogenase) and hydrolases (protease,  $\beta$ -glucosidase and fosfatase). The experiment was carried out in a period of 60 days, and testing different doses (2,5%, 5% and 10% fuel oil) and (2,5% and 5% mineral oil).

In general, we found that the enzymatic activities studied were higher in the soils with high content of organic matter. The results show that these biochemical parameters that depend on microbial populations, were very influenced by the content of organic matter. The negative effects of the hydrocarbons on the biochemical activity of the soils, was influenced by the type of contaminant and by the doses. Fuel-oil influence more negatively on the dehydrogenase activity of the soil where it was added than of mineral oil. The different physical structure of the both hydrocarbons contaminants is without doubt responsible of this behaviour.

**Key words:** Contaminated soil, Hydrocarbon, Enzymatic activity, Organic matter

**Resumen.** Dos suelos con diferente contenido en materia orgánica fueron contaminados con dos productos derivados del petróleo (gasoil y aceite mineral). Nuestro objetivo fue determinar la influencia de estos compuestos contaminantes sobre la actividad bioquímica de los suelos, medida a través de diversas actividades enzimáticas tales como las oxidoreductasas (deshidrogenasa) e hidrolasas (proteasa,  $\beta$ -glucosidasa y fosfatasa). El experimento se llevó a cabo en laboratorio, manteniendo los suelos contaminados en incubación durante un periodo de 60 días, y ensayando diferentes dosis (2,5%, 5% y 10% gasoil) y (2,5% y 5% aceite mineral).

En general, diremos que las actividades enzimáticas estudiadas mantienen valores mucho más elevados en los suelos con alto valor de materia orgánica. Este hecho demuestra que todos aquellos parámetros (como las actividades enzimáticas), en los que intervienen poblaciones microbianas, son dependientes del contenido de materia orgánica del suelo. También podemos señalar que se observó en muchos casos, un efecto negativo de los hidrocarburos sobre la actividad bioquímica de los suelos. Dicho efecto se ve claramente influenciado tanto por el tipo de contaminante, como por la dosis y por el contenido en materia orgánica de los suelos. Como ejemplo diremos que cuando el suelo con bajo contenido de mate-

ria orgánica es contaminado con aceite mineral, aumenta el contenido de algunas de las enzimas hidrolasas. El gasoil incide más negativamente sobre la actividad deshidrogenasa de los suelos donde se incorpora que el aceite mineral; la diferente estructura física de los hidrocarburos que incorporan ambos contaminantes es sin duda responsable de este hecho.

**Palabras Claves:** Suelo contaminado, Hidrocarburos, Actividad enzimática, Materia orgánica.

## INTRODUCCIÓN

Un recurso natural que en los últimos años se está viendo amenazado por procesos no deseables, es el suelo (Albaladejo y Diaz, 1990; García *et al.*, 2000). En condiciones naturales el suelo tiende a un estado de equilibrio, manteniendo una calidad adecuada; sin embargo, la entrada en el mismo de xenobióticos puede alterar dicho equilibrio, evitando que el suelo realice entonces sus funciones de una manera adecuada (Ortiz Silla, 1990).

Cuando sobre un suelo se desarrollan fenómenos de contaminación, uno de los aspectos que se puede ver afectado en primer lugar es la actividad microbiana del mismo, clave para mantener una adecuada calidad en ese suelo. Este hecho es importante si pensamos que dicha actividad microbiana será la encargada de intentar descontaminar ese suelo, puesto que algunos microorganismos pueden usar como sustrato al carbono contenido en el propio contaminante orgánico. Quizás es de mayor interés conocer las actividades de los microorganismos que se desarrollan en el medio, que no cuales son estos microorganismos (Nannipieri *et al.*, 1990). En este sentido, el estudio de actividades enzimáticas tiene una gran relevancia. Las enzimas son catalizadores biológicos de innumerables reacciones del suelo. Las enzimas del suelo son similares a las de otros sistemas y las reacciones que catalizan son dependientes de multitud de factores tales como pH, temperatura, presencia o ausencia de inhibidores (contaminantes), etc. (Burns, 1978).

Químicamente, las enzimas son proteínas compuestas de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos en cadenas llamadas polipéptidos. La función de las enzimas, como catalizadores que son, es la de acelerar una reacción (al disminuir la energía de activación), hasta hacerla casi instantánea.

Diversas actividades enzimáticas se han utilizado como bioindicadores de procesos de degradación y contaminación de suelos (Moreno *et al.*, 2002), e incluso de su rehabilitación cuando se produce (García *et al.*, 1997). La monitorización de actividades enzimáticas oxidorreductasas (deshidrogenasa) e hidrolasas (proteasa, fosfatasa y,  $\beta$ -glucosidasa) sobre suelos con diferente nivel de materia orgánica se ha considerado útil, con objeto de conocer también la incidencia de dicha materia orgánica sobre el efecto de los xenobióticos empleados como contaminantes. Cuando los suelos son contaminados con derivados del petróleo, compuestos aromáticos tales como benceno, tolueno, fenol y etilbenceno (comúnmente componentes del petróleo), podrían actuar como desinfectantes cuando están presentes en la fase líquida, fomentando quizás el crecimiento microbiano (Gibson, 1971), e incidiendo entonces sobre algunas actividades enzimáticas. Los diferentes aditivos que pueden estar presentes en los productos refinados de petróleo también parecen tener efecto sobre la persistencia de esos productos en los suelos (Frankenberger, 1982). Como se indicó anteriormente, el estudio de algunas hidrolasas implicadas en los ciclos de elementos importantes en el suelo es fundamental para conocer la actividad específi-

ca de los microorganismos y su adaptación frente a condiciones concretas, como en nuestro caso puede ser la introducción en el suelo de diferentes hidrocarburos.

Sabemos que en el caso de algunos contaminantes como los hidrocarburos derivados del petróleo, los microorganismos presentes en el suelo poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo la degradación de dichos hidrocarburos (Schroeder *et al.*, 1999). Sin embargo, nosotros dentro del estudio que estamos llevando a cabo, no nos hemos planteado determinar aquellas enzimas que permiten esa degradación (oxigenasas, por ejemplo), sino que planteamos como OBJETIVO principal, conocer la influencia que tiene sobre algunos parámetros indicativos de la actividad bioquímica, y en suelos con diferente contenido de materia orgánica, la entrada de dos derivados del petróleo industriales (gasoil y aceite mineral).

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Material

**Suelos.** Los suelos empleados en nuestro experimento han sido dos, procedentes del SE de España (Región de Murcia), y con diferente nivel de materia orgánica: i) Suelo con escaso valor de dicha materia orgánica, como corresponde a suelo típico de zonas mediterráneas españolas con clima semiárido, calizo y pobre en nutrientes, abandonado después de haber sido explotado por agricultura intensiva, y con una muy escasa cubierta vegetal; ii) Suelo con elevado contenido en materia orgánica, no sometido a acción antrópica en los últimos 50 años, con una vegetación actual de pino (*Pinus halepensis* Mill.). Las características generales de ambos suelos pueden observarse en la Tabla 1.

**Contaminantes derivados del petróleo.** Se escogieron, dos derivados del petróleo de naturaleza industrial, los cuales pueden llegar a los suelos a través de diversas vías

TABLA 1: Características de los suelos incluidos en el experimento.

<i>Característica</i>	<i>Parámetros</i>	<i>Suelo de bajo nivel Materia Orgánica</i>	<i>Suelo de alto nivel Materia Orgánica</i>
<i>Físico-Químicas</i>	pH	7,5	7,2
	Conduct. Eléct.(dS/m)	0,29	0,14
	Carbonato Cálcico %	55,46	48,65
	Materia orgánica %	0,80	6,0
	Nitrógeno (mg kg <sup>-1</sup> )	3,00	10,1
	Fósforo (mg kg <sup>-1</sup> )	3,13	7,2
	Textura	Arcillosa	Franca
<i>Bioquímicas</i>	Actividad Deshidrogenasa <sup>1</sup>	42	131
	Actividad Proteasa <sup>2</sup>	0,32	3,33
	Actividad β-glucosidasa <sup>3</sup>	29	74
	Actividad Fosfatasa <sup>4</sup>	58	86

<sup>1</sup> Unidades de μg INTF g<sup>-1</sup>

<sup>2</sup> Unidades de μmol NH<sub>4</sub><sup>+</sup> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

<sup>3</sup> Unidades de μmol p-nitrophenyl-β-D-glucopiranoside (p-NP) g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

<sup>4</sup> Unidades de μmol p-nitrophenyl phosphate (p-NP) g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>

(accidentalmente, pérdidas en las canalizaciones de los productos citados, etc...); además de ello, dichos derivados se han escogido debido a su diferente contenido en los tipos de compuestos carbonados que los componen (el gasoil dispone de moléculas con átomos de carbono comprendidos entre C<sub>15</sub>-C<sub>25</sub>, mientras que el aceite mineral, los contiene algo más pesados C<sub>25</sub>-C<sub>35</sub>, además de disponer de una mayor cantidad de algunos metales pesados).

### Diseño experimental

Las muestras de suelos fueron extraídas de la capa superficial (0-20 cm). El experimento de incubación a nivel microcosmos, se realizó de la siguiente manera: 250 g de cada tipo de suelo, homogenizado y tamizado con malla de 2 mm, se introdujeron en contenedores de plásticos de 300 g de capacidad. Se establecieron un total de 6 tratamientos diferentes: Suelo Control, sin adición de contaminante; 5 tratamientos contaminados artificialmente con Gasoil y Aceite mineral. Las dosis establecidas fueron para Gasoil 2,5% (como dosis baja, pero con capacidad para influir sobre el suelo); dosis media, 5,0%; y dosis elevada, 10%. Para el Aceite mineral se eligieron dos dosis: 2,5% y 5,0%. Las muestras se colocaron a temperatura ambiente, con luz solar y humedecidas al 60% de su capacidad de retención hídrica; dicha humedad se mantuvo a lo largo del experimento. Los contenedores se cerraron con tapaderas convenientemente agujereadas, necesarias para permitir la aireación, así como para impedir la pérdida de humedad. Se establecieron tres repeticiones por tratamiento y 4 períodos de incubación: 0 días (muestreo a las 3-4 horas de la adición del contaminante), 10, 30 y 60 días respectivamente. Las muestras se mantuvieron a 4°C hasta su análisis.

### Métodos de Análisis

La Actividad Deshidrogenasa se determinó por el método de García *et al.* (1993);

a 1 g de suelo se le adicionan 0,2 ml de 2-p-iodofenil-3-p-nitrofenil-5-fenil (INT) como aceptor de electrones, manteniéndose durante 20 horas a 22° C en oscuridad, para producir la formación de iodonitrofenil formazano (INTF), midiendo a continuación dicho compuesto resultante en espectrofotómetro. La Actividad Proteasa, se realizó por el método de Nannipieri *et al.* (1980) en el cual se hidroliza la N--benzoyl-L-argininamida (BAA). La Actividad Fosfatasa se determinó por el método de Tabatabai (1994), mediante la adición a 0,5 g de suelo, de un sustrato artificial (p-nitrofenil-fosfato, PNF) y posterior evaluación colorimétrica del p-nitrofenil liberado que, en medio básico desarrolla un color amarillo. La Actividad  $\beta$ -glucosidasa, se determinó análogamente al anterior utilizando en su caso el sustrato p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucopiranosido (PNG).

### Tratamiento estadístico

Todos los tratamientos se llevaron a cabo por triplicado, para poder someter los datos obtenidos a los correspondientes análisis estadísticos. Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), con el fin de obtener la MDS (Menor diferencia significativa) para cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De forma general, y para los dos suelos estudiados, las actividades enzimáticas determinadas en nuestro estudio fueron más elevadas en aquel suelo con mayor contenido de materia orgánica (Tablas 2, 3, 4 y 5). Este hecho no es sorprendente si tenemos en cuenta que es precisamente dicha materia orgánica la que actúa en el suelo como fuente de biomasa microbiana, la cual es susceptible de mineralizarse y provocar la aparición de sustratos capaces de activar la síntesis enzimática. El suelo abandonado, con escasa

cubierta vegetal, no tiene prácticamente entradas de materia orgánica, por lo que la mineralización de aquella materia autóctona será muy escasa, generando así pocos sustratos, y suscitando por tanto una escasa actividad enzimática (García *et al.*, 2000). Por el contrario, el suelo con elevada cantidad de materia orgánica dispone de una vegetación (suelos de bosques de *Pinus halepensis* L.), la cual se someterá a continuos procesos de mineralización y humificación, originando sustratos capaces de activar la síntesis enzimática; además, los propios exudados radicales pueden constituir sustratos para ello.

### Actividad deshidrogenasa

La oxidación biológica de compuestos orgánicos se realiza generalmente mediante procesos de deshidrogenación, y se lleva a cabo por enzimas denominadas deshidrogenasas. La actividad deshidrogenasa de los suelos viene determinada por diferentes sistemas deshidrogenasas, los cuales se caracterizan por presentar una alta especificidad

de sustratos. Estos sistemas son parte integral de los microorganismos, por lo que la medida de actividad deshidrogenasa ha sido usada para evaluar la actividad microbiológica general, aunque esto ha sido criticado por diferentes autores. Así Benefield *et al.*, (1977) indicaron que la actividad deshidrogenasa no es un parámetro exacto para determinar el flujo de electrones con la velocidad de liberación de O<sub>2</sub> debido a que el aceptor de electrones usado en la determinación de esta actividad (los más frecuentes son el TTC o INT) es menos efectivo que el aceptor natural (oxígeno). De cualquier modo, García *et al.* (1997) encontraron que la actividad deshidrogenasa es un buen índice del *status* de la actividad microbiana en áreas semiáridas del mediterráneo.

La adición de contaminantes orgánicos (hidrocarburos) a nuestros suelos en estudio, influyó negativamente y de manera inmediata sobre la actividad deshidrogenasa, y por tanto, sobre los procesos microbianos generales del suelo (Tabla 2).

TABLA 2: Valores de la Actividad Deshidrogenasa ( $\mu\text{g INTF g}^{-1}$ ).

	SUELO CON ALTO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA					SUELO CON BAJO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA				
	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS
<i>Control</i>	131	131	194	124	27	42	43	72	58	11
<i>2,5% Gasoil</i>	100	156	152	76	19	25	44	49	35	12
<i>5,0% Gasoil</i>	126	143	114	92	26	12	53	49	41	10
<i>10 % Gasoil</i>	115	135	101	84	22	6	27	36	26	10
<i>2,5% Aceite</i>	75	107	136	148	7	22	29	48	38	8
<i>5,0% Aceite</i>	27	93	191	147	20	12	34	36	37	9
<b>** MDS</b>	<b>24</b>	<b>19</b>	<b>23</b>	<b>26</b>		<b>9</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	

\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

\*\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de muestreo, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

Cuando el suelo tiene un contenido elevado en materia orgánica, al inicio de incorporar los hidrocarburos al suelo, es el aceite mineral el que incide más negativamente que el gasoil sobre la actividad deshidrogenasa del suelo. Este hecho puede deberse tanto a los aditivos que dichos aceites minerales incorporan (metales pesados, por ejemplo), como a los hidrocarburos más pesados que contienen, en comparación con el gasoil. Sin embargo, conforme aumenta el tiempo de permanencia de dicho aceite mineral en el suelo, la actividad deshidrogenasa aumenta, indicando que las poblaciones microbianas han conseguido sobreponerse al tóxico. Podemos indicar que posiblemente, los propios cadáveres de microorganismos que no sobrevivieron al tóxico inicialmente, pueden servir de alimento energético posterior, y ello hace que la actividad microbiana general experimente un aumento, detectado en nuestro caso por la actividad deshidrogenasa.

El efecto de estos contaminantes, sobre la actividad deshidrogenasa del suelo con menor contenido en materia orgánica, no es igual (Tabla 2). Inicialmente, al igual que antes, se observó un efecto inhibitorio sobre esta actividad enzimática, pero ya a los 10 días, dicha actividad comenzó a recuperarse. Puede ocurrir, como ya indicamos, que los cadáveres de los microorganismos muertos inicialmente actúen como incentivo para el posterior aumento de la actividad microbiana; pero tampoco es descartable que las poblaciones microbianas resistentes a la contaminación puedan comenzar a degradar hidrocarburos y los acepten como sustrato, y ello eleve los contenidos de actividad deshidrogenasa. Frankenberg (1982) estableció que la adición de inhibidores de oxidación a combustibles como los empleados por nosotros impide la utilización microbiana de hidrocarburos como fuente de carbono y energía; sin embargo, debemos señalar que en su estudio, actuaban con dosis de conta-

minante mucho más elevadas que las nuestras, y ese puede ser el motivo del diferente comportamiento.

### **Actividad Proteasa hidrolizante de la BAA**

La proteasa interviene en las reacciones de hidrólisis de proteínas y péptidos a amino, por lo que está involucrada en el ciclo del nitrógeno. Las actividades de los diferentes tipos de proteasas presentes en el suelo pueden ser determinadas de manera selectiva según el sustrato utilizado y las condiciones de la técnica que se emplee en su determinación (Ladd y Paul, 1973). En nuestro caso, la determinación de la actividad proteasa realizada es la que hidroliza la N- $\alpha$ -benzoil-L-argininamida (BAA), la cual usa como sustratos péptidos sencillos, que son los fragmentos más cortos procedentes de la hidrólisis de las grandes cadenas de proteínas, la cual puede a su vez estar catalizada por otras proteasas. Es una de las actividades enzimáticas más susceptibles a desaparecer del medio; de ahí nuestro interés en conocer si una elevada concentración de hidrocarburos en el suelo influye sobre la síntesis de la enzima.

En el suelo con elevado valor de materia orgánica, la introducción de hidrocarburos perjudica a la actividad proteasa, apreciándose dicho efecto negativo a lo largo de todo el experimento de incubación (Tabla 3). La evolución de la enzima en ese tiempo fue escasa, poniendo de manifiesto que las poblaciones microbianas encargadas de su síntesis no se recuperan con el tiempo de residencia del tóxico en el suelo. No se observó en este tipo de suelo una incidencia mayor cuando el hidrocarburo aumenta su dosis, quizás porque las dosis mínimas son suficientes para alterar suficientemente el comportamiento de las poblaciones microbianas capaces de sintetizar proteasa.

En el suelo de menor contenido en materia orgánica, el comportamiento de la

TABLA 3: Valores de la Actividad Proteasa ( $\mu\text{mol NH}_4^+ \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$ ).

	SUELO CON ALTO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA					SUELO CON BAJO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA				
	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS
<i>Control</i>	3,33	4,63	4,33	4,83	<b>0,37</b>	0,32	0,28	0,25	0,25	<b>0,03</b>
<i>2,5% Gasoil</i>	2,97	3,17	3,43	3,07	<b>0,59</b>	0,25	0,13	0,18	0,16	<b>0,05</b>
<i>5,0% Gasoil</i>	3,00	4,20	3,27	3,17	<b>0,46</b>	0,32	0,15	0,19	0,16	<b>0,04</b>
<i>10 % Gasoil</i>	2,93	4,23	2,83	3,00	<b>0,28</b>	0,46	0,30	0,19	0,13	<b>0,04</b>
<i>2,5% Aceite</i>	3,03	3,33	2,77	2,53	<b>0,55</b>	0,32	0,30	0,30	0,28	<b>0,06</b>
<i>5,0% Aceite</i>	2,50	3,00	2,80	3,33	<b>0,64</b>	0,43	0,26	0,52	0,43	<b>0,07</b>
<b>** MDS</b>	<b>0,50</b>	<b>0,48</b>	<b>0,43</b>	<b>0,46</b>		<b>0,07</b>	<b>0,04</b>	<b>0,05</b>	<b>0,03</b>	

\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

\*\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de muestreo, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

enzima fue bastante similar, si bien en el momento inicial, algunas dosis elevadas de hidrocarburos generaron un aumento de la mencionada actividad (Tabla 3). Es posible que algunos componentes de dichos hidrocarburos puedan actuar como sustrato para la enzima, haciendo aumentar su actividad.

#### Actividad $\beta$ -Glucosidasa

La actividad  $\beta$ -glucosidasa es una hidrolasa que interviene en el ciclo del carbono y actúa en la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ -glucósidos de las grandes cadenas de carbohidratos para dar glucosa. La hidrólisis de estos sustratos juega un papel muy importante en la obtención de energía para los microorganismos del suelo (Eivazi y Zakaria, 1993). Estos mismos investigadores demostraron que esta enzima podía ser inhibida por la presencia de metales pesados, compuestos tóxicos, etc.

La tabla 4 mostró dinámicas diferentes en los dos tipos de suelos estudiados, en

función asimismo del tipo de hidrocarburo empleado.

Inicialmente (a los 0 días) en el suelo con elevado valor de materia orgánica, la introducción de los hidrocarburos influyó negativamente en esta enzima solo cuando se incorpora aceite mineral, y en el caso del gasoil, cuanto la dosis es máxima (10%). Sin embargo, a los 10 días de permanencia de esos hidrocarburos en el suelo, la actividad,  $\beta$ -glucosidasa superó en casi todos los suelos contaminados a los valores determinados en el suelo control; volvemos a señalar que los cadáveres de microorganismos aportados al suelo por la muerte inicial de algunas poblaciones, puede colaborar en dicho aumento. Con el transcurso del tiempo de residencia de los hidrocarburos en el suelo, vuelve a ponerse de manifiesto su efecto negativo sobre esta actividad enzimática, en particular con la dosis elevada de gasoil (10%).

En el suelo con bajo valor de materia orgánica, el comportamiento de los dos

TABLA 4: Valores de Actividad ,  $\beta$ -glucosidasa ( $\mu\text{mol } p\text{-nitrophenyl-}\beta\text{-D-glucopiranosido}(p\text{-NP}) \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

	SUELO CON ALTO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA					SUELO CON BAJO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA				
	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS
<i>Control</i>	74	83	88	98	17	29	18	18	14	4
<i>2,5% Gasoil</i>	74	77	86	79	17	22	17	15	11	4
<i>5,0% Gasoil</i>	76	103	72	77	21	24	16	15	14	4
<i>10 % Gasoil</i>	55	100	64	69	13	23	16	16	19	4
<i>2,5% Aceite</i>	40	100	92	86	13	23	23	32	28	7
<i>5,0% Aceite</i>	40	101	77	92	16	45	43	30	38	11
<b>** MDS</b>	<b>10</b>	<b>19</b>	<b>18</b>	<b>14</b>		<b>7</b>	<b>7</b>	<b>3</b>	<b>5</b>	

\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

\*\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de muestreo, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

hidrocarburos introducidos fue muy diferente (Tabla 4). El aceite mineral contribuyó a un aumento de actividad,  $\beta$ -glucosidasa; consideramos que posiblemente este producto ofrece la posibilidad de algún tipo de sustrato capaz de activar dicha síntesis, en mayor medida que en el suelo con elevado valor de materia orgánica. No olvidemos que cuanto menor es el contenido en materia orgánica, menos fenómenos de adsorción del contaminante sobre dicha materia orgánica se podrán dar, y por tanto, el contaminante estará más biodisponible.

### Actividad fosfatasa

La fosfatasa es una hidrolasa que activa la transformación de fósforo orgánico en inorgánico, haciéndolo por tanto asimilable para las plantas. De ahí la gran importancia de esta enzima en suelo. La presencia de la enzima fosfatasa en suelos tiene un origen microbiano, aunque en muchas ocasiones es temporal y se pierde con rapidez (Ros,

2000). La presencia de contaminantes en el suelo pueden afectar negativamente a la medida de la actividad fosfatasa, ya que pueden interferir con la reacción de complejación del sustrato, combinación con el grupo activo de la enzima, o bien por reacción con el complejo enzima-sustrato (Juma y Tabatabai, 1978; Reddy *et al.*, 1987).

En el suelo con elevado valor de materia orgánica, inicialmente existió un efecto negativo sobre la actividad fosfatasa cuando el gasoil se introdujo en el suelo (Tabla 5) siendo el efecto más acusado con la dosis más elevada de gasoil, pero cuando lo que introducimos es aceite mineral, el valor de dicha actividad aumenta respecto al suelo control. Posiblemente en este producto existan sustratos capaces de activar esta enzima. Sin embargo cuando aumentó el tiempo de permanencia del contaminante en el suelo, se observó un descenso de actividad la microbiana, indicativo de que el ciclo del P se ve perjudicado.



TABLA 5: Valores de la Actividad Fosfatasa ( $\mu\text{mol } p\text{-nitrophenyl phosphate } (p\text{-NP}) \text{ g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )

	SUELO CON ALTO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA					SUELO CON BAJO NIVEL DE MATERIA ORGÁNICA				
	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS	0 días	10 días	30 días	60 días	*MDS
<i>Control</i>	86	74	120	125	<b>11</b>	59	49	44	47	<b>12</b>
<i>2,5% Gasoil</i>	71	47	73	80	<b>15</b>	29	36	39	36	<b>8</b>
<i>5,0% Gasoil</i>	75	43	65	76	<b>8</b>	9	31	42	32	<b>9</b>
<i>10 % Gasoil</i>	66	37	51	63	<b>9</b>	3	28	34	30	<b>7</b>
<i>2,5% Aceite</i>	91	59	106	73	<b>15</b>	19	43	141	148	<b>17</b>
<i>5,0% Aceite</i>	133	80	91	65	<b>11</b>	19	79	182	170	<b>15</b>
<b>** MDS</b>	<b>13</b>	<b>6</b>	<b>12</b>	<b>12</b>		<b>8</b>	<b>10</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	

\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) para cada tratamiento a lo largo del tiempo de incubación, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

\*\* MDS= Menor diferencia significativa ( $p < 0,05$ ) entre los diferentes tratamientos para cada tiempo de muestreo, según el Test de Rango Múltiple de Fisher al 95% de nivel de confianza.

Si el suelo no dispone de elevado contenido en materia orgánica (Tabla 5), la actividad fosfatasa se ve inhibida en los suelos con hidrocarburos, pero conforme aumenta el tiempo de residencia de dichos hidrocarburos, los suelos con aceite mineral aumenta ostensiblemente la mencionada actividad fosfatasa. Posiblemente, después de un periodo de aclimatación, las poblaciones microbianas pueden aceptar como sustratos a los hidrocarburos adicionados, y ello favorece la síntesis de dicha enzima.

## CONCLUSIONES

La contaminación de suelos con hidrocarburos, afecta negativamente a la actividad microbiana del suelo en general, y de forma específica a diversas actividades enzimáticas implicadas en el ciclo biogeoquímico. El tipo de hidrocarburo que se introduce en el suelo (gasoil y aceite mineral en nuestro caso) parece ser más incidente en los efectos sobre la actividad bioquí-

mica de los suelos que las diferentes dosis de hidrocarburos ensayadas. El gasoil incide más negativamente que el aceite mineral sobre la actividad fosfatasa.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores, manifiestan su agradecimiento a la Organización de la Fundación Séneca por financiar la beca predoctoral a la Srta. Quevedo, para llevar acabo este trabajo.

## REFERENCIAS

Albadalejo, J. y Díaz, E. 1990. Degradación y regeneración del suelo en el mediterráneo español: experiencias en el proyecto Lucdeme. En: J. Albadalejo, M. A. Stocking y E. Díaz (Eds.) *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*, CSIC, Madrid: 191-214.

- Benefield, P.F., Howard, P.J. y Howard, D.M. (1977): The estimation of dehydrogenase activity in soil. *Soil Biol. and Bioch.* 9, 67-70.
- Burns, R. (1978): Enzyme activity in soil: location possible role in microbial activity. *Soil Biol. and Bioch.* 14, 423-427.
- Eivazi, F. y Zakaria, A. 1993.  $\beta$ -glucosidase activity in soils amended with sewage sludge. *Ecosystem and Environment*, 43:155-161.
- Frankenberger, W.T. (1982): Influence of Crude Oil and Refined Petroleum Products on Soil Dehydrogenase Activity. *J. Environ. Qual.* 11, 602-607.
- García, C., Hernández, T., Costa, F., Ceccanti, B. y Masciandaro, G. (1993): The dehydrogenase activity of soils an ecological marker in processes of perturbed system regeneration. En: *J. F. Gallardo (Ed.) XI International Symposium of Environmental Biogeochemistry*, Salamanca.
- García, C., Hernández, T., Costa, F. (1994): Microbial Activity in Soils under Mediterranean Environmental Conditions. *Soil Biol. and Bioch.* 26, 1185-1191.
- García, C., Hernández, T., Roldan, A. (1997): Changes in Microbial activity after abandoned of cultivation in a semiarid mediterranean environment. *Journal of Environmental Quality.* 26, 285-291.
- García, C., Hernández, T., Pascual, J., Moreno, J. L. y Ros, M. 2000. Actividad microbiana en suelos del sureste español sometidos a procesos de degradación y desertificación. Estrategias para su rehabilitación. En: C. García y T. Hernández (Eds.). *Investigación y Perspectivas de la enzimología de suelos en España*. Tipografía San Francisco S.A. España: 43-92.
- Gibson, D. (1971): The microbial oxidation of aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Microbiol.* 1, 199-223.
- Juma, N. J. y Tabatabai, M. A. 1978. Distribution of phosphomonoesterases in soil. *Soil Science.* 126:101-108.
- Ladd, J. (1978): Origin and range of enzymes in soil. En R.G. Burns (Eds.) *Soil enzymes*. Academic Press Inc., New York. 51-42.
- Ladd, J. N. y Paul, E. A. 1973. Changes in enzymic activity and distribution of acid-soluble, amino acid-nitrogen in soil during nitrogen immobilization and mineralization. *Soil Biol. and Bioch.* 5:825-840.
- Moreno, J.L., Pérez, A., Aliaga, A., y Hernández M. T. 2002. The Ecological Dose of nickel in a semiarid soil amended with sewage sludge related to the unamended soil. *Water, Air, and Soil Pollution.* 143:289-300.
- Nannipieri, P., Greco, S., Ceccanti, B. (1990): Ecological significance of the biological activity in soil. En: Bollag, J. M. and Stotzky, G. (Eds.) *Soil Biochemistry*, vol 6. Marcel Dekker, New York.
- Ortiz, S. (1990): Mecanismos y Procesos de Degradación del Suelo con especial referencia a las condiciones ambientales mediterráneas. En: J. Albadalejo, M. A. Stocking y E. Díaz (Eds.) *Soil Degradation and Rehabilitation in Mediterranean Environmental Conditions*, CEBAS-CSIC, Madrid.
- Ros, M. 2000. Recuperación de suelos agrícolas abandonados mediante el reciclaje en los mismos de residuos orgánicos de origen urbano. Tesis Doctoral, Universidad de Murcia-España.
- Reddy, G.B., Faza, A. y Bennet, R. 1987. Activities of enzymes in rizosphere and non-rizosphere soils amended with sludge. *Soil Biology and Biochemistry*, 23:112-145.
- Salinitro, J., Dorn, P., y Huesemann, M. (1997): Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity

- Assesment. *Environ. Science Techn.* 31, 1769-1776.
- Skujins, J. (1967): Extracellular enzymes in soil. *Critical Review of Microbiology.* 4, 383-421.
- Skujins, J. (1978): History of abiotic soil enzyme research. En: R.G.Burns (Eds.) *Soil enzymes.* Academic Press Inc., New York. 1-49.
- Schroeder, E.D., Eweis, J.B., Ergas, S. J. y Chang, D. 1990. Biodegradación de Hidrocarburos. En: Schroeder, E.D., Eweis, J.B., Ergas, S.J y Chang, D. (Eds.) *Principios de Biorecuperación (Bioremediación)*, Mc Graw-Hill Companies, Spain: p: 132.
- Stevenson, I. (1959): Dehydrogenase activity in soils. *Can. J. Microbiol.* 5, 229-235.
- Tabatabai, M.A. (1994): Soil enzymes. En: *Methods of Soil Analysis. Part 2. Microbiological and Biochemical properties.* S.M Mickelson and J.M.