

TOLERANCIA Y CAPACIDAD DE FITORREMEDIACIÓN DE COMBUSTÓLEO EN EL SUELO POR SEIS ESPECIES VEGETALES

Wendy SANGABRIEL¹, Ronald FERRERA-CERRATO⁴, Dora TREJO-AGUILAR¹,
María Remedios MENDOZA-LÓPEZ², J. Samuel CRUZ-SÁNCHEZ², Carlos LÓPEZ-ORTIZ³,
Julián DELGADILLO-MARTÍNEZ⁴ y Alejandro ALARCÓN^{4*}

¹Facultad de Agronomía. Universidad Veracruzana s/n. Lomas del Estadio. Xalapa 91090 Veracruz

²Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA). Institutos de Investigación. Universidad Veracruzana. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial Ánimas. Xalapa 91190 Veracruz

³Facultad de Ingeniería Química y Ambiental, Universidad Veracruzana. Lomas del Estadio. Xalapa 91090 Veracruz

⁴Microbiología de Suelos. Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo. Carretera México-Texcoco km 36.6. Montecillo 56230 Estado de México. C.P. *Correo electrónico: alexala@colpos.mx. Tel: (595) 952 0200 ext. 1280, Fax: (595) 952 0287

(Recibido mayo 2006, aceptado septiembre 2006)

Palabras clave: selección, leguminosas, pastos, rizósfera, contaminantes orgánicos

RESUMEN

Se hizo un estudio en invernadero para evaluar la tolerancia y el crecimiento de tres especies de leguminosas (*Clitoria ternatea*, *Phaseolus coccineus*, *Cicer arietinum*) y tres gramíneas (*Brachiaria* híbrido, *Brachiaria brizantha* y *Panicum maximum*) en suelo contaminado con combustóleo, así como su capacidad de reducir el contenido de hidrocarburos provenientes del mismo. Se sembraron semillas en el suelo no contaminado y en el suelo colectado de la comunidad Frijol Colorado, Veracruz, que fue contaminada por un derrame accidental de combustóleo (50,000 mg kg⁻¹). A los 90 días, se evaluó la tolerancia, crecimiento, la población microbiana en la rizósfera y la degradación de combustóleo. *Phaseolus coccineus* fue la única leguminosa con tolerancia y crecimiento en suelo contaminado; mientras que las tres gramíneas no fueron afectadas negativamente por la presencia del contaminante, aunque el híbrido de *Brachiaria* mostró mayor crecimiento. La población rizosférica de bacterias y hongos fue diferencialmente afectada por la presencia del contaminante en combinación con la planta. Sin embargo, la rizósfera de *P. coccineus* presentó mayor población microbiana en el suelo contaminado en comparación con las plantas restantes. La degradación de combustóleo evaluada cualitativamente por GC-MS, fue mayor en la rizósfera de *B. brizantha* y *P. maximum*. En contraste *P. coccineus* presentó una degradación similar a la observada en suelo contaminado sin planta.

Key words: screening, grass species, legume species, rhizosphere, organic contaminants

ABSTRACT

A greenhouse experiment was conducted to evaluate the tolerance and growth of three legume species (*Clitoria ternatea*, *Phaseolus coccineus*, and *Cicer arietinum*) and three grass species (*Brachiaria* hybrid, *Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum*)

to fuel oil-contaminated soil, and to evaluate their ability to diminish the content of total hydrocarbons from fuel oil. Seeds were sowed in non-contaminated and contaminated soil with fuel oil (50,000 mg kg⁻¹) by an accidental spill, and collected from Frijol Colorado, Veracruz. After 90 days, plant tolerance and growth, rhizosphere microbial population, and fuel oil-degradation were evaluated. *Phaseolus coccineus* was the only legume that tolerated and grew up in contaminated soil; in contrast, the three grass species were not negatively affected by the fuel-oil in soil, though *Brachiaria* hybrid showed higher growth. Rhizosphere bacterial and fungal populations were differentially affected by the presence of the contaminant in combination with the plant. However, highest microbial population was quantified in the *P. coccineus* rhizosphere at contaminated soil when compared to the other plants. Fuel oil-degradation qualitatively measured via GC-MS, was greater at the *B. brizantha* and *P. maximum* rhizosphere. In contrast, *P. coccineus* showed similar fuel oil-degradation to that observed at non-planted contaminated soil.

INTRODUCCIÓN

En México y otros países, algunos suelos agrícolas muestran alteraciones en sus propiedades físicas, químicas y biológicas causadas por la contaminación con hidrocarburos derivados del petróleo (Anderson *et al.* 1993, Bregnard *et al.* 1996, Saval 1997, Zavala-Cruz *et al.* 2005). Tan solo en el estado de Veracruz durante el año 2002 (PROFEPA 2003), se reportaron 41 emergencias ambientales asociadas con materiales peligrosos en los que se incluyen hidrocarburos (55 %), elementos alcalinotérreos (9 %), ácidos (9 %), alcoholes (9 %) y otros (18 %). Uno de los hidrocarburos que potencialmente pueden llegar a contaminar el suelo por accidentes ocurridos durante la conducción y el transporte, es el combustóleo, conocido también como “fuel oil” No. 6. Este combustible es elaborado a partir de productos residuales que se obtienen de los procesos de refinación del petróleo crudo y está diseñado para usarse especialmente en hornos, secadores y calderas, así como para calentadores (unidades de calefacción) y en plantas de generación de energía eléctrica. Este combustible está constituido por una mezcla compleja y variable de alcanos, alquenos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos; además contiene porcentajes bajos de compuestos que contienen azufre y nitrógeno (Philip *et al.* 1984).

La contaminación de suelo y agua con hidrocarburos derivados del petróleo es un problema que se ha extendido como resultado de derrames de contenedores, rupturas en tuberías subterráneas y varios procesos industriales (Leahy y Colwell 1990, O'Rourke y Connolly 2003). El efecto negativo que producen los hidrocarburos en las plantas es de dos tipos (1) por contacto directo, lo que provoca la des-

integración de la membrana de la célula y muerte de la misma, reduce el intercambio gaseoso, provoca clorosis e inhibe la germinación de la semilla (Baker 1970, Prado *et al.* 1999) y 2) de manera indirecta mediante la alteración de las condiciones físicas y la fertilidad del suelo.

La limpieza de suelo contaminado presenta muchas dificultades. En la actualidad existe gran número de técnicas *ex situ* e *in situ* empleadas como alternativas de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tales como la excavación, incineración, lavado de suelo, entre otras, las cuales pueden ser muy costosas. Las plantas pueden ayudar a limpiar o estabilizar un contaminante en el suelo si la concentración de éste no es fitotóxica (Cunningham *et al.* 1996). La interacción raíz-microorganismo contribuye significativamente en la reducción, remoción, degradación o estabilización de contaminantes. De esta forma, la fitorremediación constituye una estrategia menos costosa y ambientalmente amigable para sanear suelos contaminados con hidrocarburos (Cunningham *et al.* 1996).

Los mecanismos y la eficiencia de la fitorremediación dependen del tipo de contaminante, de la diversidad microbiana y de las propiedades del suelo (Cunningham y Ow 1996). La habilidad de las plantas para crecer y establecerse en suelos contaminados es una característica de selección para su uso en la fitorremediación. La degradación de contaminantes en suelos plantados con *Festuca arundinacea*, *Sorghum bicolor*, *Vigna sinensis*, *Medicago sativa* y *Juncus roemerianus* ha sido mayor cuando se compara con suelos sin vegetación (Schwab y Banks 1994, Lin y Mendelssohn 1998, Wiltse *et al.* 1998, Hutchinson *et al.* 2001).

La fitorremediación de suelos contaminados con

hidrocarburos del petróleo se basa principalmente en la biodegradación llevada a cabo en la rizósfera (Frick *et al.* 1999), por lo que el sistema radical de la planta es un elemento importante. Las plantas y sus raíces pueden influenciar indirectamente la degradación mediante la alteración de las condiciones físicas y químicas del suelo (Cunningham *et al.* 1996). En muchos estudios, gramíneas y leguminosas han sido seleccionadas por su potencial para favorecer la disminución de los contaminantes (Aprill y Sims 1990, Gunther *et al.* 1996, Reilley *et al.* 1996, Qiu *et al.* 1997). El sistema radical de las gramíneas es extenso y fibroso, lo que les permite tener mayor área de superficie de raíz por metro cúbico de suelo que ninguna otra especie de planta y pueden penetrar el suelo a una profundidad de hasta 3 m (Aprill y Sims 1990). Las leguminosas por su parte, son consideradas para la fitorremediación debido a su habilidad para fijar nitrógeno, por lo que no compiten con otros microorganismos y plantas por el limitado suministro de nitrógeno disponible en sitios contaminados (Gudin y Syrratt 1975).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la tolerancia y la capacidad de fitorremediación de tres especies de leguminosas (*Clitoria ternatea*, *Phaseolus coccineus* y *Cicer arietinum*) y de tres especies de gramíneas (*Brachiaria* híbrido, *Brachiaria brizantha* y *Panicum maximum*), de un suelo contaminado con combustóleo por un derrame accidental.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección de suelo

Se utilizó suelo contaminado con combustóleo a una concentración aproximada de 50,000 mg kg⁻¹ procedente de la localidad de Frijol Colorado, Veracruz. El área afectada por el derrame fue de aproximadamente 100 m². Las coordenadas del sitio de recolección del suelo son 19°35'16" latitud y 97°21'06" longitud; una altitud de 2410 msnm, la temperatura media anual correspondiente fue de 12 °C, la precipitación media anual de 493.6 mm y el tipo de clima frío-seco-regular. El suelo se caracterizó por presentar pH 6.6, así como 0.1 % N, 25 µg g⁻¹ P Olsen, 2.1 % de materia orgánica, y textura franca. Se recolectaron muestras de suelo de la zona contaminada (20-30 cm de profundidad) y se mezclaron homogéneamente formando una muestra compuesta. También, en la misma área muestreada, se recolectó una muestra de suelo adyacente no contaminado y cultivado con maíz, el cual presentó características similares en textura y pH. El método de muestreo del suelo

tanto contaminado como no-contaminado fue en zig-zag de acuerdo con Paetz y Wilke (2005).

Establecimiento del experimento

Se hizo bajo condiciones de invernadero con temperatura máxima/mínima de 23.5/11.9 °C y humedad relativa promedio de 63/71 %. El suelo tanto contaminado (SC) como no-contaminado (SNC), fue tamizado (2 mm) y colocado en recipientes de vidrio ámbar de 300 g de capacidad. En cada recipiente se sembraron tres semillas de seis especies vegetales, correspondientes a tres especies de leguminosas: *Clitoria ternatea* L., *Phaseolus coccineus* L. y *Cicer arietinum* L., y tres especies de gramíneas: *Brachiaria* híbrido pasto mulato (*B. riziensis* 44-6 X *B. brizantha* cv. Marandu), *B. brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf. y *Panicum maximum* Jacq. Cada recipiente fue irrigado frecuentemente con agua destilada. Unidades experimentales sin planta (testigos) con SC y SNC fueron incluidos para evaluar el efecto de biorremediación.

Evaluación del crecimiento de las plantas

Se evaluó la altura de las plantas cada siete días, empezando a los 15 días hasta los 85 días después de la germinación de las semillas. A los 90 días, se evaluó el volumen radical mediante el método del volumen desplazado en probeta y el peso seco de la planta mediante la colecta de cada órgano de la planta y su exposición a 70 °C en estufa durante 72 horas.

Estudio microbiológico de la rizósfera

A los 90 días, se evaluó la población de bacterias y hongos rizosféricos tanto totales como degradadores de hidrocarburos. Para la cuantificación de microorganismos se utilizó el método de dilución y de cuenta viable de unidades formadoras de colonias (UFC) crecidas en su respectivo medio de cultivo en caja de Petri (Ingraham e Ingraham 1998). Para la evaluación de bacterias totales se utilizó agar nutritivo (Baker®) y para hongos totales se utilizó papa-dextrosa agar de (PDA, Baker®). Además, para cuantificar las poblaciones de bacterias y hongos tolerantes a la presencia de petróleo, se utilizó medio mineral (por litro: 0.8 g K₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.06 g CaCl₂, 0.1 g NaCl, 0.025 Na₂MoO₄·2H₂O, 0.28 NaFe-EDTA, 5 ¼g biotina y 10 ¼g ácido *p*-aminobenzoico; pH 7) en presencia de petróleo crudo como fuente de carbono (Hernández 1997). El petróleo se aplicó en papel filtro embebido y adherido en el interior de la contratapa de la caja de Petri. Las cajas de Petri fueron incubadas a 25 °C de 24 a 72 horas, depen-

diendo del crecimiento microbiano en cada medio de cultivo.

Eficiencia de la degradación de combustóleo en el suelo rizosférico

La degradación de combustóleo se determinó a los 90 días, mediante la extracción y la cuantificación de compuestos del combustóleo tanto de muestras iniciales (tiempo cero) como de muestras de suelo colectadas de cada tratamiento al final del experimento. La extracción de hidrocarburos a partir de muestras de suelo rizosférico se realizó con diclorometano mediante agitación mecánica (Schwab *et al.* 1999), utilizando el método modificado EPA 8270B SW-846 (USEPA 1986, Louchouart *et al.* 2000). Los extractos fueron concentrados mediante evaporación del solvente, colectando una alícuota final de 1 mL, para su posterior análisis cualitativo.

Análisis mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas

Los extractos fueron analizados mediante GC-MS utilizando un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard GCD PLUS G1800-B y una columna capilar HP-5 (5 %-fenil)-metilpolisiloxano (30 m, 0.25 mm i.d., 0.25 μ m de grosor). La temperatura del inyector fue de 250 °C y la del detector de 280 °C, se utilizó gas helio como acarreador (1.0 mL min⁻¹). La temperatura de la columna fue inicialmente ajustada a 70 °C (4.0 min) e incrementada a 190 °C a una tasa de 20 °C min⁻¹, para posteriormente ser llevada a 250 °C a 10 °C min⁻¹ y finalmente alcanzó los 280 °C a 30 °C min⁻¹ y mantenida por 10 min. Cada componente fue identificado con base en sus tiempos de retención y la comparación de sus espectros de masa a 70 eV con aquellos contenidos en la biblioteca del HP-Chemstation-NIST MS, versión A.00.00-1995. Se procedió a realizar el análisis cualitativo de los principales compuestos del combustóleo, por lo que más adelante se presentan los cromatogramas del GC-MS para mostrar la degradación de los hidrocarburos provenientes del combustóleo por efecto de la rizósfera de las plantas.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento factorial 6 x 2, incluyó 12 tratamientos con ocho repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los factores considerados fueron presencia de combustóleo en el suelo (suelo contaminado con 50,000 mg kg⁻¹ y suelo sin contaminar) y especie vegetal establecida. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y la prueba de compara-

ción de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) con el programa estadístico SAS (SAS Institute 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del suelo contaminado en la supervivencia y desarrollo de las plantas

En el caso de las leguminosas, todas las plantas de *Clitoria ternatea* (Clt) y *C. arietinum* (Car) en SC murieron entre los 42 y los 56 días. Sin embargo, *P. coccineus* (Pcocc) fue la única especie que mostró tolerancia a la presencia del combustóleo, observándose un 50 % de supervivencia al finalizar el experimento a los 90 días. Por tal razón, sólo se hará alusión a esta especie para compararla con las gramíneas en todas las variables mencionadas a continuación, aunque las unidades experimentales de Clt y Car se mantuvieron hasta el final del experimento, con los residuos de la respectiva planta, para realizar el análisis de la degradación del combustóleo.

La dinámica de crecimiento en altura de Pcocc establecida en SNC mostró diferencias significativas (Tukey, $\alpha=0.05$) al compararse con las plantas de esta misma especie establecidas en SC (**Fig. 1a**). En general, la presencia de combustóleo en el SC produjo la disminución de la altura de las plantas. Las tres especies de gramíneas presentaron mayor tolerancia a la presencia del contaminante, observándose 100 % de supervivencia a los 90 días. De acuerdo con la altura de las plantas (**Fig. 1b**), la especie más susceptible al SC fue *P. maximum* (Pmax), mientras que la especie *Brachiaria* híbrido (Bhib) y *B. brizantha* (Bbriz) presentaron mayor tolerancia al contaminante, ambas con altura semejante, pero significativamente diferente (Tukey, $\alpha=0.05$) a la observada en plantas en SNC.

A los 90 días, el efecto de la planta, condición del suelo y tratamiento fue diferencialmente significativo para la mayoría de las variables de crecimiento de las plantas (**Cuadro I**). Pcocc en SNC mostró significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayor altura, volumen radical, mayor peso seco de la raíz y de la parte aérea, pero menor relación raíz: parte aérea en comparación con las demás especies tanto en SC como en SNC (**Cuadro I**).

En el caso de las gramíneas, Pmax en SC presentó significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) menor altura, volumen radical, pesos secos de raíz y de parte aérea (**Cuadro I**). Las dos especies de *Brachiaria* presentaron estadísticamente similar respuesta en todas las variables de crecimiento tanto en SNC como en SC (**Cuadro I**).

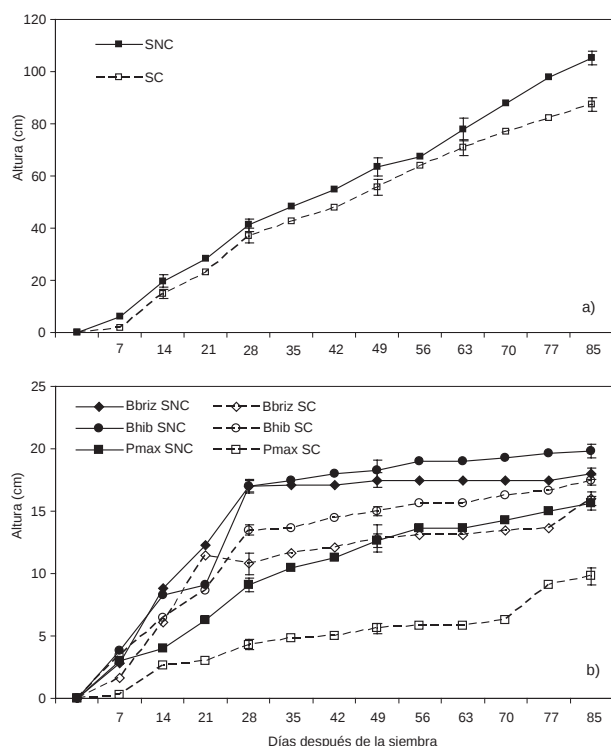


Fig. 1. Dinámica de crecimiento de: a) *Phaseolus coccineus* y b) tres especies de gramíneas crecidas en suelo contaminado y no contaminado. SNC= Suelo no-contaminado (Símbolos cerrados), SC=Suelo contaminado (Símbolos abiertos); Bbriz=*Brachiaria brizantha*, Bhib=*Brachiaria* híbrido, Pmax=*Panicum maximum*. n=8. Medias ± error estándar

En lo que respecta al peso seco total, Pcocc tanto en SNC como en SC, presentó mayor biomasa que

las tres gramíneas (**Fig. 2**). Por su parte, Bhib aunque no estadísticamente diferente, presentó mayor acumulación de biomasa seca en SC en comparación con Bbriz (**Fig. 2**). Pmax fue la especie que presentó menor acumulación de biomasa en SNC y ésta fue significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) reducida cuando se estableció en SC (**Fig. 2**).

Las seis especies presentaron diferencias en la tolerancia a la toxicidad del combustóleo en el suelo. Las leguminosas presentaron mayor susceptibilidad al suelo contaminado mientras que las gramíneas tuvieron mayor tolerancia. El efecto negativo de los hidrocarburos en el suelo sobre el crecimiento de las leguminosas ha sido previamente demostrado para las especies *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum* y *Stylosanthes capitata* que murieron entre los 42 y los 56 días al estar expuestas a petróleo crudo a una concentración de 50,000 mg kg⁻¹ (Merkl *et al.* 2005b), concentración similar a la evaluada en el presente experimento. Este efecto denota la susceptibilidad de las leguminosas para crecer y desarrollarse a esta concentración de combustóleo en el suelo. Estas leguminosas pueden ser utilizadas como bioindicadoras de contaminación de suelos con combustóleo como ha sido mencionado por Malallah *et al.* (1996), sobre todo cuando en estos se encuentran concentraciones superiores a los 50,000 mg kg⁻¹. No obstante, Pcocc presentó mayor biomasa producida en comparación con las gramíneas. En esta planta, la presencia del combustóleo estimuló no significativamente, el peso seco total comparado con su testigo en SNC. Al respecto, ciertas concentraciones de hidrocarburos del petróleo pueden estimular

CUADRO I. CRECIMIENTO DE PLANTAS ESTABLECIDAS EN SUELO NO-CONTAMINADO O CONTAMINADO CON COMBUSTÓLEO (50,000 mg kg⁻¹) DESPUÉS DE 90 DÍAS

Planta	Condición del suelo	Altura (cm)	Volumen radical (cm ³)	Peso seco (g)		Raíz: parte aérea (g g ⁻¹)
				Parte aérea	Raíz	
<i>Phaseolus coccineus</i>	Sin contaminar	105.4 a ^x	2.16 a	1.79 a	0.71 ab	0.41 b
	Contaminado	87.5 b	1.07 bc	1.86 a	0.94 a	0.54 b
<i>Bachiaria</i> híbrido	Sin contaminar	19.7 c	2.43 a	0.82 b	0.34 cde	0.43 b
	Contaminado	17.6 c	1.67 ab	0.69 b	0.41 cd	0.58 ab
<i>Brachiaria brizantha</i>	Sin contaminar	18.3 c	1.83 ab	0.83 b	0.60 bc	0.72 a
	Contaminado	15.8 cd	2.07 a	0.55 bc	0.30 de	0.55 ab
<i>Panicum maximum</i>	Sin contaminar	15.7 cd	0.53 cd	0.35 bc	0.14 ef	0.41 b
	Contaminado	9.8 d	0.18 d	0.07 c	0.04 f	0.57 ab
Significancia:						
Planta		0.01	0.001	0.01	0.001	0.01
Condición del suelo		0.001	0.001	NS	NS	0.05
Planta:Condición del suelo		0.001	0.001	0.001	0.001	0.001

^xMedias en la misma columna con letras idénticas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). NS=No significativo, n=8

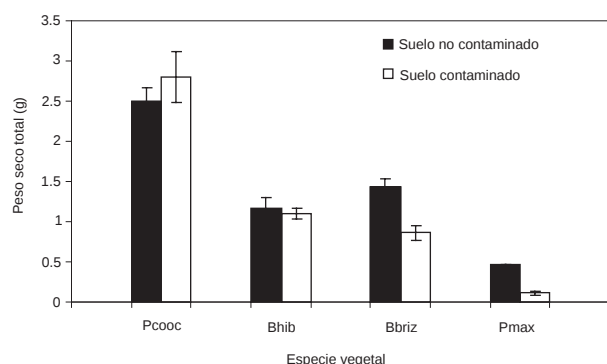


Fig. 2. Materia seca total de plantas expuestas a suelo no contaminado y contaminado, después de 90 días. Pcocc=*Phaseolus coccineus*, Bhib=*Brachiaria* híbrido, Bbriz=*Brachiaria brizantha*, Pmax=*Panicum maximum*. n=8. Barras $\pm$ error estándar

la germinación y el crecimiento de algunas plantas (Quiñones-Aguilar *et al.* 2003).

De acuerdo con la USEPA (1998), las gramíneas y leguminosas tienen cualidades morfológicas y fisiológicas que puedan ser utilizadas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Las gramíneas presentan sistemas radicales más extensos y fibrosos, en tanto que el sistema radical de las leguminosas puede desarrollarse a más profundidad y además de poder captar nitrógeno atmosférico a través de la simbiosis con *Rhizobium*. La selec-

ción de plantas para uso en fitorremediación debe contemplar su capacidad de adaptarse a las concentraciones del contaminante y a las condiciones ambientales que imperan en las regiones con problemas de contaminación (Kirk *et al.* 2002). Las especies más susceptibles fueron Clt, Car (leguminosas) y Pmax (gramínea); mientras que las plantas con mayor tolerancia fueron Pcocc, Bhib y Bbriz. La capacidad de las plantas para crecer en suelos contaminados se relaciona con aspectos morfológicos y fisiológicos de la raíz que favorecen mayor captación de agua y nutrimentos (De Jong 1980, Ilangovan y Vivekanandan 1992, Malallah *et al.* 1996, Quiñones-Aguilar *et al.* 2003, Merkl *et al.* 2005a).

Efecto del combustóleo en la población microbiana de la rizósfera

La población de bacterias totales de la rizósfera fue significativamente estimulada por la presencia de la planta ($p \leq 0.01$), la condición del suelo ($p \leq 0.05$) y la interacción de ambos factores ($p \leq 0.01$). En el caso de la respuesta de tratamientos, la rizósfera de Pcocc en SC presentó la mayor población en comparación con la población de bacterias en SC-sin planta, la cual fue significativamente menor ($p \leq 0.001$) (**Cuadro II**). En el caso de las bacterias con capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos, fueron significativamente estimuladas por efecto de la planta ($p \leq 0.001$), por la condición del suelo ($p \leq 0.01$) y por la interacción

CUADRO II. POBLACIÓN MICROBIANA (UNIDADES FORMADORAS DE COLONIAS, UFC, POR GRAMO DE SUELO SECO) EN LA RIZÓSFERA DE CUATRO ESPECIES Y SUELO SIN PLANTA EN PRESENCIA DE COMBUSTÓLEO DESPUÉS DE 90 DÍAS

Planta	Condición del suelo	Bacterias totales UFC x 10^6 g $^{-1}$	Bacterias degradadoras de hidrocarburos UFC x 10^6 g $^{-1}$	Hongos filamentosos totales UFC x 10^3 g $^{-1}$	Hongos filamentosos degradadores de hidrocarburos UFC x 10^3 g $^{-1}$
<i>Phaseolus coccineus</i>	Sin contaminar	17.6 ab *	10.6 ab	16.3 ab	11.6 c
	Contaminado	27.0 a	16.6 a	18.3 a	15.0 abc
<i>Bachiaria híbrido</i>	Sin contaminar	14.0 b	2.3 cd	14.0 ab	15.3 abc
	Contaminado	12.6 b	10.0 ab	10.3 b	13.0 bc
<i>Brachiaria brizantha</i>	Sin contaminar	18.3 ab	12.0 ab	18.6 a	21.3 a
	Contaminado	15.0 b	12.3 ab	20.3 a	12.3 c
<i>Panicum maximum</i>	Sin contaminar	16.0 b	10.0 ab	17.0 ab	20.6 ab
	Contaminado	14.0 b	8.06 bc	15.0 ab	12.6 c
Suelo sin planta	Sin contaminar	1.0 c	1.0 d	10.6 b	13.0 c
	Contaminado	14.3 b	10.0 ab	10.3 b	12.6 c
Significancia:					
Planta		0.01	0.001	0.001	0.05
Condición del suelo		0.05	0.001	NS	0.01
Planta*Condición del suelo		0.001	0.001	0.001	0.001

* Medias en la misma columna con letras idénticas son estadísticamente iguales de acuerdo con la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). NS=No significativo, n=8

planta condición del suelo ($p \leq 0.01$). La población de estas bacterias fue significativamente mayor tanto en la rizósfera de Pcocc en SC como en SC-sin planta, en comparación con la población de bacterias observada para la rizósfera de las gramíneas en SC y en SNC (**Cuadro II**). En general, las poblaciones de bacterias totales y con capacidad de crecer en presencia de hidrocarburos de la rizósfera de gramíneas tanto en SNC como en SC, no mostraron diferencias estadísticas significativas (**Cuadro II**).

En el caso de hongos filamentosos, se observó un efecto significativo de la planta ($p \leq 0.001$) y del tratamiento ($p \leq 0.001$) (**Cuadro II**). Las rizósferas de Bbriz y Pcocc tanto en SC como en SNC, presentaron significativamente (Tukey, $\alpha=0.05$) mayores poblaciones de hongos en comparación con aquellas cuantificadas para SC- y SNC-sin planta y con la rizósfera de Bhíb en SC (**Cuadro II**). Aunque se observaron diferencias significativas entre tratamientos, la población de hongos filamentosos crecidos en presencia de petróleo fue en general mayor, pero no estadísticamente diferente, en la rizósfera de plantas establecidas en SNC en comparación con la rizósfera de las plantas en SC (**Cuadro II**). En este caso, la rizósfera de Pmax en SNC presentó población de hongos degradadores significativamente mayor (Tukey, $\alpha=0.05$) en comparación con la rizósfera de Pcocc en SNC y con el SC- y SNC-sin planta (**Cuadro II**).

El efecto directo de las raíces se fundamenta en la secreción de exudados que contribuyen en la proliferación de microorganismos clave para la desintoxicación y la degradación de contaminantes en el suelo (Davis *et al.* 2002). Los microorganismos son comúnmente estimulados luego de la incorporación de hidrocarburos del petróleo (Atlas 1995) y se ha demostrado que existe correlación entre el número de microorganismos y el grado de contaminación del suelo (Wyszkowska y Kucharski 2001).

Aun cuando la evaluación de microorganismos cultivables en laboratorio tiene limitaciones con respecto al bajo número de grupos capaces de crecer en estos medios, esta evaluación ha sido utilizada como una herramienta para estudiar la respuesta de microorganismos ante el contaminante y la capacidad de utilizarlo como fuente de carbono y de energía (Randall y Hemmingsen 1994, Van Hamme *et al.* 2003). En general, las bacterias son menos susceptibles a hidrocarburos del petróleo en comparación con los hongos y actinomicetos (Wyszkowska y Kucharski 2001). La variabilidad observada para bacterias y hongos filamentosos creciendo en presencia de hidrocarburos en los tratamientos cuya

mayor población fue obtenida en la rizósfera de plantas en SNC, puede explicarse en el sentido de la diversidad fenotípica de bacterias no-degradadoras, que pueden crecer en presencia de hidrocarburos sin contribuir a su degradación. Este efecto fenotípico puede sobreestimar aquellos grupos microbianos con capacidad de utilizar hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía, tal y como ha sido mencionado por Randall y Hemmingsen (1994). No obstante, los microorganismos con capacidad de crecer ante hidrocarburos del petróleo pueden participar cometabólicamente en la degradación de estos compuestos. Sin embargo, este estudio no contempló esta actividad microbiana, por lo que se recomienda la caracterización de aquellos microorganismos cuya actividad fisiológica influya en la degradación de los hidrocarburos del petróleo en el suelo.

Los microorganismos que habitan la rizósfera son diferencialmente estimulados o inhibidos en función de la actividad fisiológica y capacidad de crecimiento de la planta en presencia de contaminantes (Merkl *et al.* 2005b). La especie Pcocc favoreció en forma más consistente una población microbiana mayor en SC, lo que la convierte en una planta para realizar mayor investigación sobre fitorremediación. Similarmente, las plantas del género *Brachiaria* también beneficiaron a la población microbiana, por lo que son candidatas a ser utilizadas en la fitorremediación, como fue señalado por Merkl *et al.* (2005a,b).

Degradación de hidrocarburos en la rizósfera de las plantas

Después de 90 días no se observaron compuestos del combustóleo en las muestras de SNC (**Fig. 3c**), mientras que en el SC (**Fig. 3b**) se observó la reducción de los compuestos que integran al combustóleo con respecto al análisis de la muestra inicial (tiempo cero; **Fig. 3a**). Los resultados de CG-MS muestran la presencia de hidrocarburos monoaromáticos y policíclicos aromáticos principalmente (**Cuadro III**). Las cuatro especies que mostraron tolerancia, adaptación y crecimiento en SC, presentaron diferencias en la degradación de combustóleo (**Figs. 4b, e, f y g**). Su efecto fue selectivo en la desaparición de compuestos mono- o poliaromáticos en comparación con el SC-sin planta (**Fig. 4a**).

En lo que respecta al tipo de plantas, las gramíneas contribuyeron en la degradación de mayor número de compuestos constituyentes del combustóleo en comparación con el SC-sin planta (**Cuadro III**). La tasa de degradación de combustóleo fue mayor en las rizósferas de Bbriz y de Pmax (**Figs. 4e y g**), en comparación con el SC-sin planta (**Fig. 4a**). En

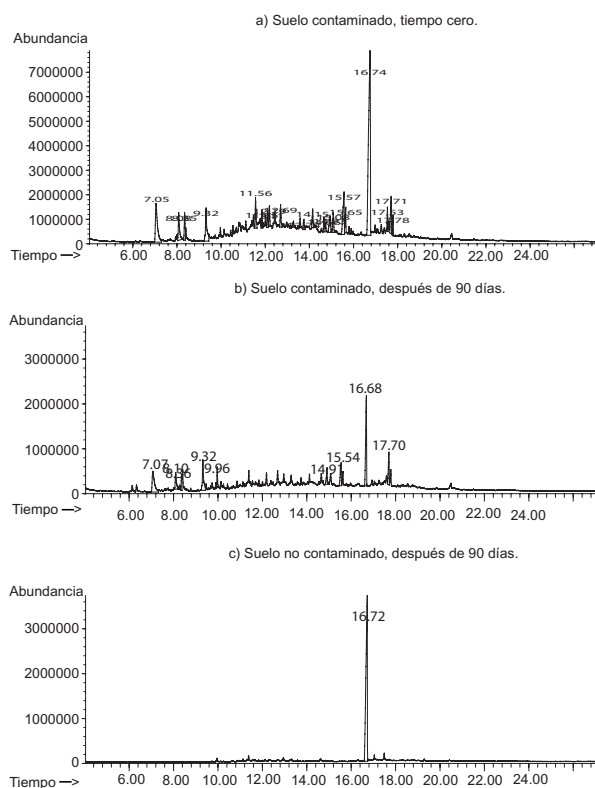


Fig. 3. Cromatograma que ilustra la presencia de contaminantes orgánicos procedentes del derrame de combustóleo en suelo contaminado a tiempo cero (a), suelo contaminado después de 90 días, con respecto al suelo no contaminado (b) utilizados en el experimento

el caso de las leguminosas, *Pcocc* contribuyó en la desaparición de solo un compuesto del combustóleo,

por lo que la degradación de combustóleo fue similar a la obtenida en SC-sin planta (**Fig. 4a-b**). Dado que fue la única especie leguminosa que se adaptó y creció en SC resulta interesante utilizar esta planta como modelo en sistemas de fitorremediación en futuras experimentaciones.

De manera interesante, los residuos de las dos leguminosas *Car* y *Cl*, que no sobrevivieron después de 40 días produjeron respectivamente la degradación de cinco y tres compuestos que integran al combustóleo (**Cuadro III**), por lo que la tasa de degradación del combustóleo fue mayor a la observada en el SC-sin planta (**Figs. 4a, c, d**). Al respecto, los residuos vegetales pueden contribuir en la estimulación de la actividad microbiana del suelo y por consiguiente, favorecer la degradación de hidrocarburos del petróleo (Miller 1996). En una investigación futura se podría dirigir al manejo de abonos verdes para estimular la fitorremediación.

La utilización de leguminosas en fitorremediación se basa en su capacidad de introducir nitrógeno atmosférico al sistema contaminado y con ello estimular mayor actividad microbiana, especialmente de microorganismos degradadores de hidrocarburos. *Pcocc* sólo presentó capacidad de crecimiento en SC y su contribución en la degradación de combustóleo en su rizósfera no fue significativa. En nuestro conocimiento, este es el primer reporte de tolerancia, adaptación, crecimiento, estimulación de la población microbiana (excepto *Rhizobium*, cuyos nódulos no fueron observados en el sistema radical) de *Pcocc* en SC. No obstante, se requiere mayor estudio para determinar los efectos benéficos de esta leguminosa

CUADRO III. PRESENCIA DE COMPUESTOS ORGÁNICOS DERIVADOS DEL COMBUSTÓLEO EN SUELO CONTAMINADO SIN PLANTA Y CON PLANTA, DESPUÉS DE 90 DÍAS

Compuesto	Tiempo de retención (minutos)	Suelo contaminado con combustóleo (% Área de la curva en el cromatograma)						
		Suelo sin planta	<i>Cicer arietinum</i>	<i>Clitoria ternatea</i>	<i>Phaseolus coccineus</i>	<i>Brachiaria hibrido</i>	<i>Brachiaria brizantha</i>	<i>Panicum maximum</i>
Acetofenona	6.33	1.95	Nd	1.95	2.02	Nd	1.69	1.60
2, 4, 6-Trimetilfenol	8.10	5.12	3.34	4.03	4.72	3.00	5.30	3.72
Eteniltiobenceno	8.36	3.28	2.64	4.54	3.87	2.32	2.91	3.55
3,4-Dimetiltiofenol	9.32	10.16	7.31	12.07	11.25	6.75	9.42	7.83
Hidroxitolueno butilado	10.14	1.15	Nd	1.52	1.09	Nd	1.13	Nd
9,9-Dimetil-9-silafluoreno	11.34	1.04	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
(E)-Estilbeno	11.55	1.34	Nd	Nd	0.81	Nd	Nd	Nd
1,2-Dihidro-1-fenilnaftaleno	12.19	2.67	1.45	3.14	2.87	1.56	2.87	2.96
1-Fenilnaftaleno	12.69	2.72	1.99	3.31	2.61	1.68	2.55	2.68
9-Metil-9H-fluoreno	13.74	1.66	Nd	Nd	1.17	Nd	Nd	Nd
1-Metil-2-fenil-1H-indol	17.70	6.52	5.09	8.20	6.07	5.47	5.89	5.41
5'-Fenil-1,1':3',1''-terfenil,	20.50	1.71	1.39	2.77	2.43	3.29	2.11	2.64

Nd = Compuestos no detectados por efecto de su disipación/degradación en la rizósfera de su correspondiente planta
 No se encontraron estos compuestos en suelo no contaminado

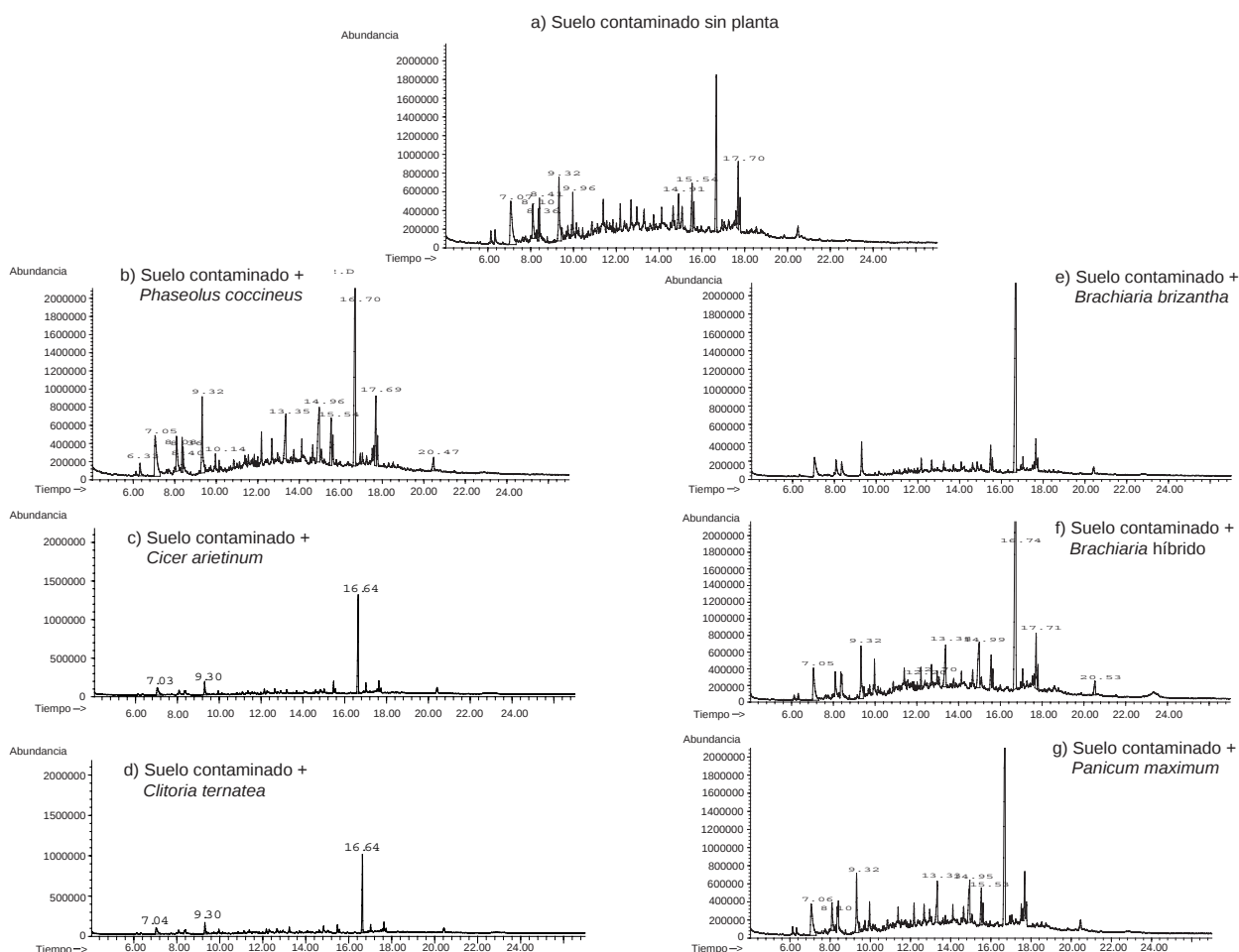


Fig. 4. Cromatograma que ilustra la presencia de contaminantes orgánicos procedentes del derrame de combustóleo en suelo contaminado (a) con respecto al suelo contaminado en presencia de leguminosas y gramíneas: (b) *Phaseolus coccineus*, (c) *Cicer arietinum*, (d) *Clitoria ternatea*, (e) *Brachiaria brizantha*, (f) *Brachiaria* híbrido, y (g) *Panicum maximum*. Muestras analizadas después de 90 días

con diferente manejo agronómico y en simbiosis con *Rhizobium* y hongos micorrízicos arbusculares, para favorecer la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos.

En el SC-sin planta se pudo haber presentado degradación natural de combustóleo (atenuación natural) por efecto de la aplicación de agua, misma que puede estimular la actividad microbiana nativa al contar con mayor disponibilidad de oxígeno (Alexander 1999). No obstante, el establecimiento de las plantas estimuló significativamente la población microbiana y la degradación de combustóleo, particularmente en la rizósfera de Bbriz. En general, las gramíneas tienen características morfológicas ideales para la fitorremediación de contaminantes orgánicos. En este sentido, Pmax y Bbriz contribuyeron de manera importante en la degradación de combustóleo. Merkl *et al.* (2005b)

demonstraron que Bbriz tiene capacidad de reducir significativamente hidrocarburos del petróleo en ambientes tropicales. En nuestro estudio, el híbrido de *Brachiaria* (pasto mulato) generado por la cruce de *B. riziensis* 44-6 x *B. brizantha* cv. Marandu, fue la especie que menor efecto tuvo en la remediación del SC con combustóleo (**Fig. 4f**), aunque contribuyó en la desaparición de cinco de sus componentes con respecto al SC-sin planta (**Cuadro III**).

El establecimiento de plantas en suelos contaminados trae cambios significativos en las características físicas, químicas y biológicas de la rizósfera (Davis *et al.* 2002). Estos cambios pueden favorecer a los microorganismos rizosféricos, los cuales pueden intervenir en procesos de oxidación, degradación y completa mineralización de hidrocarburos del petróleo (Ferrera-Cerrato y Alarcón 2004, Pilon-Smits 2005).

De este modo, la interacción planta-rizósfera-microorganismo es importante en la selección de aquellas plantas con mayor potencial de uso en la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en el suelo.

CONCLUSIONES

Las especies de gramíneas fueron más tolerantes a la presencia de combustóleo que las leguminosas. La presencia de plantas en suelo contaminado estimuló la proliferación de microorganismos en la rizósfera, que también fueron estimulados por la presencia del contaminante en el suelo. *Phaseolus coccineus* fue la única especie leguminosa en tolerar y crecer en suelo contaminado y estimular la población microbiana de la rizósfera contaminada. Esta leguminosa puede tener uso en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Bracharia brizantha* fue la especie con mayor capacidad de degradación de combustóleo en la rizósfera, lo que la hace una especie con cualidades para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el proyecto SEMARNAT-CONACyT Clave: 2002-CO1-0023. "Microorganismos simbióticos de la rizósfera de leguminosas y gramíneas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo".

REFERENCIAS

- Alexander M. (1999). *Biodegradation and bioremediation*. 2nd. edition. Academic Press, Nueva York. 453 p.
- Anderson T.A., Guthrie E.A. y Walton B.T. (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27, 2630-636.
- Atlas R.M. (1995). Bioremediation of petroleum pollutants. *Intern. Biodeter. Biodegr.* 1, 317-327.
- Aprill W. y Sims R.C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20, 253-265.
- Baker J.M. (1970). The effect of oils on plants. *Environ. Pollut.* 1, 27-44.
- Bregnard T.P.A., Hohener P., Haner A. y Zeyer J. (1996). Degradation of weathered diesel fuel by microorganism from a contaminated aquifer in aerobic and anaerobic microcosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 299-307.
- Cunningham S.D. y Ow D.W. (1996). Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiol.* 110, 715-719.
- Cunningham S.D., Anderson T.A., Schwab P.A. y Hsu F.C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56, 55-114.
- Davis L.C., Castro-Diaz S., Zhang Q. y Erickson L.E. (2002). Benefits of vegetation for soils with organic contaminants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 21, 457-491.
- De Jong E. (1980). The effect of a crude oil spill on cereals. *Environ. Pollut. (Series A)* 22, 187-196.
- Ferrera-Cerrato R. y Alarcón A. (2004). Papel de los microorganismos rizosféricos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. En: *Química verde en Latinoamérica*. (P. Tundo y R. Hoyos de Rossi, Eds.). IUAPAC-INCA. Argentina, pp. 89-109.
- Frick C.M., Farrel R.E. y Germida J.J. (1999). *Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites*. Petroleum Technology Alliance Canada, Calgary. 72 p.
- Gudin C. y Syrratt W.J. (1975). Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination. *Environ. Pollut.* 8, 107-112.
- Gunther T., Dornberger U. y Fritsche W. (1996). Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33, 203-215.
- Hernández A.E. (1997). Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacán 12-A3. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México.
- Hutchinson S.L., Banks M.K. y Schwab A.P. (2001). Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30, 395-403.
- Ilangovan K. y Vivekanandan M. (1992). Effect of oil pollution on soil respiration and growth of *Vigna mungo* (L.) Hepper. *Sci. Total Environ.* 116, 187-194.
- Ingraham J.L. y Ingraham C.A. (1998). *Introducción a la microbiología*. Vol. I, Reverté. Barcelona, España, 328 p.
- Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H. y Trevors J.T. (2002). Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremed. J.* 6, 57-63.
- Leahy J.G. y Colwell R.R. (1990). Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54, 305-315.
- Lin Q. y Mendelssohn I.A. (1998). The combined effects of phytoremediation and biostimulation in enhancing habitat restoration and oil degradation of petroleum contaminated wetlands. *Ecol. Engineer.* 10, 263-274.
- Louchouart P., Bonner J. S., Tissot P., McDonald T. J., Fuller C. y Page C. (2000) Quantitative determination of oil films/slicks from water surfaces using a modified solidphase extraction (SPE) sampling method. *Proceed-*

- ings of the 23rd Arctic Marine Oil Spill Program Meeting, Vancouver, Canada, vol. 1, pp. 59-68.
- Malallah G., Afzal M., Gulshan S., Abraham D., Kurgan M. y Dhabhi M.S.I. (1996). *Vicia faba* as a bioindicator of oil pollution. *Environ. Pollut.* 92, 213-217.
- Merkel N., Schultze-Kraft R. e Infante C. (2005a). Phytoremediation in the tropics-influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. *Environ. Pollut.* 138, 86-91.
- Merkel N., Schultze-Kraft R. e Infante C. (2005b). Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air Soil Pollut.* 165, 195-209.
- Miller R.M. (1996). Biological processes affecting contaminant fate and transport. En: *Pollution science* (I.L. Pepper, C.P. Gerba, y M.L. Brusseau, Eds). Academic Press, Nueva York, pp. 77-91.
- O'Rourke D. y Connolly, S. (2003). Just oil? The distribution of environmental and social impacts of oil production and consumption. *Ann. Rev. Environ. Resour.* 28, 587-617.
- Paetz A. y Wilke B.M. (2005). Soil sampling and storage. En: *Manual of soil analysis – Monitoring and assessing soil bioremediation*. (R. Margesin y F. Schinner, Eds). Springer-Verlag, Berlín. pp. 1-45.
- Philip C.V., Bullin, J.A. y Anthony R.G. (1984). GPC characterization for assessing compatibility problems with heavy fuel oils. *Fuel Process. Technol.* 9, 189-201.
- Pilon-Smits E. (2005). Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 56, 15-39.
- Prado A.M., Quillici A. y Ortega F. (1999). Estudio descriptivo y funcional de la vegetación en áreas contaminadas por derrames de hidrocarburos. *Visión Tecnológica* 2, 51-58.
- PROFEPA. (2003). Reporte de emergencias ambientales en México 2002. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). México.
- Quiñones-Aguilar E.E., Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F., Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez R. y Alarcón A. (2003). Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia* 37, 585-594.
- Qiu X., Leland T.W., Shah S.I., Sorensen D.L. y Kendall E.W. (1997). Field study: grass remediation for clay soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. En: *Phytoremediation of soil and water contaminants*. (E.L. Kruger, T.A. Anderson y J.R. Coats, Eds.). American Chemical Society: Washington, D.C. ACS Symposium Series 664, pp. 186-199.
- Randall J.D. y Hemmingsen B. (1994). Evaluation of mineral agar plates for the enumerations of hydrocarbon-degrading bacteria. *J. Microbiol. Methods* 20, 103-113.
- Reilley K.A., Banks M.K. y Schwab A.P. (1996). Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25, 212-219.
- SAS Institute Inc. (2002). *The SAS system for windows, ver. 9.0*. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. EUA.
- Saval S. (1997). La biorremediación como alternativa para la limpieza de sitios contaminados con hidrocarburos. En: *Seminario Internacional sobre Restauración de Sitios Contaminados*. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAP, Agencia de Cooperación Internacional del Japón, y Centro Nacional de Investigación y Capacitación Ambiental. México, pp. 18.
- Schwab A.P. y Banks M.K. (1994). Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. En: *Bioremediation through rhizosphere technology*. (T.A. Anderson y J.R. Coats, Eds.). American Chemical Society: Washington, DC, 249 p.
- Schwab A.P., Su J., Wetzel S., Pekarek S. y Banks K.M. (1999). Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* 33, 1940-1945.
- USEPA (1986). Organic analytes. En: *Test methods for evaluating solid wastes*. 3rd ed. Document SW-846, Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington DC, pp 1-16.
- USEPA (1998). Final draft: Introduction to phytoremediation. National Risk Management Research Lab. Cincinnati, Ohio.
- Van Hamme J.D., Singh A. y Ward O.P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 67, 503-549.
- Wiltse C.C., Rooney W.L., Chen Z., Schwab A.P. y Banks M.K. (1998). Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J. Environ. Qual.* 27, 169-173.
- Wyszkowska J. y Kucharski J. (2001). Correlation between number of microbes and degree of soil contamination by petrol. *Polish J. Environ. Studies* 10, 75-181.
- Zavala-Cruz J., Gavi-Reyes F., Adams-Schroeder R.H., Ferrera-Cerrato R., Palma-López D., Vaquera-Huerta H. y Domínguez-Ezquivel J.M. (2005). Oil spills on soils and adaptation of tropical grass in Activo Cinco Presidentes, Tabasco, Mexico. *Terra Latinoamer.* 23, 293-302.