

FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON BENZO(a)PIRENO MEDIANTE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS Y PASTO ALEMÁN *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.

Phytoremediation of soils polluted with Benzo(A)Pyrene using indigenous microorganisms and creeping rivergrass *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.

M del C Rivera-Cruz ✉, A Trujillo-Narcía, R Ferrera-Cerrato, R Rodríguez-Vázquez, V Volke-Haller, P Sánchez-García, L Fernández-Linares

(MCRC) Programa en Producción Agroalimentaria en el Trópico, Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados Periférico Carlos A. Molina s/n Km 3.5, CP 86570, H. Cárdenas, Tabasco. México. (ATN) Campus Tabasco, Universidad Autónoma de Guadalajara. México. (RFC) (VVH) (PSG) Programa de Edafología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, edo. México. (RRV) Dpto. Biotecnología. CINVESTAV. México. (LFL) Programa de Biotecnología. IMP. México. mariari@colpos.mx

Artículo recibido: 10 de julio de 2005, **aceptado:** 30 de enero de 2006

RESUMEN. La capacidad del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) asociado a poblaciones autóctonas de bacterias y hongos para limpiar suelos contaminados con benzo(a)pireno fue evaluada. Se realizó un experimento en invernadero con un arreglo factorial 2x4x2 en un diseño completamente al azar y cuatro repeticiones por tratamiento: (1) suelos con cero ($\leq 0.0002 \text{ mg kg}^{-1}$) y 100 mg kg^{-1} de benzo(a)pireno, (2) cuatro tipos de inóculos (sin microorganismos, con bacterias, con hongos, y con asociación bacterias-hongos), y (3) dos del pasto alemán (con rizosfera y sin rizosfera). La medición de bacterias y hongos se realizó con el método de recuento en cajas Petri. La extracción del benzo(a)pireno se efectuó con el procedimiento del método EPA 3540C, utilizando hexano y acetona en proporción 70:30. Para el control de calidad, a cada 10 muestras experimentales se utilizaron una muestra testigo (con $\leq 0.0002 \text{ mg kg}^{-1}$ de BaP determinado con el método EPA 8270D) y un blanco. La limpieza de la muestra se basó en el procedimiento del método EPA 3630C. La degradación del benzo(a)pireno en las muestras de suelo se determinó por espectrofotometría UV/visible a 381 nm, y la producción de biomasa vegetal por peso seco. Las bacterias, los hongos y la asociación bacterias-hongos registraron poblaciones mayores a los 60 días y significativamente diferentes ($p = 0.05$) entre los tratamientos con rizosfera del pasto alemán en suelo con 100 mg kg^{-1} de benzo(a)pireno. Las poblaciones máximas fueron de 7×10^9 unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias g^{-1} de suelo seco y de 2×10^6 UFC de hongos. En la asociación, la población de bacterias disminuyó una unidad y los hongos aumentaron una unidad exponencial. La biodegradación del BaP a los 120 días fue significativamente mayor ($p = 0.05$) en suelo rizosférico inoculado con la asociación bacterias-hongos. Esta degradación removió hasta el 66.5% del BaP. La producción de materia vegetal seca fue significativamente mayor ($p = 0.05$) en suelo con BaP, y con el inóculo de los hongos *Paecilomyces* sp y *Trichoderma* sp se promovió la producción de biomasa hasta con un incremento de 48.3% con respecto al testigo.

Palabras clave: BaP, biodegradación, biomasa vegetal, organismos autóctonos, pasto alemán, unidades formadoras de colonias.

ABSTRACT. Creeping rivergrass (*Echinochloa polystachya*) associated with indigenous populations of bacteria and fungi was evaluated with respect to its capacity to clean soils polluted with benzo(a)pyrene. A greenhouse experiment was carried out with a 2x4x2 factorial arrangement and a completely random design with four repetitions per treatment: (1) soils with zero ($\leq 0.0002 \text{ mg kg}^{-1}$) and 100 mg kg^{-1} of benzo(a)pyrene, (2) four types of inoculi (without microorganisms, with bacteria, with fungi, with a bacteria-fungi association), and (3) two types of creeping

rivergrass (with rhizosphere, without rhizosphere). Bacteria and fungi were counted on Petri dishes. The extraction of benzo(a)pirene was done following the EPA 3540C method, with hexane and acetone at a ratio of 70:30. A control sample was used after every 10 experimental samples (with ≤ 0.0002 mg kg⁻¹ of BaP determined by the EPA 8270D method), together with a blank, for quality control. The cleanliness of the sample was determined by the EPA 3630C method. The breakdown of benzo(a)pirene in the soil samples was determined by UV/visible spectrophotometry at 381 nm, and the production of plant biomass was measured as dry weight. The bacteria, the fungi and the bacteria-fungi association recorded greater populations after 60 days and were significantly different ($p = 0.05$) among the treatments with creeping rivergrass and rhizosphere on soil with 100 mg kg⁻¹ of benzo(a)pirene. The greatest populations included 7×10^9 colony forming units (CFU) of bacteria g⁻¹ of dry soil and 2×10^6 CFU of fungi. Within the bacteria-fungi association, the population of the bacteria decreased one exponential unit and that of the fungi increased one exponential unit. The bio-breakdown of BaP after 120 days was significantly greater ($p = 0.05$) in the rhizospheric soil that was inoculated with the bacteria-fungi association. This breakdown removed up to 66.5% of the BaP. The production of dry plant material was significantly greater ($p = 0.05$) in soil with BaP, and the inocule of the fungi *Paecilomyces* sp and *Trichoderma* sp promoted the production of biomass with an increase of up to 48.3% with respect to the control.

Key words: BaP, bio-breakdown, plant biomass, indigenous organisms, creeping rivergrass, colony forming units.

INTRODUCCIÓN

La combustión incompleta de basura, madera, carbón o productos derivados del petróleo produce el benzo(a)pireno (BaP), que es un producto secundario indeseado de la combustión, particularmente cuando la temperatura es muy baja, e impide el consumo total del combustible (Harte et al. 1995). El BaP es un compuesto formado por cinco anillos bencénicos, con peso molecular de 252 g mol⁻¹ y de muy poca solubilidad (0.003 mg por cada litro de agua). El BaP es el hidrocarburo aromático policíclico (HAP) más genotóxico de la lista de 16 hidrocarburos según la Agencia de Protección Ambiental (Cerniglia 1992). El BaP es inocuo de manera intrínseca, pero es tóxico cuando es bioactivado por las enzimas monooxigenasas y dioxigenasas que al oxidar la posición 7, 8, 9, 10 y 11 de la molécula, se forman metabolitos intermedios con propiedades carcinogénicas y mutagénicas en células de mamíferos y de bacterias (Pothuluri & Cerniglia 1994).

Las fuentes antrópicas más importantes de BaP son la combustión incompleta del petróleo crudo y la quema de áreas forestales (Edwards 1983; Sims & Overcash 1983; Joner et al. 2002). Sin embargo, en el estado de Tabasco se ha encontrado BaP en suelos alejados de instalaciones petroleras (Cram et al. 2004). También el BaP es un componente del petróleo crudo, cuya concen-

tración es variable según el tipo: los petróleos mediano y pesado contienen hasta 20 mg kg⁻¹ (Dorn et al. 1998).

El BaP y los HAP pueden ser mineralizados en la rizosfera vegetal (Reilley et al. 1996; Binet et al. 2000) o ser absorbidos y acumulados en las raíces de las plantas (Lee & Banks 1993) para su metabolismo y volatilización. En varios estudios se ha investigado la importancia de las interacciones de los microorganismos rizosféricos en la degradación de los HAP. Así por ejemplo, cuando existen condiciones de estrés en el suelo por presencia de hidrocarburos las plantas pueden modificar la exudación de los compuestos rizosféricos y también modificar la población de microorganismos (Rivera-Cruz 2001). El aumento de la degradación de los HAP en la rizosfera se relaciona con el incremento de las poblaciones microbianas (Barber & Linch 1977). Walton et al. (1994) identificaron el incremento de los consorcios rizosféricos y de su actividad en suelos contaminados. Una coincidencia de los resultados de estas investigaciones fue que la concentración de los HAP disminuyó más en suelos rizosféricos que en suelo sin planta.

Los pastos han sido utilizados en pruebas experimentales con resultados satisfactorios en la descontaminación de suelos con HAP (Aprill & Sims 1990; Binet et al. 2000; Liste & Alexander 2000 a; 2000 b). La estimulación de las poblaciones microbianas presentes en la rizosfera promueve la

descontaminación de suelos mediante la solubilización, oxidación, co-oxidación y el cometabolismo de las sustancias tóxicas (Rosenberg & Ron 1996). Las plantas que restauran suelos contaminados son denominadas especies fitorremediadoras (Bierkens *et al.* 1998). La tolerancia vegetal a los HAP en el suelo evidencia la factibilidad de utilizar las plantas en tecnologías de fitorremediación de suelos. Estudios previos realizados *in vitro* con cuatro cepas de bacterias y tres de hongos rizosféricos, aislados de dos pastos localizados en suelos contaminados con petróleo en el estado de Tabasco, registraron tasas elevadas de crecimiento y de biomasa en presencia de 100 mg kg⁻¹ de BaP (Rivera-Cruz *et al.* 2002 a). Estos resultados sustentan el presente experimento en invernadero dirigido a identificar las interacciones entre el pasto alemán, las cepas nativas y el BaP. Los objetivos fueron: 1) probar si la rizosfera del pasto alemán, junto con el BaP, modifica el tamaño de las poblaciones de las bacterias y hongos; 2) demostrar si la inoculación de bacterias y hongos en suelo con rizosfera del pasto alemán reduce la concentración de BaP, y 3) evaluar la respuesta de la producción de biomasa del pasto alemán al inóculo de bacterias y hongos en suelos con y sin BaP.

MATERIAL Y MÉTODOS

Suelo, microorganismos y producción de plántulas

El suelo utilizado en invernadero se recolectó del horizonte superficial Op (0-24/25 cm) de un Gleysol histi-orthiéutrico (abruptico) (Rivera-Cruz 2004), localizado en el ejido Hermenegildo Galeana Tercera Sección, municipio de Teapa, Tabasco (17 ° 40 ' 58 " N y 93 ° 00 ' 45 ° O). En el sitio de recolección del suelo la temperatura media anual varió de 24 a 26 °C, la precipitación total anual osciló de 3 500 a 4 000 mm y el tipo de clima es Af(m) (Anónimo 2001). El suelo registró un pH:2.5 en agua de 5.1, 155 mg kg⁻¹ de N inorgánico (NO₃⁻ y NH₄⁺), 1.31 mg kg⁻¹ de P Olsen, 0.40 cmol⁺ kg⁻¹ de K intercambiable, 28.3% de materia orgánica, 18.7% de arcilla, y textura franco limosa. El contenido basal de BaP fue menor o igual a 0.0002 mg kg⁻¹

base seca, determinado por duplicado mediante el método EPA 8270D (Anónimo 1998). Éste análisis cromatográfico se realizó en un laboratorio acreditado por la Entidad Mexicana de Acreditación, A. C. Los microorganismos utilizados fueron cuatro cepas de bacterias y dos de hongos aisladas de las rizosferas de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) localizados en un Gleysol histi-sódico (abruptico) (Rivera-Cruz 2004) con 323 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo en el campo petrolero La Venta, Tabasco (Rivera-Cruz *et al.* 2002 b). Las cuatro cepas de bacterias fueron identificadas como CT11, CT16, CT26 y AT4 (C de cabezón, A de alemán y T de Tabasco). Los hongos *Trichoderma* sp y *Paecilomyces* sp fueron aislados de la rizosfera del pasto cabezón. Estas cepas se aclimataron y crecieron *in vitro* en sustratos enriquecidos con BaP (Rivera-Cruz *et al.* 2002 a). El pasto alemán usado se recolectó de un Gleysol histidíctrico (abruptico) (Rivera-Cruz 2004) con 115 000 mg kg⁻¹ de HTP en el horizonte superficial Op (0-20/25 cm) en el campo petrolero La Venta, Tabasco. El pasto se plantó en contenedores de plástico en suelo sin BaP en invernaderos del Colegio de Postgraduados, Montecillo, Estado de México, para su aclimatación durante seis meses. De los tallos maduros se seleccionaron vástagos de 5 cm de longitud con yemas maduras. Con este material se estableció un almácigo en charolas de unícel 30 días antes del inicio del experimento.

Diseño experimental

El diseño experimental fue completamente al azar con 16 tratamientos y cuatro repeticiones, con arreglo de tres factores completos: 1) dos niveles de concentración de BaP [0(≤ 0.0002) y 100 mg kg⁻¹ base seca], 2) cuatro niveles de tipo de microorganismos tolerantes a BaP: testigo, con cuatro cepas de bacterias (CT11, CT16, CT26 y AT4), con dos cepas de hongos (*Paecilomyces* sp y *Trichoderma* sp) y con la asociación de las seis cepas de bacterias y de hongos, y 3) dos niveles de planta: sin rizosfera (tratamiento sin planta) y con rizosfera (tratamiento con planta). La unidad experimental fue un contenedor de vidrio (recipiente de 17 cm de altura y 10 cm de diámetro) con 450 g de suelo estéril (calor húmedo a 121 °C en autoclave a

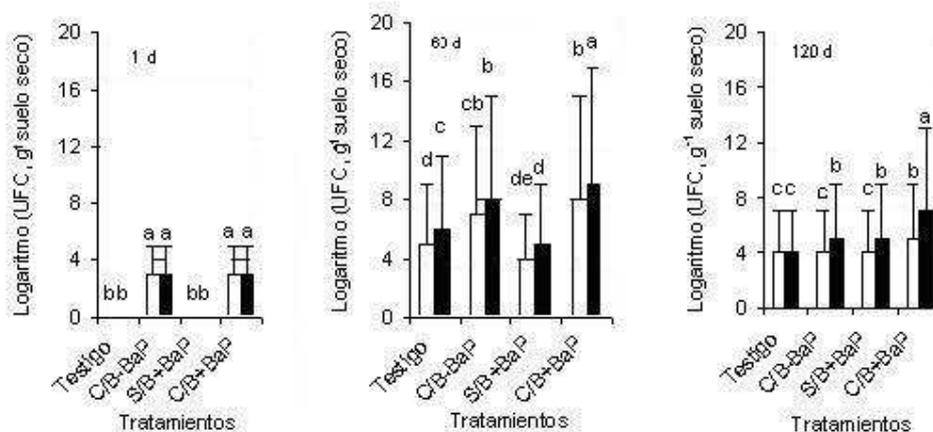


Figura 1. Poblaciones de bacterias degradadoras de benzo(a)pireno en suelos no rizosférico (□) y rizosférico (■) de pasto alemán, inoculado con bacterias (C/B), no inoculado (S/B), sin benzo(a)pireno (-BaP) y contaminado con benzo(a)pireno (+BaP, 100 mg kg⁻¹, base seca), durante tres tiempos (1, 60 y 120 días). Columnas con la misma letra dentro de cada tiempo, son iguales estadísticamente (Tukey p = 0.05) (a > b).

Figure 1. Populations of benzo(a)pyrene decomposing bacteria in non rhizospheric (□) and rhizospheric soils (■) with creeping rivergrass, inoculated with bacteria (C/B), not inoculated (S/B), without benzo(a)pyrene (-BaP) and polluted with benzo(a)pyrene (+BaP, 100 mg kg⁻¹, dry base) for three time spans (1, 60 and 120 days). Columns with the same letter in each time span are statistically the same (Tukey p = 0.05) (a > b).

1.3 kg cm⁻² durante 4 h). Los tratamientos con BaP se prepararon con 0 g y 0.045 g de BaP para obtener concentraciones de 0 y 100 mg de BaP por kg de suelo seco, respectivamente. El BaP utilizado fue 3-4-benzopireno grado HPLC con mínimo 97 % de pureza (Sigma B-7-1760). El contenedor de vidrio se esterilizó con alcohol etílico 96 %, el BaP se diluyó en 25 ml de acetona y se adicionó al suelo, se homogeneizó con una varilla esterilizada de vidrio. El contenedor con el suelo+BaP se dejó abierto durante 12 h para permitir la volatilización de la acetona. Para la asociación de las cuatro cepas de bacterias y las dos cepas de hongos se agregaron 2 ml de inóculo de microorganismos. Para la asociación de las seis cepas se agregaron 4 ml de cultivo con bacterias y hongos. Cada tratamiento con pasto alemán se estableció con dos plántulas por unidad experimental, y a los 20 días se eliminó una. Cada 24 h se realizó mediante gravimetría el cálculo de la humedad del suelo, se adicionó agua destilada para mantener la humedad del suelo entre 19 y 26 %. Las variables evaluadas fueron poblaciones de bacterias y hongos (UFC), degradación de BaP (mg kg⁻¹ suelo seco) y producción de biomasa vegetal (g).

Poblaciones de bacterias, hongos y degradación de benzo(a)pireno

A los 60 y 120 días se muestrearon de 25 a 30 g de suelo por unidad experimental con un tubo de vidrio esterilizado (1 cm de diámetro). El muestreo se realizó en cinco puntos de cada unidad experimental (a 1.5 cm de distancia del tallo en las unidades experimentales con rizosfera del pasto alemán). La muestra para medir las poblaciones de bacterias y hongos se preservó a 4 °C durante una semana y a 0 °C por 10 días para medir el BaP. Esta medición (UFC por gramo de suelo seco) se realizó con la técnica de recuento en placa de agar (Ingraham & Ingraham 1998). Diez gramos de cada muestra se extrajeron y se realizaron diluciones decimales seriadas para bacterias de 1x10¹ a 1x10⁸ y para hongos de 1x10¹ a 1x10⁴. Se extrajo 0.1 ml de cada dilución y se dispersó-sembró en cajas Petri con medio de cultivo selectivo. Para bacterias se utilizó carbón combinado modificado y para hongos celulosa agar modificado (Rivera-Cruz et al. 2002 a). La incubación se realizó a 28 °C durante 72 h para hongos y 120 h para bacterias. La degradación del BaP se midió con la

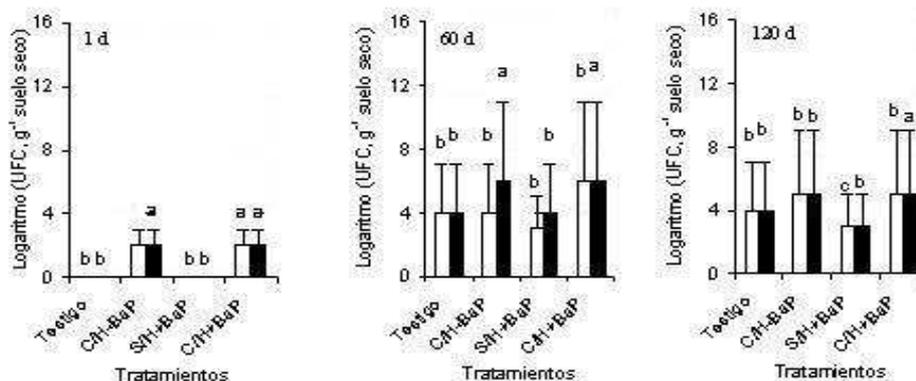


Figura 2. Poblaciones de hongos degradadores de benzo(a)pireno en suelos no rizosférico (□) y rizosférico (■) de pasto alemán, inoculado con hongos (C/H), no inoculado (S/H), sin benzo(a)pireno (-BaP) y contaminado con benzo(a)pireno (+BaP, 100 mg kg⁻¹, base seca), durante tres tiempos (1, 60 y 120 días). Columnas con la misma letra dentro de cada tiempo, son iguales estadísticamente (Tukey $p = 0.05$) ($a > b$).

Figure 2. Populations of benzo(a)pyrene decomposing fungi in non rhizospheric (□) and rhizospheric soils (■) with creeping rivergrass, inoculated with fungi (C/H), not inoculated (S/H), without benzo(a)pyrene (-BaP) and polluted with benzo(a)pyrene (+BaP, 100 mg kg⁻¹, dry base) for three time spans (1, 60 and 120 days). Columns with the same letter in each time span are statistically the same (Tukey $p = 0.05$) ($a > b$).

concentración disipada de BaP. La extracción se realizó con el método EPA 3540C (Anónimo 1996 a), se utilizaron los solventes hexano (Allied Signal Burdick & Jackson grado HPLC) y acetona (J. T. Baker reactivo) en proporción 70:30, respectivamente. La extracción se realizó en equipo soxhlet (Colombo-Mantle) durante 12 h. Para el control de la calidad se utilizaron una muestra testigo del suelo (≤ 0.0002 mg kg⁻¹ de BaP, base seca) y un blanco (sin BaP), ambos fueron utilizados por cada 10 muestras de suelo del experimento. La limpieza del extracto se realizó en columna con sílica gel (Baker para análisis), florcil (Baker para análisis) y sulfato de sodio anhidro (Baker para análisis). El percolado se aforó a 50 ml con acetona de acuerdo con el método EPA 3630C (Anónimo 1996 b). Los extractos fueron analizados en un espectrofotómetro Perkin Elmer con detector UV/visible y la lectura se realizó a 381 nm. La sensibilidad del equipo fue 2.5 mg l⁻¹. La recuperación del BaP varió de 85 a 92%.

Biomasa vegetal

A los 120 días de la siembra de las plántulas se evaluó la producción de materia seca de la parte aérea y de la raíz de la planta. El material vege-

tal se cosechó y se secó a 70 °C durante 48 h. La materia seca total fue la suma del peso seco de las biomásas aérea y radical.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se basó en el análisis de varianza de las medias de los tratamientos. La prueba de medias se realizó mediante la prueba de Tukey ($p = 0.05$) se aplicó con el paquete estadístico SAS (Anónimo 1989).

RESULTADOS

Poblaciones de bacterias y hongos

El análisis de varianza de la población total de bacterias en suelos rizosféricos resultaron significativamente mayores ($p = 0.05$) que en suelos no rizosféricos tanto a los 60 como a los 120 días (Figura 1). El BaP y el sistema rizosférico del pasto alemán aumentó la población total de bacterias. La población más grande a los 60 días fue 7×10^9 UFC g⁻¹ de suelo seco, ocurrió en suelo rizosférico con 100 mg kg⁻¹ de BaP. Esta población fue mayor que la población de bacterias del suelo con 100 mg kg⁻¹ de BaP, pero sin rizosfera,

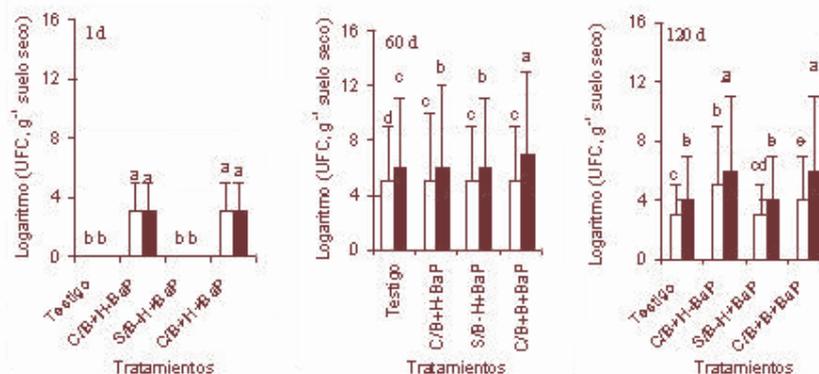


Figura 3. Poblaciones de bacterias degradadoras de benzo(a)pireno (asociadas con hongos, H) en suelos no rizosférico (□) y rizosférico (■) de pasto alemán, inoculado con bacterias (C/B), no inoculado (S/B), sin benzo(a)pireno (-BaP) y contaminado con benzo(a)pireno (+BaP, 100 mg kg⁻¹, base seca), durante tres tiempos (1, 60 y 120 días). Columnas con misma letra dentro de cada tiempo, son iguales estadísticamente (Tukey p = 0.05) (a > b).

Figure 3. Populations of benzo(a)pyrene decomposing bacteria (associated with fungi, H) in non rhizospheric (□) and rhizospheric soils (■) with creeping rivergrass, inoculated with bacteria (C/B), not inoculated (S/B), without benzo(a)pyrene (-BaP) and polluted with benzo(a)pyrene (+BaP, 100 mg kg⁻¹, dry base) for three time spans (1, 60 and 120 days). Columns with the same letter in each time span are statistically the same (Tukey p = 0.05) (a > b).

con 3×10^8 UFC. A los 120 días el comportamiento de las poblaciones fue similar que a los 60 días pero disminuyó hasta dos unidades logarítmicas. La rizosfera con 100 mg kg^{-1} de BaP tuvo la mayor población con 3×10^7 UFC, fue mayor que la población de bacterias en suelo no rizosférico y con 100 mg kg^{-1} de BaP. Las poblaciones de bacterias disminuyeron de manera consistente a los 120 días, por lo tanto la biodisponibilidad del carbono del BaP a los 120 días puede ser menor para las bacterias, lo que evidencia menor población (Figura 1). Esta disminución fue menos acentuada en la población total de hongos (Figura 2). Las poblaciones de los hongos inoculados tuvieron diferencias estadísticas ($p = 0.05$) a los 60 y 120 días (Figura 2). La mayor población a los 60 días se encontró en suelo rizosférico con BaP con 2×10^6 UFC g⁻¹ de suelo seco, y menos (1×10^6 UFC) en suelo rizosférico sin BaP. A los 120 días la población de hongos disminuyó en todos los tratamientos. La población más grande ($p = 0.05$) se midió en el suelo inoculado, con planta de pasto alemán y con BaP (6×10^5 UFC), tres más tuvieron la misma unidad logarítmica pero con seis veces menor población (1×10^5 UFC). La ausencia del carbono del BaP en el testigo aparentemente fue reem-

plazada por el carbono de los exudados orgánicos de las raíces. A los 120 días se aisló principalmente el hongo *Trichoderma* sp, esto indica que el hongo *Paecilomyces* sp puede ser más sensible al BaP o que es menos eficiente para utilizar el carbono del BaP. La ausencia de bacterias en el inóculo sugiere la falta de relaciones de parasitismo y depredación en el suelo, que normalmente ocurre cuando existe el consorcio de bacterias y hongos.

Las medias de las poblaciones de bacterias asociadas con las poblaciones de hongos fueron diferentes entre sí ($p = 0.05$) (Figura 3). La población más grande a los 60 días fue de 9×10^7 UFC g⁻¹ de suelo seco rizosférico + BaP. Es evidente que la rizosfera del pasto alemán promovió el crecimiento de las poblaciones de bacterias, aunque no se haya inoculado. La presencia de bacterias en suelos no inoculados puede estar relacionado con la diseminación de esporas a través del aire. A los 120 días las poblaciones de bacterias disminuyeron en la mayoría de los tratamientos, pero tuvieron similar respuesta estadística que a los 60 días (Figura 3). El BaP promovió las poblaciones de bacterias en el sistema rizosférico del pasto alemán, en cambio la falta de rizosfera redujo la población de bacterias en todos los tratamientos.

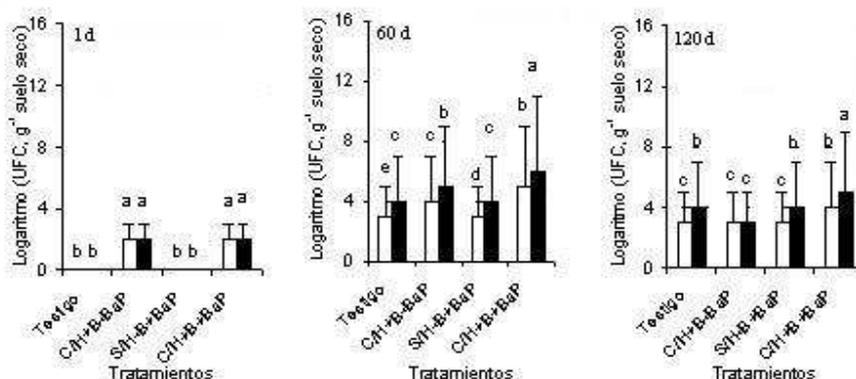


Figura 4. Poblaciones de hongos degradadores de benzo(a)pireno (asociados con bacterias) en suelos no rizosférico (□) y rizosférico (■) de pasto alemán, inoculado con hongos (C/H), no inoculado (S/H), sin benzo(a)pireno (-BaP) y contaminado con benzo(a)pireno (+BaP, 100 mg kg⁻¹, base seca), durante tres tiempos (1, 60 y 120 días). Columnas con la misma letra dentro de cada tiempo son iguales estadísticamente (Tukey p = 0.05) (a > b).

Figure 4. Populations of benzo(a)pyrene decomposing fungi (associated with bacteria) in non rhizospheric (□) and rhizospheric soils (■) with creeping rivergrass, inoculated with fungi (C/H), not inoculated (S/H), without benzo(a)pyrene (-BaP) and polluted with benzo(a)pyrene (+BaP, 100 mg kg⁻¹, dry base) for three time spans (1, 60 and 120 days). Columns with the same letter in each time span are statistically the same (Tukey p = 0.05) (a > b).

Las poblaciones de hongos asociados con bacterias fueron diferentes ($p = 0.05$) a los 60 y 120 días (Figura 4). Las poblaciones a través del tiempo disminuyeron. A los 60 días se encontró que la mayor población fue 2×10^6 UFC de hongos en suelo rizosférico con bacterias, hongos y con BaP. Estos datos muestran que el efecto rizosfera estimuló el incremento de la población de los hongos. A los 120 días la población más grande se encontró nuevamente en el suelo rizosférico y con BaP, con 1×10^5 UFC g⁻¹ de suelo seco. El efecto rizosfera originó mayor cantidad de hongos en todos los tratamientos. Otro factor que parece ser promovió la mayor población de hongos fue el potencial hidrógeno fuertemente ácido (5.1 en agua) de la solución del suelo del experimento, lo que puede ser una condición favorable para las actividades metabólicas de los hongos.

Degradación del benzo(a)pireno

La degradación del BaP a los 60 y 120 días tuvo diferencias estadísticas ($p = 0.05$) (Figura 5). El consorcio de hongos y el consorcio de bacterias+hongos inoculados en suelo rizosférico tuvieron la mayor capacidad para la degradación de los 100 mg de BaP a los 60 y 120 días (Figura 5).

La degradación del BaP a los 60 días fue estadísticamente igual en los suelos rizosféricos inoculados con hongos y con el consorcio bacterias+hongos, la degradación fue 40 y 38.6 %, respectivamente. A los 120 días la mayor degradación (66.5 %) sucedió en el suelo rizosférico inoculado con bacterias y hongos. Se observó a los 120 días una respuesta lineal de la degradación, el coeficiente de correlación tuvo asociación significativa entre el tamaño de la población de bacterias+hongos y el por ciento de la degradación, el valor fue $r = 0.92$.

Producción de biomasa vegetal

La Figura 6 muestra las diferencias estadísticas ($p = 0.05$) de la producción de materia seca total (biomasa aérea + radical) del pasto alemán a los 120 días con dos concentraciones de BaP y con inóculos de bacterias y hongos. El BaP estimuló la producción de biomasa total, aunque en términos estadísticos todos los tratamientos fueron iguales, excepto el tratamiento testigo que produjo la menor cantidad de materia seca (Tabla 1, Figura 6). La mayor producción de materia seca fue 14.79 g, fue en el tratamiento con hongos y 100 mg kg⁻¹ BaP, fue 48.3 % mayor que el testigo. La acumulación de nitrógeno en las plantas de pasto

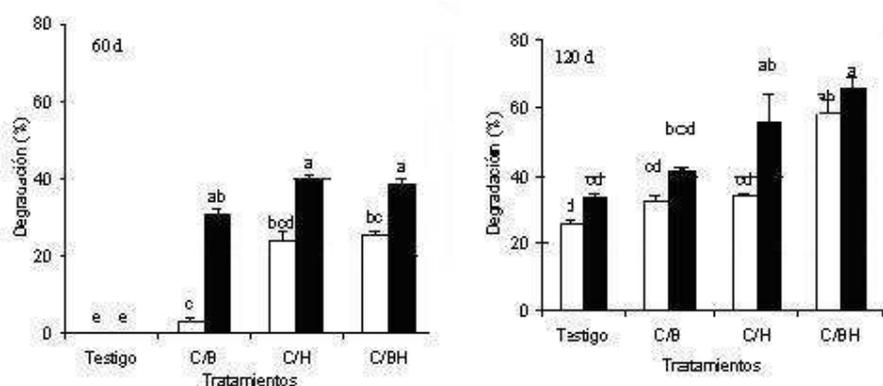


Figura 5. Degradación de benzo(a)pireno en suelo con 100 mg kg⁻¹ peso seco, no inoculado (testigo), inoculado con bacterias (C/B), con hongos (C/H), con la asociación de bacterias y hongos (C/BH), en suelo no rizosférico (□) y rizosférico (■), a los 60 y 120 días. Las columnas con la misma letra son iguales estadísticamente (Tukey p = 0.05) (a > b).

Figure 5. Benzo(a)pyrene degradation in soil with 100 mg kg⁻¹ dry weight, not inoculated (control), inoculated with bacteria (C/B), with fungi (C/H), with the bacteria–fungi association (C/BH), in non rhizospheric (□) and rhizospheric soils (■) at 60 and 120 days. Columns with the same letter are statistically the same (Tukey p = 0.05) (a > b).

Tabla 1. Producción de materia seca total del pasto alemán en suelo contaminado con benzo(a)pireno a los 120 días.

Table 1. Production of total dry matter of creeping rivergrass in soil polluted with benzo(a)pyrene at 120 days.

Tratamiento de microorganismos	Concentración de benzo(a)pireno (mg kg ⁻¹)		
	0.0 Materia seca (g)	100 Materia seca (g)	Incremento (%)
Testigo	9.97 ± 1.19	13.01 ± 1.38	20.46
Bacterias	11.93 ± 1.3	13.86 ± 1.69	16.18
Hongos	12.02 ± 0.64	14.79 ± 1.14	23.04
Bacterias + hongos	13.86 ± 0.79	13.93 ± 0.92	5.05

alemán (datos no publicados) en suelo con BaP fue el doble que en el suelo sin BaP, esto sugiere mayor disponibilidad del nitrógeno, posiblemente por el efecto de una enzima liberada por los microorganismos, o probablemente las raíces secundarias tuvieron menor capacidad de adsorción de este elemento químico que estimula el crecimiento vegetal.

DISCUSIÓN

Las diferencias estadísticas entre los tratamientos se debieron principalmente por el efecto rizosférico del pasto alemán y también por la presencia del carbono del benzo(a)pireno que promovió el crecimiento de las poblaciones de las bacterias y hongos. Los resultados obtenidos coinciden con los de Günther *et al.* (1996), quienes encontraron

que la presencia de HAP en el suelo incrementa el tamaño de la comunidad microbiana en el suelo rizosférico del pasto *Lolium perenne* respecto a suelo solo. Binet *et al.* (2000) determinaron también mayor número de microorganismos degradadores de HAP en el sistema rizosférico de *Lolium perenne*. El aumento de las poblaciones de bacterias en la rizosfera del pasto alemán puede estar relacionado con la adaptación previa in vitro de las cuatro cepas de bacterias al BaP (Rivera-Cruz *et al.* 2002 a). Las poblaciones de bacterias disminuyeron de manera consistente a los 120 días, esto coincide con registros de que las bacterias tienen menor habilidad que los hongos para mineralizar HAP con pesos moleculares grandes (Lesage *et al.* 1997) y para el BaP (Munnecke & Huysmans 1998), por lo tanto la biodisponibilidad del carbono del BaP

a los 120 días puede ser menor para las bacterias, lo que evidencia menor población. Esta disminución fue menos acentuada en la población de los hongos porque tienen mayor capacidad enzimática que las bacterias para la mineralización de los HAP con estructuras grandes (Harayama, 1997; Munnecke Huysmans 1998). Al igual que en una investigación realizada con petróleo crudo (Rivera-Cruz *et al.* 2004), se encontró que cuando las bacterias se asocian con hongos, las poblaciones de bacterias fueron más pequeñas. Esta disminución puede ser originada por las relaciones de parasitismo o depredación que proporciona beneficios al hongo (Alexander 1994; Thorn 1997).

El efecto rizosfera originó mayor cantidad de hongos en todos los tratamientos, resultados similares obtuvieron Günther *et al.* (1996) y Binet *et al.* (2000) en pasto *Lolium perenne*. El potencial hidrógeno de la solución del suelo del experimento fue fuertemente ácido (5.1 en agua), fue una condición favorable para las actividades metabólicas de los hongos (Alexander 1994).

Banks *et al.* (1999) determinaron 56 % de degradación del BaP en suelo rizosférico del pasto *Festuca arundinacea*. A los 120 días la mayor degradación (66.5 %) sucedió en el suelo rizosférico inoculado con bacterias y hongos. A los 120 días se observó una respuesta lineal de la degradación, el coeficiente de correlación tuvo asociación significativa entre el tamaño de la población de bacterias + hongos y el por ciento de la degradación, el valor fue $r = 0.92$. Esta relación positiva se puede atribuir a que estos microorganismos antes de inocularlos fueron adaptados en condiciones *in vitro* en el uso del BaP como fuente de carbono y energía (Rivera-Cruz *et al.* 2002 a). La mayor degradación del BaP, aunque fue causada por los consorcios en el suelo rizosférico del pasto alemán, también pudo ser influenciada por los siguientes factores: (1) la naturaleza hidrofóbica del BaP está asociada con las partículas de la materia orgánica, la cual puede retardar significativamente la biodegradación del BaP (Karimi *et al.* 1996), (2) la degradación también puede ser disminuida por el efecto de la adsorción del BaP en los nanoporos de los agregados del suelo (Pignatello & Xing 1996), que ningún solvente puede extraer, (3) la humificación y adsorción en la rizosfera (Banks *et al.* 1999;

Binet *et al.* 2000), (4) la fotodegradación y la evaporación que pueden aumentar la degradación del BaP (Cerniglia 1992) y (5) la formación de metabolitos intermedios (Cerniglia 1992; Pothuluri Cerniglia 1994; Binet *et al.* 2000), que son medidos en diferente longitud de onda que el BaP.

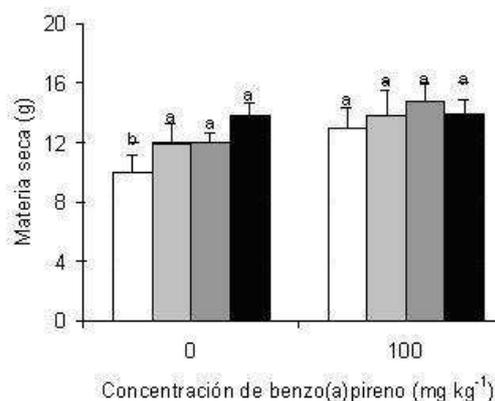


Figura 6. Producción de material seco de pasto alemán a los 120 días en función del grado de contaminación del suelo con benzo(a)pireno, no inoculado-testigo (□), inoculado con bacterias (▤), con hongos (▥) y con asociación de bacterias y hongos (■). Columnas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey $p = 0.05$) ($a > b$).

Figure 6. Dry matter production of creeping rivergrass at 120 days as a function of the degree of pollution of the soil with benzo(a)pyrene, not inoculated-control (□), inoculated with bacteria (▤), with fungi (▥) and with the bacteria-fungi association (■). Columns with the same letter are statistically the same (Tukey $p = 0.05$) ($a > b$).

La mayor producción de materia seca (14.79 g) fue en el tratamiento con hongos y 100 mg kg⁻¹ BaP y resultó 48.3 % mayor que el testigo. Wild & Jones (1992) encontraron 33 % mayor producción de biomasa de zanahoria cuando las plantas crecieron en sedimentos con 185 g kg⁻¹ de 13 HAP, entre ellos el BaP. El incremento fue 8 % cuando la planta se expuso a 379 g kg⁻¹ de HAP, y la exposición a 808 g kg⁻¹ HAP no originó diferencias estadísticas respecto al tratamiento testigo. Resultados contrarios obtuvieron Binet *et al.* (2000), quienes encontraron que el efecto por separado de 50 y 200 mg kg⁻¹ de ocho HAP, no incluido el BaP, originaron efectos restrictivos hasta de 50 % en la producción de materia seca aérea

y radical en el pasto *Lolium perenne*. El efecto positivo del BaP en la producción de materia seca del pasto alemán puede estar relacionado con la mayor elongación de las raíces por expansión de células, que por división celular, como ha sido identificado en plantas de lechuga (Ren et al. 1996).

Además, Bossert & Bartha (1986) y Salanitro et al. (1997) registraron que ciertos hidrocarburos o sus metabolitos tienen la capacidad de simular auxinas naturales que promueven el crecimiento vegetal. La acumulación de nitrógeno en las plantas de pasto alemán en suelo con BaP fue el doble que en el suelo sin BaP (datos no publicados). Esto sugiere mayor disponibilidad del nitrógeno, posiblemente por el efecto de una enzima liberada por los microorganismos, o probablemente las raíces secundarias tuvieron menor capacidad de adsorción de este elemento químico que estimula el crecimiento vegetal.

Los efectos de la rizosfera del pasto alemán y del BaP fueron significativos en cuanto al tamaño

de las poblaciones de las bacterias, de los hongos y de la asociación bacterias-hongos. La disminución de la concentración del BaP a los 120 días fue significativa por el efecto de la asociación bacterias-hongos y por la rizosfera del pasto alemán, esto confirma la mayor efectividad en la descontaminación del suelo que las poblaciones individuales. El BaP tuvo efectos positivos en la producción de biomasa del pasto alemán y en el tamaño de las poblaciones de bacterias y hongos. La producción de biomasa vegetal fue mayor hasta 48.3% (comparado con el testigo) en suelo inoculado con hongos y con BaP. La restauración del suelo mediante asociaciones de bacterias y hongos nativos y pastos forrajeros, es una alternativa viable para la limpieza de suelos contaminados con BaP, pero deben realizarse estudios para identificar tanto las causas del incremento de la biomasa vegetal, como para determinar la posible absorción de BaP en la planta.

LITERATURA CITADA

- Alexander M (1994) Introducción a la Microbiología del Suelo. AGT Editor, S. A., D. F. 491 pp.
- Anónimo (1989) SAS/IML Software: Usage and Reference, version 6, First Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC. USA. 501 pp.
- Anónimo (1996a) Method 3540C. Soxhlet extraction. Revision 3. Environmental Protection Agency. Washington, DC. USA. 8 pp.
- Anónimo (1996b) Method 3630C. Silica Gel Cleanup. Revision 3. Environmental Protection Agency. Washington, DC. USA. 15 pp.
- Anónimo (1998) Method 8270D Semivolatile Organic Compounds by Gas Chromatography/ Mass Spectrometry (GC/MS). Revision 4. Environmental Protection Agency. Washington, DC. USA. pp.
- Anónimo (2001) Síntesis Geográfica del estado de Tabasco. Anexo cartográfico 1a. edición. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. Aguascalientes. 89 pp.
- Aprill W, Sims RC (1990) Evaluation of the use of grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil. Chemosphere 20: 253-265.
- Banks MK, Lee E, Schwab AP (1999) Evaluation of dissipation mechanisms for benzo(a)pyrene in the rhizosphere of tall fescue. J. Environ. Qual. 28: 294-298
- Bierkens J, Klein G, Corbisier P, van den Heuvel R, Verschaeve L, Weltens R, Schoeters G (1998) Comparative sensitivity of 20 bioassays for soil quality. Chemosphere 37: 2935-2947.
- Binet P, Portal JM, Leyval C (2000) Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. Soil Biol. Biochem. 32: 2011-2017
- Cerniglia CE (1992) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. Biodegradation 3: 351-368.
- Cram S, Siebe C, Ortíz-Salinas R, Herre A (2004) Mobility and persistence of petroleum hydrocarbons in peat soil of southeastern Mexico. Soil Sedim. Contam. 13: 341-360.
- Dorn BP, Vipond ET, Salanitro PJ, Wisniewski LH (1998) Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. Chemosphere 37: 845-860.

- Edwards NT (1983) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the terrestrial environmental- A review. *J. Environ. Qual.* 12: 427-441.
- Günther T, Dornberger U, Fritsche W (1996) Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33: 203-215.
- Harayama S (1997) Polycyclic aromatic hydrocarbons bioremediation design. *Curr. Opin. Biotechnol.* 8: 268-273.
- Harte J, Holdren C, Schneider R, Shirley C (1995) Guía de las sustancias contaminantes. El libro de los tóxicos de la A a la Z. Editorial Grijalvo, D.F. 642 pp.
- Ingraham JL, Ingraham CA (1998) Introducción a la Microbiología. Volumen 1. Editorial Reverté, Barcelona. 328 pp.
- Joner EJ, Corgié SC, Amellal N, Leyval C (2002) Nutritional constraints to degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in a simulated rhizosphere. *Soil Biol. Biochem.* 34: 859-864.
- Karimi S, Pickard M, Gray M (1996) Reactions of polynuclear aromatic hydrocarbons on soil. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1145-1151.
- Lee E, Banks MK (1993) Bioremediation of petroleum contaminated soil using vegetation: a microbial study. *J. Environ. Sci. Health.* A28: 2187-2198.
- Lesage S, Li W-C, Millar K, Liu D (1997) Effect of humic acids on the biodegradation of PAHs by bacteria and fungi. En: Anónimo 4th Battelle Memorial Institute. In Situ and On Site Bioremediation. Int. Symp. New Orleans, FL, USA. 4/28/97. Proc. 185-190 pp.
- Liste H-H, Alexander M (2000a) Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40: 7-10.
- Liste H-H, Alexander M (2000b) Accumulation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere soil. *Chemosphere* 40: 11-14.
- Munnecke DM, Huysmans K (1998) Fungal composting processes for polyaromatic hydrocarbons. En: Annual AAPG Convention. Salt Lake City. 17-20.
- Pignatello JJ, Xing B (1996) Mechanisms of slow sorption of organic chemicals to natural particles. *Environ. Sci. Technol.* 30: 1-11.
- Pothuluri JV, Cerniglia CE (1994) Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. En: Chaudhry GR (ed). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides Press. Portland:99-124.
- Reilley K, Banks MK, Schwab AP (1996) Dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25: 212-219.
- Ren L, Zeiler L, Dixon G, Greenberg B (1996) Photoinduced effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Brassica napus* (Canola) during germination and early seedling development. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33: 73-80.
- Rivera-Cruz MC (2001) Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo. México. 348 pp.
- Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Volke-Haller V, Fernández-Linares L, Rodríguez-Vázquez R (2002a) Adaptación y selección microbiana autóctona en medios de cultivo enriquecidos con benzo(a)pireno. *Agrociencia* 36: 503-514.
- Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Volke-Haller V, Rodríguez-Vázquez R, Fernández-Linares L (2002b) Población microbiana en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36: 149-160.
- Rivera-Cruz MC, Ferrera-Cerrato R, Sánchez-García P, Volke-Haller V, Fernández-Linares L, Rodríguez-Vázquez R (2004) Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia* 38: 1-12.

- Rivera-Cruz MC (2004) Clasificación de suelos tropicales influenciados por derrames de petróleo en Tabasco. *Tecnociencia Universitaria* 7: 6-25.
- Rosenberg E, Ron EZ (1996) Bioremediation of petroleum contamination. En: Crawford LR, Crawford LD (eds). *Bioremediation: Principles and Applications*. University of Idaho. Moscow, Idaho. USA. pp. 100-125.
- Salanitro J, Dorn P, Huesemann M, Moore K, Rodhes I, Jackson LR, Vipond T, Western M, Wisniewsky H (1997) Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil toxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31: 1769-1776.
- Sims CR, Overcash RM (1983) Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Resid. Rev.* 88: 1-53.
- Thorn G (1997) The fungi in soils. En: van Elsas JD, Trevors JT, Wellington EMH (eds) *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York. 63-127.
- Walton TB, Hoylman AM, Perez MM, Anderson TA, Johnson TR, Guthrie EA, Christman RF (1994) Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. En: Anderson AT, Coats RJ (eds) *Bioremediation through Rhizosphere Technology*. American Chemical Society. Washington, D.C.:82-92.
- Wild RS, Jones CK (1992) Organic chemicals in the environment. Polynuclear aromatic hydrocarbons uptake by carrots grown in sludge-amended soil. *J. Environ. Qual.* 21: 217-225.