

DEGRADACIÓN DE FENANTRENO POR MICROORGANISMOS EN LA RIZOSFERA DEL PASTO ALEMÁN

Phenanthrene Degradation by Microorganisms in the Rhizosphere of German Grass

María del Rosario Miranda-Martínez¹, Julián Delgadillo-Martínez², Alejandro Alarcón² y R. Ferrera-Cerrato^{2‡}

RESUMEN

Cinco cepas bacterianas degradadoras de fenantreno y fijadoras de nitrógeno atmosférico: RM1S, RM10S (aisladas de suelo contaminado con petróleo), RM12A (aislada de suelo contaminado con fenantreno), *Azospirillum brasilense* cd. y *A. halopraeferens* (aisladas de suelos no contaminados) se seleccionaron por su resistencia diferencial a antibióticos en condiciones de laboratorio, mediante el incremento gradual de las dosis de gentamicina, kanamicina, estreptomycin y espectinomicina (500 µg mL⁻¹). Se determinó su dinámica poblacional en arena contaminada con fenantreno (30 mg kg⁻¹), en presencia o no del pasto alemán, *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitch. Tres tratamientos se consideraron para cada condición (con planta y sin planta): 1) inoculación con el consorcio bacteriano integrado por las cepas RM1S, RM10S, RM12A y *A. halopraeferens*; 2) inoculación con la cepa *A. brasilense* cd.; y 3) sin inoculación bacteriana. La población de las cepas RM1S, RM10S y RM12A presentó un incremento en los 10 primeros días después de la inoculación (DDI); sin embargo, después de esta fecha, la población disminuyó paulatinamente hasta dejar de ser detectada. La mayor población de las bacterias inoculadas se observó en los tratamientos sin planta. En cuanto a las cepas *A. brasilense* cd. y *A. halopraeferens*, su población no se detectó a 20 DDI en presencia o no de la planta. La degradación de fenantreno a 30 DDI no presentó diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, la presencia de la planta contribuyó a la mayor degradación del contaminante (39.8%). A 60 DDI, la degradación

de fenantreno fue mayor ($P \leq 0.05$) en plantas inoculadas con *A. brasilense* cd (57.02%), así como con el consorcio bacteriano (59.01%), en comparación con el testigo sin planta (41.7%). Debido a que las unidades experimentales no fueron sistemas completamente cerrados, se observó la presencia de microorganismos no inoculados a partir de 30 DDI.

Palabras clave: *Echinochloa polystachya*, hidrocarburo policíclico aromático, biorremediación, fitorremediación, dinámica bacteriana, *Azospirillum*.

SUMMARY

RM1S, RM10S (both isolated from petroleum-contaminated soil), RM12A (isolated from phenanthrene-contaminated soil), *Azospirillum brasilense* cd., and *A. halopraeferens* (both isolated from non-contaminated soil), five bacterial strains that degrade phenanthrene and fix atmospheric nitrogen, were selected for their resistance to gradual increases of the antibiotics gentamycin, kanamycin, streptomycin and spectinomycin (500 µg mL⁻¹), under laboratory conditions. Bacterial population dynamics was monitored in contaminated sand with phenanthrene (30 mg kg⁻¹), in presence or absence of German grass, *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitch. Three treatments were considered for each condition (with and without plants): 1) inoculation with a bacterial consortium consisted of the RM1S, RM10S, RM12A, and *A. halopraeferens* strains; 2) inoculation with the *A. brasilense* cd. strain; and 3) without bacterial inoculation. Bacterial population of RM1S, RM10S, and RM12A strains increased in the first 10 days after inoculation (DAI). After this date, however bacterial populations decreased gradually until they were undetected. The largest population of inoculated bacteria was observed in treatments without plants. The population of *A. brasilense* cd. and *A. halopraeferens* was not detected at 20 DAI, with or without plants. Phenanthrene degradation at 30 DAI was not significantly different among treatments, although

¹División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana - Xochimilco, México, D. F.

² Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, 56230 Montecillo, estado de México.

[‡] Autor responsable (ronaldfc@colpos.mx)

plant presence contributed to greater degradation of the contaminant (39.8%). At 60 DAI, phenanthrene degradation was greater ($P \leq 0.05$) in inoculated plants with *A. brasilense* cd. (57.02%), as well as with the bacterial consortium (59.01%), than in the control without plants (41.70%). As the experimental units were not completely closed systems, naturally-occurring microorganisms were observed from 30 DAI.

Index words: *Echinochloa polystachya*, *polycyclic aromatic hydrocarbon*, *bioremediation*, *phytoremediation*, *bacterial dynamics*, *Azospirillum*.

INTRODUCCIÓN

México es un país en el cual la actividad petrolera es muy importante; sin embargo, existen numerosas contingencias ambientales ocasionadas por derrames y fugas de petróleo que alteran las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). Los compuestos derivados de la actividad petrolera se han convertido en un gran problema en sitios de explotación, refinación y almacenamiento de hidrocarburos (Fernández, 2000).

Debido a que el petróleo es una mezcla compleja de compuestos químicos, éste se convierte en un contaminante que origina efectos negativos al ambiente y la salud humana. Los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) son compuestos orgánicos que poseen de dos a seis anillos de benceno, cuyo arreglo determina las características físicas y químicas de estos compuestos lipofílicos e hidrofóbicos. Este tipo de componentes del petróleo y productos de su combustión incompleta han sido motivo de estudio por sus efectos dañinos en el ambiente, debido a sus efectos mutagénicos y carcinogénicos en animales (Saval, 1995; Schwab *et al.*, 1998; Kanaly y Harayama, 2000) e inhibición del crecimiento de los cultivos (Maliszewska y Smreczak, 2000). El efecto genotóxico de los HPA se incrementa con el tamaño de su molécula y, en el caso del fenantreno, su persistencia media en suelos y sedimentos puede variar de 16 a 126 días (Shuttleworth y Cerniglia, 1995; Kanaly y Harayama, 2000).

Una de las formas de recuperar suelos contaminados con HPA es la biorremediación, la cual se basa en la utilización de organismos vivos con el fin de sanear suelos y cuerpos de agua. Estos organismos son capaces de acumular, transformar o degradar bioquímicamente contaminantes hasta concentraciones que no produzcan

efectos nocivos a la salud o el ambiente (Fernández, 2000). El éxito de estos procedimientos depende de características propias del contaminante, la naturaleza del suelo y la distribución relativa de las especies microbianas capaces de realizar la biorremediación (Cámara, 1992; Boonchan *et al.*, 2000; Siciliano *et al.*, 2001). La degradación de contaminantes orgánicos puede ser llevada a cabo por bacterias del suelo (Devare y Alexander, 1995; Harayama *et al.*, 1996; Nichols *et al.*, 1997), bacterias acuáticas (Salmon *et al.*, 1998), hongos saprofiticos (Oudot *et al.*, 1993; Field *et al.*, 1996), hongos ectomicorrícicos (Meharg y Cairney, 2000) o, incluso, ser estimulada por hongos micorrícicos arbusculares (Binet *et al.*, 2000a). En cuanto a las tasas de degradación, se menciona que en un suelo contaminado con diesel, la degradación de hidrocarburos totales por microorganismos nativos fue de 89.97% durante 60 días (Saval, 1997). Por otra parte, Joergensen *et al.* (1995) mencionaron que, en un suelo contaminado con gasolina, los microorganismos pueden mineralizar hasta 94.8% de los hidrocarburos totales en 165 días. También Bossert y Bartha (1984) indicaron que la presencia de hidrocarburos en un suelo provoca el aumento en la cantidad de bacterias de vida libre fijadoras de N_2 atmosférico; dichos autores mencionaron, además, que este tipo de bacterias disminuye la relación C:N del suelo y, como consecuencia, provoca incrementos en las poblaciones de microorganismos degradadores, lo cual acelera la descontaminación del suelo. Asimismo, Pérez-Vargas *et al.* (2001) comprobaron la capacidad de utilizar queroseno como única fuente de carbono en bacterias fijadoras de N_2 atmosférico de vida libre. Hernández *et al.* (2003) destacaron la participación de bacterias con esta misma función en la biorremediación de suelos contaminados con queroseno.

Como parte de la biorremediación se incluye la fitorremediación, la cual consiste en el uso de plantas superiores en cuya rizosfera se acelera la biodegradación de varios componentes orgánicos, incluyendo pesticidas, solventes e hidrocarburos del petróleo (Lee y Banks, 1993; Nichols *et al.*, 1997; Schwab *et al.*, 1998). Las plantas pueden liberar compuestos carbonados en la rizosfera para incrementar la solubilidad de los contaminantes (Siciliano y Germida, 1998) o adsorber los contaminantes en las raíces sin degradarlos (Binet *et al.*, 2000b).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la adaptación de bacterias fijadoras de N_2 atmosférico, aisladas de suelos con o sin contaminación por

hidrocarburos del petróleo, en un sustrato contaminado con fenantreno, inoculándolas a la rizosfera del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) y evaluando la degradación de este contaminante.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cinco cepas fijadoras de nitrógeno atmosférico con capacidad *in vitro* para utilizar fenantreno como única fuente de carbono y con crecimiento en medio de cultivo mineral mínimo modificado por Ferrera-Cerrato (Hernández *et al.*, 2003): RM1S, RM10S (aisladas de un suelo contaminado con petróleo), RM12A (aislada de un suelo contaminado con fenantreno), *Azospirillum brasilense* cd. y *A. halopraeferens* (aisladas de un suelo sin contaminación por petróleo) se seleccionaron por presentar resistencia diferencial a antibióticos en condiciones *in vitro* a 27 °C en agitadora orbital (Modelo IS, New Brunswick Scientific Co.) a 120 rpm. Esto, mediante cultivos seriados en caldo nutritivo (Merck®) con dosis crecientes de antibiótico hasta llegar a 500 µg de cada antibiótico mL⁻¹ de medio de cultivo. La resistencia diferencial a fármacos de cada cepa bacteriana se realizó con los antibióticos: kanamicina y estreptomycin, para RM1S; kanamicina y gentamicina, para RM10S; kanamicina y espectinomicina, para RM12A; gentamicina y estreptomycin, para *A. brasilense* cd.; y gentamicina y espectinomicina para *A. halopraeferens*. Una vez seleccionados los mutantes resistentes a antibióticos, se cultivaron secuencialmente en caldo nutritivo para utilizarse en el proceso de inoculación.

Se estableció un experimento con dos bloques (con y sin planta). En cada bloque se consideraron tres tratamientos: 1) inoculación con el consorcio de bacterias RM1S, RM10S, RM12A y *A. halopraeferens*; 2) inoculación con la cepa *A. brasilense* cd.; y 3) sin inoculación bacteriana. Los tratamientos constaron de cinco repeticiones por bloque y se distribuyeron en un diseño completamente al azar.

Frascos de vidrio color ámbar se llenaron con 500 g de arena de río, previamente tamizada, lavada, secada y, posteriormente, contaminada con 30 mg de fenantreno (Sigma P-2528) kg⁻¹. La contaminación de la arena con el fenantreno se realizó en un recipiente de vidrio con capacidad de 3 L. Por cada 1000 g de arena se adicionaron 30 mg de fenantreno disuelto en 10 mL de acetona y se mezclaron por 15 min. La arena contaminada se colocó en cada frasco ámbar (unidad

experimental). A cada frasco se le adicionaron 50 mL de agua destilada y, posteriormente, los frascos se esterilizaron en autoclave a 1.3 kg cm⁻² durante 2 h. Se utilizaron unidades experimentales no-completamente cerradas, pero, para evitar en lo posible la exposición de la arena al ambiente, en cada frasco se colocó una tapa metálica con dos orificios, uno para la salida de la planta y, otro, en el cual se colocó un tubo de vidrio, para realizar los riegos. En los frascos correspondientes al bloque con planta, se trasplantó un esqueje enraizado de pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (HBK.) Hitch].

La inoculación de las cepas resistentes a los antibióticos se realizó de acuerdo con los tratamientos mencionados. De cada cepa, se tomaron 30 mL de cultivo bacteriano producido en caldo nutritivo y se centrifugaron a 1500 g durante 15 min. El sobrenadante se eliminó e inmediatamente se adicionaron 20 mL de solución salina isotónica (8.5 g de NaCl L⁻¹), la cual se agitó manualmente. De esta solución se tomó 1 mL, se colocó en tubos con 9 mL de agua destilada estéril y se procedió a tomar lecturas de absorbancia a 520 nm en el espectrofotómetro (Bausch & Lomb, Spectronic 20). A continuación, se realizaron diluciones con agua destilada estéril para obtener suspensiones con concentraciones similares de células en cada cepa bacteriana. La concentración inicial de bacterias inoculadas en cada tratamiento fue de 10⁶ UFC (unidades formadoras de colonias) mL⁻¹ y se aplicaron 5 mL del inoculante bacteriano a cada frasco con arena.

Se realizó un riego inicial con 50 mL de solución nutritiva Sandman (Summerfield *et al.*, 1977). Después, se realizaron riegos semanales con 50 mL de solución nutritiva Sandman a todos los frascos y agua destilada esterilizada cada tercer día, según los requerimientos de cada unidad experimental. En laboratorio, las condiciones de cultivo del pasto alemán fueron temperatura mínima de 22 °C y máxima de 29 °C, y una luminosidad de 46.30 µmol m⁻² s⁻¹.

Supervivencia Bacteriana en la Rizosfera del Pasto Alemán

Para determinar la dinámica del crecimiento de cada cepa, se conformó una muestra compuesta de las cinco repeticiones de cada tratamiento (1 g de arena por cada repetición), se realizaron diluciones decimales de esta muestra y se colocaron en cajas Petri por triplicado (desde 10⁻⁴ hasta 10⁻⁶), con medio mineral mínimo modificado por Ferrera-Cerrato (Hernández *et al.*,

2003), adicionando los antibióticos requeridos para cada cepa. Además, se colocaron las diluciones 10^{-7} a 10^{-9} en placas con agar nutritivo, con la finalidad de observar el crecimiento de bacterias distintas de las inoculadas. Las placas se incubaron a 27 °C por 72 h. Se realizaron conteos de la población bacteriana a 10, 20, 30 y 60 días después de la inoculación (DDI), utilizando el método de diluciones decimales y conteo en placa. La población bacteriana estimada de dicha muestra, expresada en unidades formadoras de colonias por gramo de arena seca (UFC g^{-1}), se transformó en unidades logarítmicas, para facilitar su análisis estadístico y presentación de gráficos.

Degradación de Fenantreno en la Rizosfera de Pasto Alemán

Se realizaron extracciones del fenantreno a partir de la arena, de acuerdo con la técnica de agitación y centrifugación de Schwab *et al.* (1999). Se pesó 1 g de arena contaminada y 2 g de sulfato de sodio y se colocaron en tubos de centrífuga de 15 mL. En cada tubo se colocaron 5 mL de diclorometano como solvente, se agitó durante 1 h en agitadora de acción recíproca, a 120 oscilaciones por minuto. Posteriormente, se centrifugaron 15 min a 1500 g. El sobrenadante de cada tubo se colectó en viales, los cuales se expusieron en una cama de arena a 50 °C, para facilitar la evaporación del solvente. Este procedimiento de extracción se realizó tres veces para cada muestra. Se reconstituyó cada vial con 5 mL de diclorometano y se determinó la absorbancia de las muestras y de 10 viales correspondientes a una curva de calibración de 0, 10, 25, 50, 75 y 100 mg fenantreno L^{-1} a 253 nm en el espectrofotómetro (Hewlett Packard Chemstation 8453). Con las lecturas, se calculó el porcentaje de degradación de fenantreno, comparado con el contenido inicial de fenantreno en la arena contaminada. Además, con los datos de porcentaje de degradación, se calculó la vida media del fenantreno en los tratamientos, la cual corresponde al tiempo en el que desaparece la mitad del fenantreno incorporado al sustrato, de acuerdo con la ecuación:

Vida media (días) = $(50 \times t) /$ porcentaje de degradación al tiempo t

donde: t = tiempo de evaluación (días).

Con los datos obtenidos de la población bacteriana y de la degradación del contaminante por bloque y por tratamiento, para cada fecha de muestreo y para el promedio de ambas fechas, se realizó un análisis de varianza y una prueba de comparación de medias de Tukey ($\alpha = 0.05$). El análisis se llevó a cabo mediante el programa estadístico SAS, Versión 6.12 (SAS Institute, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Supervivencia Bacteriana en la Rizosfera del Pasto Alemán

En el presente estudio, se encontró una tendencia similar en la dinámica del crecimiento de todas las bacterias en ambos bloques. Desde el momento de inoculación y hasta el Día 10 se presentó un ligero incremento en el tamaño de las poblaciones bacterianas, para después presentar un descenso en la población, en algunos casos, hasta cero. En el tratamiento con el consorcio de bacterias en los bloques con planta y sin planta, las cepas RM1S y RM10S, así como la cepa RM12A con planta y *Azospirillum halopraeferens* sin planta, presentaron un aumento en su población a 10 días después de la inoculación (DDI). Del Día 10 al 60, se presentó una reducción en todas las cepas que conforman el consorcio inoculado (Figuras 1a-d). El crecimiento de la cepa *A. brasilense* cd. presentó una tendencia similar con y sin planta (Figura 2). Tanto en presencia como en ausencia de la planta, esta bacteria no presentó un aumento en su población a 10 DDI, como el presentado por las cepas del consorcio y, en adición, disminuyó a 0 UFC a 20 DDI. En estudios previos (datos no presentados), *A. brasilense* cd. había mostrado capacidad de utilizar al fenantreno como única fuente de carbono en condiciones *in vitro*. Sin embargo, su comportamiento, en este experimento, no presentó la misma tendencia. Lo anterior indica que las condiciones presentes en los frascos con arena (temperatura, humedad y nutrientes) pudieron haber contribuido a que disminuyera drásticamente la población de esta bacteria.

En el tratamiento inoculado con el consorcio, las cepas RM1S, RM10S y RM12A presentaron mayor capacidad de supervivencia, a partir de 30 DDI, en la arena contaminada con fenantreno (Figuras 1a, b, c) en comparación con *A. halopraeferens* (Figura 1d).

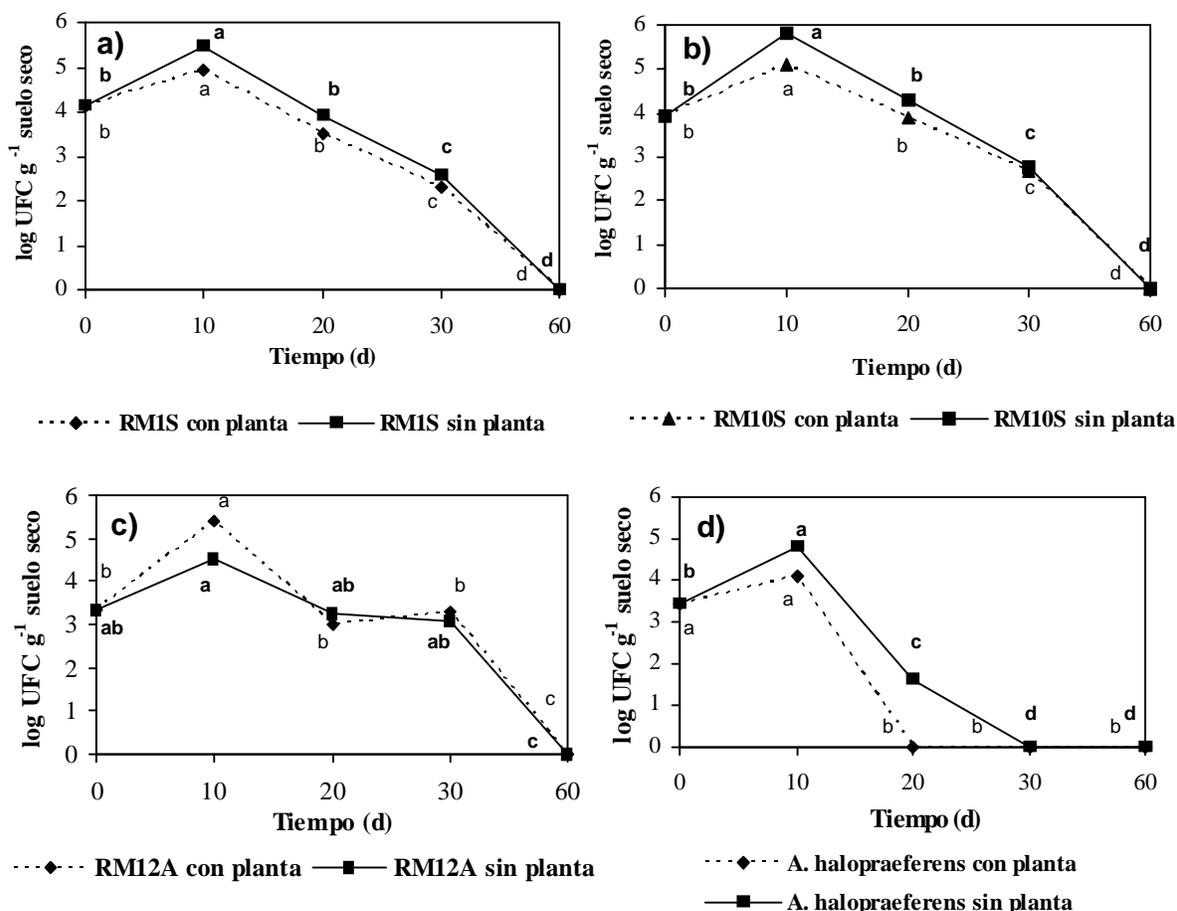


Figura 1. Dinámica poblacional de cuatro cepas bacterianas (a, b, c y d), inoculadas en consorcio, en presencia o no del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*), en arena contaminada con 30 mg de fenantreno kg⁻¹ (datos con la misma letra en la misma línea son estadísticamente iguales, Tukey, $\alpha = 0.005$).

La población de microorganismos no inoculados (MNI) en el tratamiento sin inocular con planta fue de 3.2×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (4.5 unidades logarítmicas, ULog), mientras que sin planta fue de 2.4×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (4.3 ULog). En el caso de los tratamientos inoculados con el consorcio de bacterias, la población de los MNI fue mayor, comparada con los tratamientos sin la inoculación de los microorganismos seleccionados. De esta forma, en presencia de la planta, la población fue de 10.9×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (5.0 ULog), mientras que sin planta, la población fue de 56.5×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (5.7 ULog). Con respecto a los tratamientos inoculados con la cepa *A. brasilense* cd., la población de MNI en presencia de la planta fue de 6.2×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (4.8 ULog) y sin planta fue de 12.7×10^4 UFC g⁻¹ de suelo seco (5.1 ULog). Dependiendo del sistema de estudio, la presencia de

contaminantes derivados del petróleo origina que los microorganismos presenten una fase inicial de adaptación a éstos, la cual se caracteriza por tener una actividad metabólica lenta, como lo señaló Hickey (1995). En esta situación, los microorganismos compiten por nutrientes y fuentes de energía fácilmente disponibles, generando con ello que la población microbiana se mantenga baja. Aquellos microorganismos con mayor capacidad de tolerar concentraciones de contaminantes son capaces de sobrevivir e iniciar el proceso de mineralización. Como resultado de la persistencia del contaminante, algunos microorganismos pueden utilizarlo como fuente de carbono y energía, por lo que se presenta una fase de crecimiento acelerado de la población bacteriana degradadora del contaminante. Pero, como resultado de la reducción de la concentración del contaminante, se favorece el crecimiento de microorganismos con funciones distintas

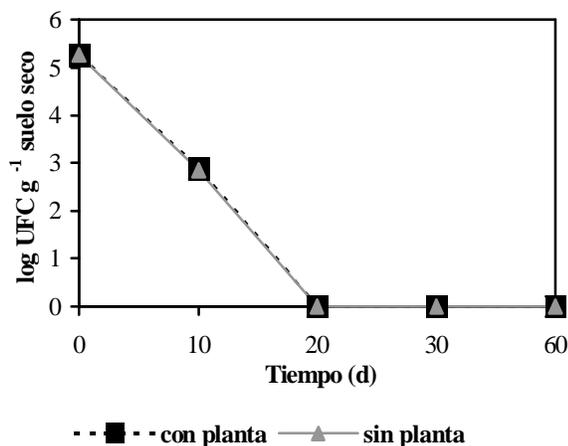


Figura 2. Dinámica poblacional de *Azospirillum brasilense* cd. con presencia o no del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*), en arena contaminada con 30 mg kg⁻¹ de fenantreno.

de la degradación del mismo. Por otra parte, se ha mencionado que la actividad microbiana con capacidad de degradar contaminantes orgánicos depende, en gran medida, de la especie vegetal que se utilice. En suelos contaminados con diversos hidrocarburos del petróleo, la población microbiana fue de 4 y 1 x 10⁷ UFC g⁻¹ de suelo seco de la rizosfera de alfalfa y pasto azul (*Poa alpina*), respectivamente; después, se presentó un aumento en la población microbiana total, conforme los hidrocarburos de petróleo disminuyeron (Nichols *et al.*, 1997). Saval (1995) mencionó que la exposición prolongada de los microorganismos a los contaminantes en el suelo ocasiona que muchas bacterias expresen su capacidad enzimática para degradarlos. La paulatina disminución de la población de las bacterias inoculadas en los tratamientos puede asociarse a dos posibles causas que deben estudiarse en trabajos posteriores. La primera, al efecto tóxico de los compuestos intermediarios en la degradación del fenantreno hacia las bacterias inicialmente inoculadas; por ejemplo, se ha reportado que uno de los primeros compuestos intermediarios en la degradación aeróbica de los anillos aromáticos del pireno (cis-4,5-dihidro-4,5-dihidroxipireno) puede tener efectos negativos sobre diferentes aislados bacterianos, como *Sphingomonas* y *Pseudomonas* (Kazunga y Aitken, 2000). La segunda causa se refiere al crecimiento de microorganismos con funciones distintas de la degradación del fenantreno que se favorecen con la reducción de la concentración del contaminante en el sustrato. Merckl *et al.* (2006), en estudios con suelos contaminados con petróleo, en los cuales se estableció la gramínea *Brachiaria brizantha*, mencionaron que

la planta incrementó el tamaño de la población de los grupos microbianos evaluados, con excepción de la población de bacterias, la cual o no se afectó o, inclusive, se redujo en algunas fechas de muestreo. Lo anterior pudo estar asociado a que el pH del suelo disminuyó en los tratamientos con planta, en comparación con los testigos sin planta. Debido a que los hongos prefieren los pH ácidos, en este estudio la degradación de petróleo estuvo dominada por la actividad fúngica y la actividad bacteriana fue menor.

Degradación del Fenantreno en la Rizosfera de Pasto Alemán

La menor vida media del fenantreno se obtuvo en todos los tratamientos con planta. De acuerdo con los valores obtenidos en el tratamiento con planta y sin inoculación de bacterias, el pasto alemán posee la capacidad para retirar el fenantreno del sustrato; sin embargo, los mecanismos fisiológicos por los cuales se lleva a cabo esto, no se han precisado. Por otra parte, a 30 DDI, al asociar esta planta con el consorcio de microorganismos o con *A. brasilense* cd., la degradación del contaminante se incrementa; es decir, la vida media del contaminante se reduce (Cuadro 1).

En el caso del tratamiento sin inoculación bacteriana y sin pasto alemán, se presentó una vida media del fenantreno de 62.2 días. Esto puede deberse a la presencia de MNI que fueron capaces de contaminar el sustrato a partir del Día 30 después de la inoculación. Probablemente, estas bacterias accedieron al sustrato por el orificio de riego o por el de salida del pasto alemán. No obstante, factores como las propiedades abióticas del suelo, depósito de microorganismos del ambiente externo, así como la complejidad de los métodos utilizados en la determinación de contaminantes en el suelo (Mehmannavaz *et al.*, 2002), pudieron haber influido en la semidesaparición del contaminante en dicho tratamiento (Cuadro 1).

A 60 días, los tratamientos sin planta e inoculados con *A. brasilense* cd., así como con el consorcio bacteriano, presentaron menor vida media del contaminante ($P \leq 0.05$) en comparación con los tratamientos sin inoculación, con y sin planta (Cuadro 1). En esta fecha, la vida media del fenantreno aumentó, en comparación con los primeros 30 días, en todos los tratamientos; es decir, se desaceleró la tasa de desaparición. En este trabajo se encontró que el consorcio de bacterias degradó menor cantidad de

Cuadro 1. Vida media (tiempo calculado de desaparición de la mitad) del fenantreno (30 mg kg⁻¹) adicionado a la arena en presencia o no del pasto alemán.

Fecha de muestreo	30 DDI		60 DDI		Promedio de muestreos			
	Bloque	Con pasto	Sin pasto	Con pasto	Sin pasto	Con pasto	Sin pasto	Promedio [‡]
Tratamiento	----- d -----							
Sin inocular		40.1 a	52.6 a	56.0 a	71.8 a	48.0 a	62.2 a	55.1 a
Consorcio		38.8 a	47.0 b	50.8 a	66.0 b	44.8 b	56.4 ab	50.6 ab
<i>A. brasilense</i> cd.		34.5 b	41.9 c	52.6 a	65.9 b	43.5 b	53.9 b	48.7 b
Promedio [†]		37.8	47.1 [§]	53.1	67.9 [§]	45.5	57.5 [§]	

DDI = días después de la inoculación. [†] = promedio por bloques, [‡] = promedio por tratamientos. Promedios con la misma letra en la misma columna son estadísticamente iguales y asteriscos ([§]) indican diferencias por efecto del pasto (Tukey, $\alpha = 0.05$).

fenantreno, en comparación con el efecto obtenido con la cepa *A. brasilense* cd. Este efecto fue contrario a lo observado por Pérez-Vargas *et al.* (2002) y Harayama, *et al.* (1996), quienes mencionaron que la inoculación de consorcios microbianos estimula, en mayor proporción la degradación de diferentes componentes del petróleo en comparación con cepas puras. Por otra parte, hay reportes con respecto a la capacidad de degradación de HPA por efecto de la inoculación de consorcios bacterianos y cepas puras. Por ejemplo, Kilbane (1998) mencionó que un consorcio bacteriano, en condiciones *in vitro*, la degradación fue de 55% de HPA en 14 días, mientras que, a 42 días, la degradación fue de 78%; valores casi dos veces mayores de la degradación por las cepas sin asociar. En el presente estudio, la degradación fue mayor con la inoculación de *A. brasilense* cd., en comparación con la obtenida con el consorcio bacteriano, pero sólo en los primeros 30 días (Cuadro 1).

Más de 50% (vida media de 53.1 días) del fenantreno en la arena desapareció en los tratamientos con presencia del pasto alemán en los primeros 60 días; en los tratamientos sin planta, la degradación del contaminante fue menor de 45% (vida media de 67.9 días). Debe considerarse, también, en la degradación del contaminante, la contribución del sistema radical de la planta que se utilizó en este experimento, ya que a 30 y 60 DDI la vida media del fenantreno se redujo por efecto de la presencia de la planta 9.7 y 14.8 días, respectivamente. Los tratamientos con la presencia del pasto alemán tuvieron menor ($P \leq 0.05$) vida media del fenantreno en comparación con los tratamientos sin planta (Cuadro 1). April y Sims (1990) y Binet *et al.* (2000b) indicaron que una de las ventajas de utilizar pastos en fitorremediación es su abundante sistema radical, comparado con el de leguminosas, lo cual influye en mayor superficie de suelo

explorado y, con ello, un incremento de la degradación de HPA. Lee y Banks (1993) indicaron que el número de microorganismos en un suelo contaminado con 100 mg de HPA kg⁻¹ de suelo seco fue mayor en presencia de planta que sin ésta. En las condiciones experimentales del presente trabajo, la tendencia fue contraria, ya que no se observó la estimulación de los microorganismos inoculados por el efecto de la rizosfera, de acuerdo con lo reportado por López-Ríos (1992) y Ferrera-Cerrato (2000), sobre todo después del Día 10, cuando la población bacteriana alcanzó su máximo crecimiento en todos los tratamientos. Siciliano *et al.* (2001) mencionaron que las plantas pueden estimular la presencia de genotipos bacterianos capaces de degradar contaminantes en la rizosfera y rizoplasma de las plantas. De esta forma, las bacterias podrían, a su vez, proteger a la planta de los efectos tóxicos de los contaminantes. En este estudio, la rizosfera del pasto alemán no favoreció la actividad de las bacterias inoculadas. Jackson y Pardue (1997) mencionaron que la aplicación de nutrimentos, como N, P y Fe, estimuló significativamente la degradación de hexadecano y fenantreno. Indicaron, además, que la disponibilidad de nutrimentos podría ser un factor determinante en la degradación de HPA, por acción de microorganismos.

Pérez-Vargas *et al.* (2001) demostraron que una cepa del género *Azomonas*, fijadora de N atmosférico, fue capaz de utilizar queroseno como única fuente de carbono, contribuyendo con una degradación del mismo entre 40 y 50%, en 13 días de cultivo *in vitro*. En el caso de fenantreno, dada su naturaleza química, su vida media en el suelo es de 16 a 126 días (Kanaly y Harayama, 2000), dependiendo de las condiciones abióticas y presencia de organismos capaces de degradarlo. Con base en lo anterior y dada la vida media del fenantreno en este experimento, que fue de 57.5 días sin planta y 45.5 días con planta (Cuadro 1), puede

considerarse que *E. polystachya* posee un buen potencial para utilizarse en fitorremediación de fenantreno, en comparación con otras plantas que se han reportado en la literatura, como *Medicago sativa* (Mehmannavaz *et al.* 2002), diferentes gramíneas (April y Sims, 1990) o *Lolium perenne* (Binet *et al.*, 2000a). No obstante, no debe olvidarse que, además de la degradación de contaminantes por la rizosfera, se llevan a cabo otros procesos que influyen en que se sobreestime o subestime dicha degradación, como lo son los procesos de adsorción y absorción de HPA, tanto en suelo, como en planta (Schwab *et al.*, 1998). En este sentido, se recomienda realizar estudios relacionados con la evaluación de estos dos procesos que influyen en la determinación de la mineralización de contaminantes orgánicos en el suelo.

CONCLUSIONES

- La rizosfera de *E. polystachya* favoreció la degradación del fenantreno a 30 y 60 días después de la inoculación (DDI). La población de todas las bacterias inoculadas comenzó a disminuir a partir de 20 DDI, sin importar el origen de su aislamiento. La presencia de bacterias diferentes de las inoculadas (MNI) se registró a 30 DDI, momento en el cual la degradación del fenantreno estaba entre 27 y 45%, en todos los tratamientos.
- El pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) posee un buen potencial para utilizarse en fitorremediación de suelos contaminados con fenantreno.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo forma parte del proyecto SEMARNAT-CONACYT 2002-C01-0023, "Microorganismos simbióticos de la rizosfera de leguminosas y gramíneas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo".

LITERATURA CITADA

- April, W. y R. C. Sims. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
- Binet, P., J. M. Portal y C. Leyval. 2000a. Fate of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in the rhizosphere and mycorrhizosphere of ryegrass. *Plant Soil* 227: 201-213.
- Binet, P., J. M. Portal y C. Leyval. 2000b. Dissipation of 3-6 ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. *Soil Biol. Biochem.* 32: 2011-2017.
- Boonchan, S., M. L. Britz y G. A. Stanley. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007-1019.
- Bossert, I. y R. Bartha. 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. pp. 435-473. *In: R.M. Atlas (ed.). Petroleum microbiology.* McMillan. Nueva York, NY, USA.
- Cámara, O. A. 1992. Biología molecular y metabolismo de degradación de suelos contaminados con pesticidas. *Revista del Departamento de Investigación y Estudios de Postgrado, Instituto Tecnológico de Sonora* 1: 47-64.
- Devare, M. y M. Alexander. 1995. Bacterial transport and phenanthrene biodegradation in soil and aquifer sand. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 59: 1316-1320.
- Fernández, L. L. 2000. Tecnologías de biorremediación en suelos. pp. 700-705. *In: R. Quintero-Lizaola, T. Reyna-Trujillo, L. Corlay-Chee, A. Ibáñez-Huerta y N. E. García-Calderón (eds.). La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Investigaciones y educación hacia la sostenibilidad edáfica para el tercer milenio. Tomo II. Colegio de Postgraduados-Universidad Autónoma de México-Universidad Autónoma de Chapingo. Montecillo, estado de México.*
- Ferrera-Cerrato, R. 2000. Microorganismos de la rizosfera y su potencial en la degradación de hidrocarburos. pp. 706-713. *In: R. Quintero-Lizaola, T. Reyna-Trujillo, L. Corlay-Chee, A. Ibáñez-Huerta y N. E. García-Calderón (eds.). La edafología y sus perspectivas al siglo XXI. Investigaciones y educación hacia la sostenibilidad edáfica para el tercer milenio. Tomo II. Colegio de Posgraduados-Universidad Autónoma de México-Universidad Autónoma Chapingo. Montecillo, estado de México.*
- Field, J. A., H. Baten, F. Boelsma y W. H. Rulkens. 1996. Biological elimination of polycyclic aromatic hydrocarbons in solvent extracts of polluted soil by the white rot fungus, *Bjerkandera* sp. strain B0555. *Environ. Technol.* 17: 317-323.
- Harayama, S., K. Venkateswaran, H. Toki, S. Komukai, M. Goto, H. Tanaka y M. Ishihara. 1996. Degradation of crude oil by marine bacteria. *J. Marine Biotechnol.* 3: 239-243.
- Hernández A., E., R. Ferrera-Cerrato y R. Rodríguez V. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en la rizosfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra* 21: 81-89.
- Hickey, W. J. 1995. Soil ventilation: effects on microbial populations in gasoline-contaminated soil. *J. Environ. Qual.* 24: 571-582.
- Jackson, A. y J. H. Pardue. 1997. Seasonal variability of crude oil respiration potential in salt and fresh marshes. *J. Environ. Qual.* 26: 1140-1146.
- Joergensen, R. C., F. Schmaedeke, K. Windhorst y B. Meyer. 1995. Biomass and activity of microorganisms in a fuel oil contaminated soil. *Soil Biol. Biochem.* 27: 1137-1143.
- Kanally, R. A. y S. Harayama. 2000. Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J. Bacteriol.* 182: 2059-2067.
- Kazunga, C. y M. D. Aitken. 2000. Products from the incomplete metabolism of pyrene by polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1917-1922.

- Kilbane, J. J. 1998. Extractability and subsequent biodegradation of PAHs from contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 104: 285-304.
- Lee, E. y M. K. Banks. 1993. Bioremediation of petroleum contaminated soil using vegetation; a microbial study. *J. Environ. Sci. Health* 10: 2187-2198.
- López-Ríos, G. F. 1992. *Microbiología agrícola*. Universidad Autónoma Chapingo. Chapingo, estado de México.
- Maliszewska, B. y B. Smreczak. 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)–effect on plants. *Environ. Technol.* 21: 1099-1110.
- Meharg, A. A. y J. W. G. Cairney. 2000. Ectomycorrhizas-extending the capabilities of rhizosphere remediation? *Soil Biol. Biochem.* 32: 1475-1484.
- Mehmannavaz, R., S. O. Prasher y D. Ahmad. 2002. Rhizospheric effects of alfalfa on biotransformation of polychlorinated biphenyls in a contaminated soil augmented with *Sinorhizobium meliloti*. *Process Biochem.* 37: 955-963.
- Merkel, N., R. Schultze y M. Arias. 2006. Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. Ex A. Rich) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil. *Microbiol. Res.* 161: 80-91.
- Nichols, T. D., D. C. Wolf, H. B. Rogers, C. A. Beyrouthy y C. M. Reynolds. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 95: 165-178.
- Oudot, J., J. Dupont, S. Haloui y M. F. Roquebert. 1993. Biodegradation potential of hydrocarbon -assimilating tropical fungi. *Soil Biol. Biochem.* 25: 1167-1173.
- Pérez-Vargas, J., H. M. Poggi-Valardo, G. Calva-Calva, A. Albores, R. Rodríguez-Vázquez, F. Esparza-García y R. Ferrera-Cerrato. 2001. *Azomonas* is a Nfb capable to use kerosene as a carbon source. *Water Sci. Technol.* 5-6: 219-226.
- Pérez-Vargas, J., R. Ferrera-Cerrato, R. Rodríguez-Vázquez, H. M. Poggi-Valardo y F. Esparza. 2002. Importancia de los microorganismos fijadores de nitrógeno en la degradación de hidrocarburos del petróleo. *Rev. Latinoamer. Microbiol.* 44: 154.
- Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vázquez. 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36: 149-160.
- Salmon, C., J. L. Crabos, J. P. Sambuco, J. M. Bessiere, A. Basseres, P. Caumette y J. C. Baccou. 1998. Artificial wetland performances in the purification efficiency of hydrocarbon wastewater. *Water Air Soil Pollut.* 104: 313-329.
- SAS Institute. 1996. *SAS/STAT guide for personal computers*. SAS Institute. Cary, NC, USA.
- Saval, S. 1995. Remediación y restauración. pp. 151-189. *In: PEMEX: ambiente y energía; los retos del futuro. Serie E: (varios)* 69. UNAM-PEMEX. México, D. F.
- Saval, S. 1997. Biorremediación de un suelo contaminado con diesel. *Ingeniería y Ciencias Ambientales* 33: 24-30.
- Schwab, A. P., A. A. Al-Assi y M. K. Banks. 1998. Adsorption of naphtalene onto plant roots. *J. Environ. Qual.* 27: 220-224.
- Schwab, A. P., J. Su, S. Wetzell, S. Pekarek y M. K. Banks. 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* 33: 1940-1945.
- Shuttleworth, K. L. y C. E. Cerniglia. 1995. Environmental aspects of PAH degradation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 54: 291-302.
- Siciliano, S. D. y J. J. Germida. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Rev.* 6: 65-79.
- Siciliano, S. D., N. Fortín, A. Mihoc, G. Wisse, S. Labelle, D. Beaumier, D. Ouellette, R. Roy, L. G. Whyte, M. K. Banks, P. Schwab, K. Lee y C. W. Greer. 2001. Selection of specific endophytic bacterial genotypes by plants in response to soil contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 2469-2475.
- Summerfield, J., P. A. Huxley y F. R. Minchin. 1977. Plant husbandry and management techniques for growing grain legumes under simulated tropical conditions in controlled environments. *Exp. Agric.* 13: 81-92.