

## Nota técnica

# BIODEGRADACIÓN DE QUEROSENO EN LA RIZÓSFERA DE GRAMÍNEAS EN CONDICIONES DE INVERNADERO

Elizabeth García<sup>1</sup>\*, Ronald Ferrera<sup>\*\*</sup>, Juan José Almaráz<sup>\*\*</sup>, Refugio Rodríguez<sup>\*\*\*</sup>, Edelmira García<sup>\*</sup>

**Palabras clave:** Hidrocarburos, contaminación, gramíneas, poblaciones microbianas.

**Keywords:** Hydrocarbons, contamination, grasses, microbial populations.

Recibido: 04/03/13

Aceptado: 24/06/13

## RESUMEN

El queroseno afecta de manera negativa la actividad biológica del suelo, así como el crecimiento y desarrollo de las plantas. Para analizar lo anterior, se evaluó este contaminante en avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), pasto (*Chloris gayana*) y trigo (*Triticum aestivum*), en las poblaciones microbianas de la rizósfera y el rizoplano, así como el porcentaje de degradación del contaminante en suelo rizosférico. Se empleó un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 4, con 8 tratamientos y 5 repeticiones en cada uno. Los factores fueron dosis de queroseno (0 y 2000 mg.kg<sup>-1</sup>) y especie de planta. A los 56 días de haber establecido el experimento, el suelo contaminado redujo de manera significativa ( $p \leq 0,05$ ) el área foliar, la materia seca total y el volumen radical de las 4 gramíneas, con respecto a las establecidas en el suelo sin contaminar. En el suelo contaminado se incrementaron las poblaciones de bacterias totales en el rizoplano y la rizósfera de las plantas; mientras que las que emplearon el hidrocarburo como fuente de carbono se incrementaron en el rizoplano. La colonización micorrízica fue del 28,8 al 15,7% y al contaminar el suelo se redujo del 11,4 al 5%; sin embargo, el hongo

## ABSTRACT

**Kerosene biodegradation in the grasses' rizosphere under greenhouse conditions.** Kerosene affects in a negative way the soil biological activity, also the growth and development of the plant. To examine the aforesaid, this contaminant was evaluated in oats plants (*Avena sativa*), barley (*Hordeum vulgare*), grass (*Chloris gayana*) and wheat (*Triticum aestivum*), in the microbial populations of the rizosphere and rhizoplane. Also determined was the contaminant's degradation percentage in the rizospheric soil of the different grasses. A completely at random experimental design with a 2x4 factorial arrangement, was used, with 8 treatments and 5 repetitions each. The factors were kerosene doses (0 and 2000 mg.kg<sup>-1</sup>) and plant species. At 56 days after establishment of the experiment, the contaminated soil reduced significantly ( $p \leq 0,05$ ), the foliar area, the total dry matter and the root volume of the 4 grasses, compared to those established in soil without contamination. In the contaminated soil the total microbial populations in the rhizoplane and the plant rizosphere increased; while those that used the hydrocarbon as carbon source increased in the rhizoplane. The mycorrhizal colonization

1 Autor para correspondencia. Correo electrónico: gallegoseg@hotmail.com

\* Centro de Investigación en Genética y Ambiente de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Tlaxcala, México.

\*\* Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, Estado de México.

\*\*\* Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV-Instituto Politécnico Nacional, México, D.F.

endomicorrízico realizó sus funciones aun con la presencia del hidrocarburo en el suelo. La rizósfera de avena permitió una degradación de queroseno del 84,4%, mientras que la de pasto sólo del 39,6%. Es conveniente ampliar los estudios rizosféricos con otro contaminante orgánico para determinar la efectividad de la rizósfera de avena y evaluar si el hidrocarburo se acumula en sus tejidos.

## INTRODUCCIÓN

La actividad petrolera en México es de suma importancia por las divisas que genera; sin embargo, es una fuente potencial de contaminación, en donde los mayores problemas ocurren durante la explotación, la refinación, el almacenamiento y el transporte (Pérez et ál. 2000). Uno de los compuestos derivados del petróleo es el queroseno, el cual al derramarse en el suelo se convierte en un contaminante que afecta de manera negativa sus propiedades. El queroseno es una mezcla compleja de hasta 260 compuestos alifáticos y aromáticos (C6-C17, más posiblemente 2000 formas isoméricas), que incluye diversas concentraciones de tóxicos potenciales, tales como el benceno, n-hexano, tolueno, xileno, trimetilpentano, metoxietanol y algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos como el naftaleno y n-propilbenceno e isómeros como el trimetilbenceno (Ritchie et ál. 2003).

La rizósfera de las plantas proporciona condiciones favorables para las poblaciones microbianas y su diversidad, constituida principalmente por bacterias y hongos, provee un microambiente complejo y dinámico, donde la microflora en asociación con las raíces forman comunidades únicas que responden a exudados radicales (López et ál. 2005). La endomicorriza es una simbiosis mutualista entre plantas y hongos, facilita la absorción de nutrimentos al aumentar el volumen de absorción de la raíz,

went from 28.8 to 15.7%, and when the soil was contaminated it was reduced from 11.4 to 5%; however, the endomycorizal fungus performed its functions even with the hydrocarbon present in the soil. The oats rizosphere allowed a kerosene degradation of 84.4%, while that of the grass only 39.6%. It is convenient to expand the rizospheric studies with another organic contaminant, to determine the oats' rizospheric effectiveness and to evaluate if the hydrocarbon is accumulated in its tissues.

y mejora el establecimiento y desarrollo de las plantas en suelos contaminados (Gaspar et ál. 2002). La intensidad del daño a las plantas y la capacidad para la degradación a través de la rizósfera dependen de la concentración y tipo del contaminante, la especie vegetal, la edad, sus exudados, el tipo de suelos y sus propiedades (Chaíneau et ál. 2000, Ferrera et ál. 2007). Yateem et ál. (2000) investigaron la degradación de hidrocarburos totales del petróleo en un suelo rizosférico de alfalfa (*Medicago sativa*), haba (*Vicia faba*) y pasto Ryegrass (*Lolium perenne*), aunque las plantas exhibieron un crecimiento normal con el 1% de hidrocarburos en el suelo; la degradación fue mayor en alfalfa y haba con el 36,6 y 35,6%, respectivamente, comparado con el 24% de la rizósfera de pasto. Por otro lado, Pérez et ál. (2000) y Hernández et ál. (2003) mencionaron que en la rizósfera de frijol contaminada con queroseno se encuentran poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico capaces de utilizar al contaminante como fuente de carbono y energía, lo que las coloca como microorganismos biodegradadores (hidrocarbonoclastas). Quiñones et ál. (2003) reportaron que una concentración de 25 000 mg.kg<sup>-1</sup> de petróleo en el suelo favoreció el crecimiento de plántulas de maíz, debido a que en su rizósfera proliferaron rizobacterias, las cuales promueven el crecimiento de las plantas; mientras que con una concentración de 30 000 mg.kg<sup>-1</sup> de petróleo y con la adición de

enmiendas orgánicas, se beneficia el desarrollo de raíz (Marques et ál. 2010).

Por lo anterior, el objetivo del estudio fue evaluar el efecto de 2000 mg.kg<sup>-1</sup> de queroseno sobre el crecimiento y el desarrollo de avena (*Avena sativa*), cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) y pasto Rhodes (*Chloris gayana*), y su degradación en la rizósfera.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló bajo condiciones de invernadero; el suelo se colectó en el campo experimental de Lomas de San Juan, perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo, Municipio de Texcoco, Estado de México. Una vez que el suelo se trasladó al laboratorio, se tomó una muestra para determinar pH, materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, textura, densidad aparente, N-inorgánico, P, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn y Mn, con base en los métodos que establece la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF 2002).

Se emplearon semillas de avena, cebada, trigo y pasto, con un porcentaje de germinación de 80, 85, 95 y 95%, respectivamente. Se agregó a charolas de plástico una mezcla estéril de suelo-germinaza (1:1 v/v) y se colocaron las diferentes semillas. Después de la emergencia de las plántulas (7 días) se realizó el trasplante a macetas. En ese momento se inoculó con la cepa del hongo endomicorrizógeno *Glomus intraradix*, propagado en plantas de sorgo; el inóculo consistió en raíces con 81,7% de colonización total y 680 esporas por 100 g de arena.

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2 x 4 (8 tratamientos con 5 repeticiones en cada uno). Los factores fueron dosis de queroseno (0 y 2000 mg.kg<sup>-1</sup>) y tipo de planta (avena, cebada, pasto y trigo). Para la contaminación del suelo, se realizó una mezcla homogénea de agua y queroseno mediante una agitación rápida, para enseguida incorporarla al suelo. Se trasplantaron las plántulas a cada unidad experimental y al mismo tiempo se agregaron 15 g de inóculo del hongo endomicorrizógeno. El suelo se mantuvo a humedad constante por

56 días. Al término, las plantas se cortaron a ras de suelo, se separaron las hojas para medir el área foliar con un medidor, modelo LI-31000 A LICOR. La raíz se separó de la parte aérea, se lavó con agua destilada y luego se determinó el volumen radical mediante el volumen desplazado de agua por la raíz. Las plantas se secaron a 75°C hasta obtener peso constante. Las raíces libres de suelo de las diferentes gramíneas se colocaron en cápsulas esterilizables y se depositaron en un vaso de precipitado al que se le agregó KOH al 10%, el clareo se realizó en una olla de presión por 10 min a 10 lb. Se retiró el KOH y se agregó H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 10% por 3 min (blanqueo); se realizó un enjuague y se cubrieron las cápsulas con HCl al 10% por 3 min (acidificación); se agregó azul de tripano con lactoglicerol al 0,05% y se colocó el vaso de precipitado con las cápsulas en una olla de presión por 10 min a 10 lb (tinción). Los segmentos de raíz se colocaron en un portaobjetos para observarlos al microscopio óptico; se registró la presencia o ausencia de hifas, vesículas y arbuscúlos para determinar el porcentaje de colonización total (Phillips y Hayman 1970).

Las poblaciones microbianas totales (bacterias, bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre y hongos) y aquellas que toleran queroseno se determinaron por el método de dilución y cuenta viable de unidades formadoras de colonias (UFC) crecidas en cajas Petri con medio de cultivo específico para cada grupo microbiano (Clark 1965 y Parkinson 1982). De los tratamientos se tomaron 10 g de raíz sin lavar (suelo de rizoplano) y 10 g de suelo circundante a la raíz (suelo rizosférico). Para cuantificar bacterias totales se usó agar nutritivo (Marca Baker), para hongos totales papa dextrosa agar (PDA, Marca Baker) y para bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico (BFNA) medio de carbón combinado (Rennie 1981) (por l: 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,8 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 0,1 g NaCl; 4,9 ml FeEDTA; 0,025 g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,2 g MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O; 0,06 g CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 0,1 g extracto de levadura; 5 g manitol; 5 g sacarosa; 0,5 ml lactato de sodio (60% v/v); 5 µg biotina y 10 µg ácido *p*-amino benzoico; pH 7). Para las poblaciones de bacterias

tolerantes al queroseno se usó el medio mineral (Morales 1969) (por l: 5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 2,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,8 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 7 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ; 80  $\mu\text{g}$   $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ; 200  $\mu\text{g}$   $\text{KI}$ ; 400  $\mu\text{g}$   $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 800  $\mu\text{g}$   $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 800  $\mu\text{g}$   $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 400  $\mu\text{g}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 30  $\mu\text{g}$  actidiona; pH 7. Para las bacterias fijadoras de nitrógeno tolerantes al contaminante el medio carbón combinado; modificado por Hernández et ál. (2003) (por l: 0,2 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,8 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ; 0,1 g  $\text{NaCl}$ ; 4,9 ml  $\text{FeEDTA}$ ; 0,025 g  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,2 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,06 g  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 5  $\mu\text{g}$  biotina y 10  $\mu\text{g}$  ácido *p*-amino benzoico; pH 7) y finalmente para las poblaciones de hongos tolerantes a queroseno el medio mineral agar+rosa de bengala (por l: 3 g  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ; 1 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 0,5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ; 0,5 g  $\text{KCl}$ ; 40  $\mu\text{g}$  de estreptomycin; pH 7). En los 3 casos el queroseno se aplicó en papel embebido y adherido en el interior de la contratapa de la caja de Petri. Las cajas se incubaron de 24-72 h a 28°C.

A los 56 días se determinó la degradación del queroseno en suelo rizosférico; la extracción se realizó con hexano grado HPLC (Marca SIGMA) en un equipo soxhlet con un reflujo de 8 h a 69°C. Los extractos se llevaron a sequedad en un rotavapor; luego se agregaron 2 ml de hexano y nuevamente a sequedad; posteriormente se

agregaron 5 ml de iso-octano y se filtraron por un cartucho  $\text{C}_{18}$ . Para la lectura de las muestras se utilizó un cromatógrafo de líquidos (HPLC) marca Varian 9012 con un detector UV-VIS Varian 9050, columna  $\text{C}_{18}$ ; la fase móvil fue acetonitrilo ( $\text{CH}_3\text{CN}$ ) 80% y agua 20% con un flujo de 0,5  $\text{ml min}^{-1}$ , la longitud de onda utilizada para la detección fue de 254 nm (Wild et ál. 1990). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y se usó la prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0,05$ ) con el programa Statgraphics Centurion XVI (StatPoint Technologies 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Efecto del queroseno en la planta

En el Cuadro 1 se presentan los valores de los parámetros edáficos y nutrimentales del suelo utilizado en el experimento.

El suelo presentó una baja fertilidad, el pH fue medianamente alcalino; la materia orgánica, capacidad de intercambio catiónico, N-inorgánico y P se encontraron en concentraciones bajas, K, Ca y Mg fueron aceptables. Fe y Cu se encontraron en niveles adecuados, mientras que Zn y Mn en concentraciones deficientes,

Cuadro 1. Parámetros edáficos y nutrimentales del suelo.

Parámetro	Valor
pH	7,6
Materia orgánica (%)	0,5
Capacidad de intercambio catiónico [ $\text{cmol}(+).\text{kg}^{-1}$ ]	14,5
N-inorgánico ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	2,3
P ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	2,3
K ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	238
Ca ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	3813
Mg ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	730,3
Fe ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	4,8
Cu ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	0,2
Zn ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	0,4
Mn ( $\text{mg}.\text{kg}^{-1}$ )	0,5
Textura	Franco arcillosa

de acuerdo con la clasificación que establece la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF 2002). La textura del suelo empleado presentó un contenido de arcilla importante y con ello una superficie específica mayor que en consecuencia proporciona un incremento en el contacto microorganismo-hidrocarburo. García et ál. (2012) señalan que una textura franco-arcillo-arenosa favorece el proceso de biodegradación de los hidrocarburos totales, particularmente en los componentes saturados, en comparación con el suelo de textura arenosa.

Las plantas a los 56 días presentaron una reducción significativa ( $p \leq 0,05$ ) en área foliar, materia seca y volumen radical cuando se contaminó el suelo. En el suelo sin contaminar se encontraron diferencias estadísticas ( $p \leq 0,05$ ) entre las especies de plantas para las 3 variables estudiadas (Cuadro 2). La interacción especie de planta X dosis fue significativa ( $p \leq 0,05$ ) en todas las variables, lo que indica que por lo menos alguna de las especies evaluadas es más sensible

al efecto negativo del queroseno. Las plantas al crecer en el suelo contaminado presentaron una clorosis y reducción en su crecimiento, lo que pudo deberse a la presencia de queroseno, a la deficiencia de nutrimentos en el suelo empleado o a la capa hidrofóbica que forman los hidrocarburos alrededor de la raíz, lo que impide la absorción de nutrimentos y agua (Gaspar et ál. 2002). Con una concentración de queroseno de  $400 \text{ mg.kg}^{-1}$ , Pérez et ál. (2010) reportaron que plantas de maíz presentaron una mayor altura; sin embargo, existió un menor desarrollo radical. Thompson et ál. (2008) reportaron que en suelos contaminados con pireno  $1000 \text{ mg.kg}^{-1}$  el pasto *Cynodon dactylon* L., tuvo una reducción en el crecimiento del tallo, biomasa radical y la longitud de la raíz. Por otro lado, las plantas de trigo y maíz son gramíneas que mostraron un mayor crecimiento en un suelo contaminado con una mezcla de hidrocarburos (1% diesel/aceite) a diferencia de lo encontrado en este trabajo con la planta de trigo.

Cuadro 2. Variables agronómicas de avena, cebada, pasto y trigo a los 56 días en un suelo sin contaminar y contaminado con queroseno.

Queroseno ( $\text{mg.kg}^{-1}$ )	Planta	Área foliar ( $\text{cm}^2$ )	Materia seca (g)	Volumen radical ( $\text{cm}^3$ )
0	Avena	138,4±11,1 b	5,9±0,4 a	10,3±0,3 b
	Cebada	115,3±12,6 b	3,6±0,5 b	10,9±0,1 b
	Pasto	506,9±23,6 a	5,4±0,1 a	20,7±0,7 a
	Trigo	122,6±7,6 b	4,9±0,3 ab	10,7±0,2 b
2000	Avena	4,2±0,7 b	0,1±0,03 a	1,5±0,2 c
	Cebada	11,3±1,3 a	0,1±0,02 ab	4,0±0,1 a
	Pasto	0,8±0,3 c	0,05±0,01 b	0,7±0,05 d
	Trigo	3,7±0,1 bc	0,1±0,0 b	2,3±0,1 b
Factores				
	Planta (A)	0,00	0,00	0,00
	Queroseno (B)	0,00	0,00	0,00
	Interacción de A y B	0,05	0,003	0,05

Letras diferentes en la columna por dosis indican que existe una diferencia estadísticamente significativa. Prueba de medias Tukey  $\pm$ EE ( $p \leq 0,05$ ). n=5.

### Poblaciones microbianas

El tipo de planta, la dosis de queroseno y la interacción de ambos factores tuvieron un efecto significativo en la población total de bacterias, las BFNA y los hongos totales ( $p \leq 0,05$ ) tanto en el suelo de rizoplano como en el rizosférico (Cuadro 3). En el suelo de rizoplano sin contaminar, las bacterias fueron significativamente mayores en trigo, las BFNA en cebada y el número de hongos totales en avena ( $p \leq 0,05$ ). En el suelo rizosférico, las bacterias y las BFNA fueron significativamente más altas en el pasto, mientras que los hongos en cebada ( $p \leq 0,05$ ). Por otro lado, en el suelo de rizoplano contaminado las bacterias y hongos totales fueron significativamente mayores en trigo ( $p \leq 0,05$ ) y las poblaciones de BFNA en cebada ( $p \leq 0,05$ ). Al comparar las poblaciones microbianas en el rizoplano entre los tratamientos no-contaminados y contaminados, se observó que la población de bacterias totales

se incrementó substancialmente con la adición de queroseno (Cuadro 3). En tanto, en la rizósfera la población de bacterias fue significativamente mayor en trigo y las BFNA en el pasto; mientras que, los hongos en cebada. La rizósfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde las bacterias y hongos en asociación con las raíces forman comunidades únicas que responden a exudados radicales, los cuales cumplen un papel significativo en la degradación de contaminantes. Algunos compuestos orgánicos exudados por las raíces; por ejemplo, fenólicos, ácidos orgánicos, alcoholes y proteínas son fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento y supervivencia de microorganismos que son capaces de tolerar y degradar contaminantes orgánicos (Hong et ál. 2011). Etuk et ál. (2012) reportan que en un suelo contaminado con queroseno se tuvo un intervalo de  $2,2 \times 10^3$  a  $3,4 \times 10^6$  UFC/g de bacterias y  $1,4 \times 10^2$  a  $2,3 \times 10^4$  UFC/g de hongos, poblaciones menores a las encontradas en este trabajo.

Cuadro 3. Poblaciones microbianas totales en gramíneas a los 56 días.

Queroseno (mg.kg <sup>-1</sup> )	Planta	Rizoplano UFC x 10 <sup>5</sup>			Rizósfera UFC x 10 <sup>5</sup>		
		Bacterias totales	BFN <sup>†</sup>	Hongos totales	Bacterias totales	BFN <sup>†</sup>	Hongos totales
0	Avena	19,7±0,5 b	7,4±0,2 b	32,2±0,8 a	8,1±0,3 ab	6,6±0,2 c	18,8±0,3 b
	Cebada	17,5±0,4 c	10,1±0,2 a	24,8±1,0 b	8,0±0,4 b	10,6±0,3 b	20,4±0,5 a
	Pasto	17,4±0,4 c	7,4±0,2 b	15,8±0,2 c	9,6±0,3 a	13,1±0,3 a	14,8±0,2 c
	Trigo	38,1±0,6 a	9,7±0,3 a	31,6±0,8 a	8,7±0,3 ab	6,2±0,2 c	15,4±0,4 c
2000	Avena	22,1±0,9 c	6,2±0,09 c	6,6±0,06 b	12,8±0,5 d	3,5±0,1 b	5,2±0,06 a
	Cebada	25,6±1,1 c	8,3±0,06 a	5,9±0,1 c	18,9±0,4 c	7,6±0,03 a	5,5±0,1 a
	Pasto	31,3±0,8 b	7,8±0,1 b	4,5±0,1 d	24,9±0,7 b	7,9±0,09 a	2,8±0,09 b
	Trigo	58,6±1,3 a	5,6±0,05 d	7,4±0,09 a	31,1±0,9 a	3,1±0,03 c	5,4±0,1 a
Factores							
Planta (A)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Queroseno (B)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Interacción de A y B		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Letras diferentes en la columna por dosis indican que existe una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de medias Tukey±EE ( $p \leq 0,05$ ). n=5. <sup>†</sup>BFN: Bacterias fijadoras de nitrógeno.

En el Cuadro 4 se observan las poblaciones de microorganismos que utilizan a los hidrocarburos del queroseno como fuente de carbono y energía. En el suelo sin contaminar,

en el rizoplano del pasto se observó un mayor número de bacterias y hongos; mientras que, las BFNA fueron significativamente ( $p \leq 0,05$ ) más altas en avena que en las otras especies. En

Cuadro 4. Poblaciones microbianas totales que emplean el queroseno como fuente de carbono y energía.

Queroseno (mg.kg <sup>-1</sup> )	Planta	Rizoplano UFC x 10 <sup>5</sup>			Rizósfera UFC x 10 <sup>5</sup>		
		Bacterias totales	BFN <sup>†</sup>	Hongos totales	Bacterias totales	BFN <sup>†</sup>	Hongos totales
0	Avena	3,8±0,05 c	19,2±0,2 a	20,2±0,1 c	3,6±0,1 d	5,3±0,05 c	19,2±0,1 a
	Cebada	6,3±0,1 b	15,0±0,1 c	21,5±0,4 bc	6,0±0,1 c	6,0±0,08 b	20,2±0,2 a
	Pasto	9,4±0,1 a	16,3±0,1 b	25,1±0,3 a	8,4±0,1 a	8,2±0,1 a	21,2±0,2 a
	Trigo	6,5±0,08 b	12,3±0,1 d	22,3±0,4 b	7,2±0,1 b	5,6±0,09 c	20,9±0,3 a
2000	Avena	7,1±0,3 b	10,8±0,2 a	13,5±0,3 a	4,1±0,3 b	3,3±0,2 b	6,2±0,2 a
	Cebada	6,2±0,3 b	10,3±0,3 a	9,6±0,3 b	1,1±0,1 d	3,7±0,3 ab	7,0±0,1 a
	Pasto	11,7±0,3 a	10,4±0,3 a	9,3±0,3 b	2,3±0,2 c	3,9±0,2 ab	7,0±0,1 a
	Trigo	6,1±0,3 b	10,5±0,2 a	10,3±0,2 b	7,0±0,2 a	4,4±0,2 a	6,2±0,2 a
Factores							
Planta (A)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Queroseno (B)		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Interacción de A y B		0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

Letras diferentes en la columna por dosis indican que existe una diferencia estadísticamente significativa.

Prueba de medias Tukey±EE ( $p \leq 0,05$ ). n=5. <sup>†</sup>BFN: Bacterias fijadoras de nitrógeno.

la rizósfera, las bacterias y las BFNA fueron significativamente mayores en el pasto y no existieron diferencias significativas entre plantas con respecto a las poblaciones totales de hongos. Con 2000 mg.kg<sup>-1</sup> de queroseno las poblaciones totales de bacterias fueron mayores en el rizoplano del pasto, con respecto a las otras gramíneas y no existieron diferencias significativas entre plantas con respecto a las poblaciones de BFNA; en cambio, las poblaciones de hongos fueron más altas en avena ( $p \leq 0,05$ ). En el suelo rizosférico, las mayores poblaciones de bacterias y BFNA se presentaron en el pasto y no hubo diferencias significativas entre especies de plantas, con respecto a la población de hongos totales ( $p \leq 0,05$ ). Los consorcios microbianos (bacterias y hongos) aislados de la rizósfera de especies vegetales han probado su eficiencia en la biodegradación de hidrocarburos (Mikesková et ál. 2012). Sin embargo, se reportan bacterias de los géneros *Sphingobacterium* sp., *Bacillus* sp., y *Achromobacter* sp., aisladas de la rizósfera de maíz (Marques et ál. 2010), *Pseudomonas aeruginosa* AT18 (Pérez et ál. 2010) y *Pseudomonas* sp., bacteria que se desarrolla favorablemente en un

suelo con 6400 mg.kg<sup>-1</sup> de queroseno (Kabelitz et ál. 2009), *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 (Pd 2112) y *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386 (Nh 2386) (Kalme et ál. 2008), *Cladosporium*, *Candida*, *Bacillus* y *Microoccus* (Etuk et ál. 2012) que toleran y son capaces de realizar su metabolismo a través del empleo de los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono y energía. Respecto a las BFNA, se ha reportado que *Azotobacter nigricans* (García et ál. 2009), *Nitrosomonas* y *Nitrobacter* (John y Okpokwasili 2012), son bacterias nitrificantes capaces de utilizar el queroseno como fuente de carbono. Por otro lado, Muratova et ál. (2005) reportaron que poblaciones de *Azospirillum* sp., aisladas de la rizósfera de la planta de trigo incrementaron la degradación de los hidrocarburos del petróleo, además de promover el desarrollo del sistema radical.

En la Figura 1 se muestra que en el suelo sin contaminar el pasto y avena presentaron el mayor porcentaje de colonización micorrízica, respecto a lo encontrado en las plantas de cebada y trigo ( $p \leq 0,05$ ). En cambio, con la presencia de queroseno, las plantas de cebada y avena tuvieron

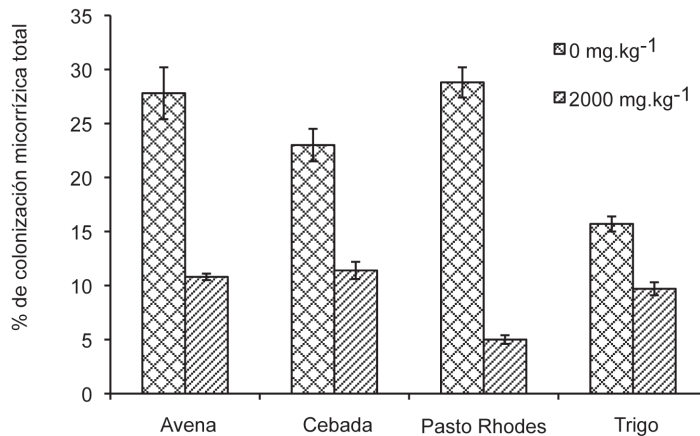


Fig. 1. Colonización micorrízica total en avena, cebada, pasto y trigo a los 56 días en suelo no contaminado y contaminado con queroseno. Media Tukey $\pm$ EE.

una colonización por el hongo *Glomus intraradix* significativamente mayor que en las plantas de trigo y pasto.

Por lo que con base en estos resultados, las gramíneas cebada y avena se pueden considerar para incrementar la biodegradación de sitios contaminados por queroseno. En este sentido, Chen et ál. (2013) mencionan que actualmente la rizoremediación es un proceso de degradación complejo con múltiples interacciones que involucra a la raíz, el suelo rizosférico y los microorganismos, entre los que se incluyen a los hongos endomicorrízicos arbusculares. Joner y Leyval (2001) al evaluar la colonización micorrízica con el hongo *Glomus mosseae* P2, BEG69 en el pasto Ryegrass establecido en un suelo contaminado con una mezcla de 500 mg.kg<sup>-1</sup> de antraceno, 500 mg.kg<sup>-1</sup> de criseno y 50 mg.kg<sup>-1</sup> de dibenzo(a,h) antraceno, encontraron una colonización total del 4%, menor a lo reportado en este trabajo con el pasto Rhodes y *Glomus intraradix*. Alarcón et ál. (2006) reportaron que la disipación del benzo[a]pireno de la rizosfera fue mayor en plantas no inoculadas en comparación con plantas micorrizadas con *Gigaspora margarita*. *Echinochloa polystachya* (pasto alemán) al parecer tiene una capacidad intrínseca para disipar benzo[a]pireno de su rizosfera. Gaspar et ál. (2002) y Verdin et

ál. (2006) mencionaron que *Glomus geosporum* y *Glomus intraradices* pueden absorber fenantreno y antraceno del suelo y acumularlo en sus esporas. Sin embargo, cuando se absorbe por las hifas el contaminante no se degrada, se mantiene sin modificaciones; por lo que al inmovilizarse el contaminante en las esporas se reduce la concentración alrededor de las raíces de las plantas.

### Degradación de queroseno

A los 56 días se observó una degradación de queroseno en avena del 84,4% y en cebada del 81,5%; mientras que en pasto fue del 39,6% y en trigo del 25,3%. Estos resultados indican que en la rizósfera de avena y cebada existe una degradación importante del queroseno, posiblemente el hongo endomicorrízico y las poblaciones microbianas tuvieron un papel fundamental en la transformación de los hidrocarburos del contaminante, debido a que generan compuestos intermediarios que pueden subsecuentemente ser empleados por los propios microorganismos o beneficiar a otros, al establecer entre ellos relaciones sinérgicas que generan un proceso de degradación mayor. Pérez et ál. (2010) evaluaron la degradación de 200 mg.kg<sup>-1</sup> de antraceno a través de la rizósfera de maíz. A los 30 días se logró una degradación



del 54,9%. En otro estudio, se reporta que en la rizósfera de maíz existió una degradación de diesel del 84,5% y al inocular el suelo con la bacteria *Gordonia* sp. S2RP-17 más la presencia de la planta existió una degradación del 95,8%, por lo que ambos, la planta de maíz y *Gordonia* sp. S2RP-17 son una prometedora estrategia para incrementar la eficiencia de la degradación de suelos contaminados por diesel (Hong et ál. 2011). Diab (2008) reportó que en la rizósfera de maíz y trigo existió una biodegradación de hidrocarburos totales de petróleo del 16,8% y 13,7%, respectivamente, menor que lo reportado en este trabajo con avena y cebada. A los 60 días después de haber inoculado *Azospirillum brasilense* a un suelo contaminado con 30 mg.kg<sup>-1</sup> de fenantreno, la rizósfera del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) presentó una degradación del 57% (Martínez et ál. 2007). Agarry et ál. (2010) mencionaron que una baja población microbiana en un proceso de degradación se puede deber a la deficiencia de nutrimentos en el suelo, los cuales son necesarios para el crecimiento bacteriano e incrementar la biodegradación. En este sentido, Ghulam et ál. (2008) evaluaron la biodegradación de queroseno en el suelo (4% p/p) con un cultivo bacteriano mixto estimulado con la adición de N, P y K. A las 6 semanas se obtuvo una degradación del 65% y el contenido de N se redujo del 54 al 24%, el P de 43 al 3% y del K de 35 al 2%.

## CONCLUSIONES

El queroseno provocó una disminución significativa del área foliar, la materia seca y el volumen radical de las gramíneas; aun así se estableció la simbiosis micorrízica y existió un crecimiento importante en la zona de rizoplaneo y rizósfera de bacterias totales capaces de utilizar al queroseno como fuente de carbono y energía lo que causó una degradación del contaminante, por lo que la avena, cebada, trigo y el pasto tienen la capacidad de degradar a través de su rizósfera contaminantes orgánicos, pero al ser plantas comestibles es importante evaluar la concentración del contaminante en los diferentes tejidos,

además de ampliar los estudios rizosféricos con otro tipo de hidrocarburo para poder determinar la efectividad de la rizósfera, principalmente de avena con propósitos de fitorremediación.

## LITERATURA CITADA

- AGARRY S.E., OWABOR C.N., YUSUF R.O. 2010. Studies on biodegradation of kerosene in soil under different bioremediation strategies. *Bioremediation J.* 14:135-141.
- ALARCÓN A., DELGADILLO J., FRANCO A., DAVIES F.T., FERRERA C.R. 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo[a]pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22(1):39-47.
- CHAÍNEAU C.H., MOREL J.L., OUDOT J. 2000. Bioremediation and biodegradation of fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere of maize. *J. Environ. Qual.* 29:569-578.
- CHEN J., XU Q.X., SU Y., SHI Z.Q., HAN F.X. 2013. Phytoremediation of organic polluted soil. *J. Bioremed. Biodeg.* 4:132-134.
- CLARK F.E. 1965. Agar plate method for total microbial count, pp. 1460-1466. In: C.A. Black (ed.). *Methods of soil analysis. Agronomy N° 9. Part 2.* American Society of Agronomy, Madison, WI.
- DIAB E.A. 2008. Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the rhizosphere effects of some plants. *Res. J. Agricul. Biol. Sci.* 4:604-610.
- DIARIO OFICIAL DE LA FEDERACIÓN (DOF). 2002. NOM-021-RECNAT-2000. Norma oficial Mexicana que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis. 31 de diciembre 2002. 85 p.
- ETUK C.U., JHON R.C., EKONG U.E., AKPAN M.M. 2012. Growth study and hydrocarbonoclastic potential of microorganisms isolated from aviation fuel spill site in Ibeno, Nigeria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 89:727-732.
- GARCÍA E.G., CALVA C.G., FERRERA C.R., FERNÁNDEZ L.L.C., RODRÍGUEZ V.R., ESPARZA G.F.J. 2009. Encystment of *Azotobacter nigricans* grown diazotrophically on kerosene as sole carbon source. *Arch. Microbiol.* 191:275-281.
- GARCÍA M.A.G., INFANTE C., LÓPEZ L. 2012. Biodegradación de un crudo mediano en suelos de diferente textura con y sin agente estructurante. *Bioagro* 24:93-102.
- GASPAR M.L., CABELLO M.N., CAZAU M.C., POLLERO R.J. 2002. Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza* 12:55-59.

- GHULAM S., AFZAL M., ANWAR F., TAHSEEN R., KHALID Z. M. 2008. Biodegradation of kerosene in soil by a mixed bacterial culture under different nutrient conditions. *Inter. Biodeterioration and Biodegradation* 61:161-166.
- HERNÁNDEZ A.E., FERRERA R., RODRÍGUEZ R. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana* 21:81-89.
- HONG S.H., RYU H.W., KIM J., CHO K.S. 2011. Rhizoremediation of diesel-contaminated soil using the plant growth-promoting rhizobacterium *Gordonia* sp. S2RP-17. *Biodegradation* 22:593-601.
- JHON R.C., OKPOKWASILI G.C. 2012. Crude oil-degradation and plasmid profile of nitrifying bacteria isolated from oil-impacted mangrove sediment in the Niger Delta of Nigeria. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 88:1020-1026.
- JONER E.J., LEYVAL C. 2001. Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grow together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mycorrhiza* 10:155-159.
- KABELITZ N., MACHACKOVA J., IMFELD G., BRENNEROVA M., HEIPPIEPER D.H., JUNCA H. 2009. Enhancement of the microbial community biomass and diversity during air sparging bioremediation of a soil highly contaminated with kerosene and BTEX. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82:565-577.
- KALME S., PARSHETTI G., GOMARE S., GOVINDWAR S. 2008. Diesel and kerosene degradation by *Pseudomonas desmolyticum* NCIM 2112 and *Nocardia hydrocarbonoxydans* NCIM 2386. *Curr. Microbiol.* 56:581-586.
- MARQUES A.P.G.C., PIRES C., MOREIRA H., RANGEL A.O.S.S., CASTRO P.M.L. 2010. Assessment of the plant growth promotion abilities of six bacterial isolates using *Zea mays* as indicator plant. *Soil Biol. Biochem.* 42:1229-1235.
- MARTÍNEZ M.M.A.R., DELGADILLO J., ALARCÓN A., FERRERA C.R. 2007. Degradación de fenantreno por microorganismos de la rizósfera del pasto alemán. *Terra Latinoamericana* 25:25-33.
- MIKESKOVÁ H., NOVOTNÝ C., SVOBODOVÁ K. 2012. Interspecific interactions in mixed microbial cultures in a biodegradation perspective. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 95:861-870.
- MORALES P.J.L. 1969. Propagación de hongos filamentosos en fracciones del petróleo. Tesis profesional. Instituto Politécnico Nacional, México, D.F. 80 p.
- MURATOVA A.Y., TURKOVSKAYA O.V., ANTONYUK L.P., MAKAROV O.E., POZDNYAKOVA L.I., IGNATOV V.V. 2005. Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiology* 74:210-215.
- PARKINSON D. 1982. Filamentous fungi, pp. 949-953. In: A.L. Page (ed.). *Methods of soil analysis. Agronomy 9. Part 2.* American Society of Agronomy, Madison, WI.
- PÉREZ V.J., POGGI H.M., CALVA G., RÍOS E., RODRÍGUEZ R., FERRERA R., ESPARZA F. 2000. Nitrogen-fixing bacteria capable of utilizing kerosene hydrocarbon as a sole carbon source. *Water Sci. Technol.* 42:407-410.
- PÉREZ A.B., CASTAÑEDA A., CASTELLANOS G., JIMÉNEZ T., TAPIA A., MARTÍNEZ D. 2010. Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. *Terra Latinoamericana* 29:95-102.
- PHILLIPS J.M., HAYMAN D.S. 1970. Improved procedures clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- QUIÑONES A.E.E., FERRERA C.R., GAVI R.F., FERNÁNDEZ L.L., RODRÍGUEZ R., ALARCÓN A. 2003. Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia* 37:585-594.
- RENNIE R.J. 1981. A single medium for isolation of acetylenoreducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27:8-14.
- RITCHIE G.D., STILL R.K., ROSS J., BECKKEDAL V.Y.M., BOBB J.A., ARFSTEN P.D. 2003. Biological and health effects of exposure to kerosene-based jet fuels and performance additives. *J. Toxicology and Environ. Health. Part B.* 6:357-451.
- STATPOINT TECHNOLOGIES. 2011. Statgraphics Centurion XVI. Software estadístico versión en español. United States.
- THOMPSON O.A., DUANE C.W., MATTICE J.D., THOMA G.J. 2008. Influence of nitrogen addition and plant root parameters on phytoremediation of pyrene-contaminated soil. *Water Air Soil Pollut.* 189:37-47.
- VERDIN A., SAHRAOUI L., FONTAINE J., GRANDMOUGIN A., DURAND R. 2006. Effects of anthracene on development of a arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza* 16:397-405.
- WILD S.R., WATERHOUSE K.S., McGRATH S.P., JONES K.C. 1990. Organic contaminants in an agricultural soil with a known history of sewage sludge amendments: polynuclear aromatic hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 24:1706-1711.
- YATEEM A., BALBA A.T., NAWAWY A.S., AL-AWANDHI N. 2000. Plants associated microflora and the remediation of oil-contaminated soil. *Int. J. Phytorem.* 2:183-191.



Todos los derechos reservados. Universidad de Costa Rica. Este artículo se encuentra licenciado con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a [rac.cia@ucr.ac.cr](mailto:rac.cia@ucr.ac.cr)