



Agrociencia
ISSN: 1405-3195
agrocien@colpos.mx
Colegio de Postgraduados
México

Rivera, María del Carmen; Ferrera, Ronald; Sánchez, Prometeo; Volke, Víctor; Fernández, Luis;
Rodríguez, Refugio

Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto
alemán [*echinochloa polystachya* (h.b.k.) hitchc.]

Agrociencia, vol. 38, núm. 1, enero-febrero, 2004, pp. 1-12
Colegio de Postgraduados
Texcoco, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30238101>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

DESCONTAMINACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEO CRUDO MEDIANTE MICROORGANISMOS AUTÓCTONOS Y PASTO ALEMÁN [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]

DECONTAMINATION OF SOILS POLLUTED WITH CRUDE PETROLEUM USING INDIGENOUS MICROORGANISMS AND ALEMÁN GRASS [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]

María del Carmen Rivera-Cruz¹, Ronald Ferrera-Cerrato², Prometeo Sánchez-García²,
Víctor Volke-Haller², Luis Fernández-Linares³ y Refugio Rodríguez-Vázquez⁴

¹Programa en Cultivos Tropicales. Campus Tabasco. Colegio de Postgraduados. 86500. Periférico Carlos A. Molina. s/n, km 3.5 H. Cárdenas, Tabasco. (mariari@colpos.mx). ²Programa en Edafología. Colegio de Postgraduados. 56230. Montecillo, Estado de México. ³Instituto Mexicano del Petróleo. México, D. F. ⁴Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados. IPN. México, D.F.

RESUMEN

Los suelos contaminados con petróleo crudo pueden limpiarse con tecnologías físicas, químicas o biológicas. El objetivo del presente estudio fue evaluar la limpieza de suelos contaminados con petróleo usando el pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) asociado con poblaciones autóctonas de bacterias y hongos rizosféricos. Para ello se realizó un experimento en invernadero con un arreglo factorial 3×4×2 en un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento. Se utilizó suelo con 98 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de origen biogénico; tres concentraciones de petróleo (98, 50 000 y 100 000 mg kg⁻¹), cuatro tipos de inóculos (sin microorganismos, con bacterias, con hongos y con asociación bacterias-hongos) y dos de planta (con rizosfera y sin rizosfera del pasto alemán), fueron evaluados. Para cuantificar bacterias y hongos se utilizó el método de recuento en cajas Petri. La degradación de HTP se midió por espectrofotometría infrarroja con el método EPA 418.1, y la producción de biomasa vegetal por peso seco. Las bacterias, los hongos y la asociación bacterias-hongos tuvieron las poblaciones más grandes a los 120 d con diferencias (p=0.05) en los tratamientos con rizosfera del pasto alemán en suelo con 50 000 mg kg⁻¹ de HTP. Las poblaciones máximas fueron 16×10⁷ UFC de bacterias g⁻¹ de suelo seco y 17×10⁴ UFC de hongos. En la asociación la población de bacterias disminuyó una unidad exponencial, pero los hongos aumentaron tres unidades exponenciales. La degradación de petróleo fue mayor (p=0.05) a los 120 d en suelos con 100 000 mg kg⁻¹ con rizosfera inoculada con la asociación bacterias-hongos; el tratamiento removió 48% de los HTP. La producción de materia seca fue significativa en el tratamiento testigo (16.3 g) y la mayor disminución fue 53% en el suelo con 100 000 mg kg⁻¹ de HTP con bacterias.

Palabras clave: Biomasa vegetal, degradación de petróleo, fitorremediación, unidades formadoras de colonias.

ABSTRACT

The soils polluted with crude petroleum can be cleaned with different physical, chemical or biological technologies. The objective of the present study was to evaluate the cleaning of soils polluted with petroleum using alemán grass (*Echinochloa polystachya*) associated with rhizospheric native populations of bacteria and rhizospheric fungus. Thus, an experiment in a greenhouse was carried out with a 3×4×2 factorial completely randomized arrangement design with four replicates per treatment. Soil used had 98 mg kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbons (TPH) of basal origin; three petroleum concentrations (98 50 000 and 100 000 mg kg⁻¹), four inoculation types (without microorganisms, with bacteria, with fungi and with bacteria-fungi association), and two of plant (with rhizosphere and without rhizosphere of alemán grass), were evaluated. The Petri dishes counting method was used to determine bacteria and fungi. TPH degradation was determined by an infrared spectrophotometer with EPA 418.1 method, and the production of vegetable biomass by dry weight. Bacteria, fungi and the association bacteria-fungi had significant largest populations at 120 d (p=0.05) in the treatments with rhizosphere and alemán grass in soil with 50 000 mg kg⁻¹ of TPH. The maximum populations were 16×10⁷ colony former units (CFU) of bacteria per gram of dry soil and of 17×10⁴ CFU of fungi. In the association the population of bacteria diminished by one exponential unit; however the fungi populations increased by three exponential units. Petroleum degradation was significantly higher (p=0.05) at 120 d in soils with 100 000 mg kg⁻¹ with rhizosphere inoculated with bacteria-fungi association; the treatment removed 48% of TPH. The production of dry matter was significant in the control treatment (16.3 g) and the biggest decrease was 53% in the soil with 100 000 mg kg⁻¹ of TPH inoculated with bacteria.

Key words: Vegetal biomass, petroleum degradation, phytoremediation, colony former units.

Recibido: Julio, 2002. Aprobado: Octubre, 2003.

Publicado como ARTÍCULO en Agrobiencia 38: 1-12. 2004.

INTRODUCCIÓN

Los agroecosistemas localizados en algunas áreas petroleras en el Estado de Tabasco están contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo en capas y horizontes del suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 a), provenientes de derrames y lixiviados de lodos de perforación. La superficie de suelo contaminado con petróleo en el Estado de Tabasco fue 1904 ha de 1993 a 2002 [Procuraduría Federal para la Protección del Ambiente (PROFEPA), 2002]. El petróleo en el suelo causa problemas ecotoxicológicos; los daños para las plantas y los microorganismos se originan por el potencial tóxico, carcinogénico y mutagénico de los hidrocarburos (Pothuluri y Cerniglia, 1994). La PROFEPA en México ha establecido límites máximos permisibles de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) en la NOM-EM-138-ECOL-2002 (Diario Oficial de la Federación, 2002) aplicables para la limpieza de suelos contaminados con petróleo; el objetivo es que el suelo recupere su condición natural y la capacidad de uso que tenía antes del derrame.

La recuperación del suelo con plantas, llamada fitorremediación, se basa en el uso de plantas con capacidad natural, o incorporada a través de ingeniería genética, para el tratamiento de suelos, sedimentos, aguas superficiales o freáticas contaminados con sustancias tóxicas orgánicas o inorgánicas (Cunningham *et al.*, 1996). La fitorremediación requiere plantas que puedan crecer y realizar funciones fisiológicas en suelos contaminados y con sistemas rizosféricos favorables para el establecimiento de bacterias y hongos que degraden, mineralicen o estabilicen los contaminantes orgánicos o inorgánicos (Cunningham *et al.*, 1996), que pueden transformarse hasta compuestos inocuos como el bióxido de carbono y agua (Alexander, 1994). La fitorremediación tiene ventajas técnicas y económicas sobre las tecnologías de biorremediación, biolabranza, bioestimulación, bioventeo, lavado de suelo y extracción con solventes (Flathman y Lanza, 1998). Los resultados experimentales de Aprill y Sims (1990), Banks (1997) y Nichols *et al.* (1997) con diferentes pastos, han sido satisfactorios en la restauración de suelos contaminados con petróleo. Los pastos son aptos para restaurar suelos porque producen una densa red de raicillas que llegan hasta 2.7 m de profundidad en el suelo (Gould y Shaw, 1992), y estimulan el crecimiento poblacional de los microorganismos por la acumulación de compuestos orgánicos exudados ricos en carbono y nitrógeno que son utilizados como fuente energética (Curl y Truelove, 1986).

Los Gleysoles del Estado de Tabasco tienen petróleo acumulado, pero mantienen praderas con pasto *alemán* [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] utilizado para bovinos y también pasto silvestre *cabezón* (*Paspalum virgatum* L.) sin uso forrajero pero con importancia

INTRODUCTION

Agricultural ecosystems found in some petroleum areas in the State of Tabasco are contaminated with hydrocarbons derived from the petroleum contained in soil layers and horizons (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 a), originated from leakages and lixiviates of drilling mud. Oil polluted soil surface in the State of Tabasco was 1904 ha from 1993 to 2002 [Federal Agency for Environmental Protection (PROFEPA), 2002]. Petroleum cause ecotoxicologic problems in soil; the damage for plants and microorganisms are originated due to the hydrocarbons toxic, carcinogen and mutagenic potential (Pothuluri and Cerniglia, 1994). In México NOM-EM-138-ECOL-2002 (Diario Oficial de la Federación, Official Diary of the Federation, 2002) PROFEPA has established the maximum permissible limits for total petroleum hydrocarbons (TPH), which are applicable for the cleaning of soils contaminated with petroleum; the objective is both the recovery of soil natural condition and of its useful capacity before the petroleum leakage.

The recovery of soil using plants is named phytoremediation; it is based on the use of plants with a natural capacity, or altered by genetic engineering, for the treatment of soils, sediments, surface or phreatic waters contaminated with organic or inorganic toxic substances (Cunningham *et al.*, 1996). Phytoremediation requires plants that can grow and perform physiological functions in contaminated soils and with rhizospheric systems favorable for the establishment of bacteria and fungi that degrade, mineralize and stabilize the organic and inorganic contaminants (Cunningham *et al.*, 1996), which can transform themselves into innocuous compounds such as carbon dioxide and water (Alexander, 1994). Phytoremediation has technical and economical advantages when compared to technologies like: bioremediation, landfarming, biostimulation, bioventing, soil cleaning and extraction with solvents (Flathman y Lanza, 1998). In the restoration of petroleum polluted soils with different grasses, the experimental results have been satisfactory (Aprill and Sims, 1990; Banks, 1997; Nichols *et al.*, 1997). Grasses are suitable to restore soils because they produce a dense net of little roots that reach up to 2.7 m depth of soil (Gould and Shaw, 1992); they also stimulate the population growth of microorganisms due to the accumulation of exudates organic compounds rich in carbon and nitrogen which are used as an energy source (Curl and Truelove, 1986).

Gleysols in Tabasco have petroleum accumulated; however they maintain prairies with *alemán* grass [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] used for bovines, and *cabezón* wild grass (*Paspalum virgatum* L.) with no grazing use, but with ecological importance (Rivera *et al.*, 2002a). Petroleum tolerance in both

ecológica (Rivera *et al.*, 2002 a). La tolerancia de ambos pastos al petróleo y sus microorganismos rizosféricos aptos para la degradación *in vitro* del petróleo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b) son una alternativa para la restauración de suelos contaminados con petróleo. Los objetivos de este estudio fueron: 1) Probar si la rizosfera del pasto alemán, junto con los hidrocarburos del petróleo, 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 hidrocarburos del petróleo; 3) evaluar la respuesta de la producción de biomasa del pasto alemán al inóculo de bacterias y hongos en suelos con y sin hidrocarburos del petróleo.

MATERIALES 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) (ISSS-ISRIC-FAO, 1998), localizado en el ejido H. Galeana, Tercera Sección, municipio de Teapa, Estado de Tabasco, México. Las coordenadas geográficas del sitio de recolección del suelo son 17° 40' 58" N y 93° 00' 45" O; la temperatura media anual varía de 24 a 26 °C, la precipitación anual oscila entre 3500 y 4000 mm, y el tipo de clima es Af(m) (INEGI, 2001). El suelo tiene un $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}_{1:2.5}}$ de 5.1, 155 mg kg^{-1} N inorgánico (NO_3^- y NH_4^+), 1.31 mg kg^{-1} P Olsen, 0.40 $\text{Cmol}+\text{kg}^{-1}$ K intercambiable, 28.3% materia orgánica, 18.7% arcilla, textura franco limosa; el contenido basal de los HTP es 98 mg kg^{-1} de suelo seco analizado con el método EPA 418.1 (EPA, 1986).

Los microorganismos utilizados fueron cuatro cepas de bacterias y dos de hongos aisladas de las rizosferas de los pastos alemán y cabezón localizados en un Gleysol histi-sódico (abruptico) (ISSS-ISRIC-FAO, 1998) con 323 000 mg kg^{-1} HTP en el campo petrolero La Venta, Tabasco (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 a). 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 fueron *Trichoderma* sp y *Paecilomyces* sp, aislados de la rizosfera del pasto cabezón. Se utilizaron estas cepas porque se aclimataron y crecieron *in vitro* en sustratos enriquecidos con petróleo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b).

El pasto alemán utilizado se recolectó de un Gleysol histi-districo (abruptico) (ISSS-ISRIC-FAO, 1998) con 115 000 mg kg^{-1} HTP en el horizonte superficial Op (0-20/25 cm) en el campo petrolero La Venta, Tabasco. Se estableció en contenedores de plástico en suelo sin petróleo 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 unisel 30 d antes del inicio del experimento.

Diseño experimental

Se realizó un experimento en invernadero de enero a mayo de 2000 (120 d), en Montecillo, Estado de México. El diseño

pastures and their rhizospheric microorganisms adapted for *in vitro* petroleum degradation (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b) are an alternative for restoration of petroleum-contaminated soils. The objectives of this study were: 1) To prove if the alemán grass rhizosphere, together with the petroleum hydrocarbons, modifies the population size of bacteria and fungi; 2) to demonstrate if the inoculation of bacteria and fungi into a soil with rhizosphere of alemán grass reduces the concentration of petroleum hydrocarbons; 3) to evaluate the alemán grass biomass production response to the inoculation of bacteria and fungi in soils with and without petroleum hydrocarbons.

MATERIALS AND METHODS

Soil, micro-organisms and plant production

The soil used in the greenhouse was collected from the superficial horizon Op (0-24/25 cm) of a histiorthieutric (abruptic) Gleysol (ISSS-ISRIC-FAO, 1998) localized in the third section of H. Galeana common land (ejido), Teapa municipality, State of Tabasco, México. The soil sampling site geographic coordinates are: 17° 40' 58" N and 93° 00' 45" W; annual average temperature range from 24 to 26 °C, total annual precipitation varies between 3500 and 4000 mm, and the climatic type is Af(m) (INEGI, 2001). The soil $\text{pH}_{\text{H}_2\text{O}_{1:2.5}}$ is 5.1, 155 mg kg^{-1} inorganic N (NO_3^- and NH_4^+), 1.31 mg kg^{-1} Olsen P, 0.40 $\text{Cmol}+\text{kg}^{-1}$ exchangeable K, 28.3% organic matter and 18.7% clay, silt loam texture; the basal content of TPH is 98 mg kg^{-1} of dry weight analysed with EPA 418.1 method (EPA, 1986).

The microorganisms used were four strains of bacteria and two of fungi isolated from the rhizospheres of alemán and cabezón grasses located in a histi-eutic-sodic Gleysol (ISSS-ISRIC-FAO, 1998) with 323 000 mg kg^{-1} of TPH in La Venta petroleum field, Tabasco (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 a). The four bacteria strains were identified as CT11, CT16, CT26 y AT4 (from spanish, C= cabezón, A= alemán and T= Tabasco); the fungi were *Trichoderma* sp and *Paecilomyces* sp, isolated from the cabezón grass rhizosphere. These strains were used because they got acclimatized and grew *in vitro* in petroleum-enriched substrates (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b).

The alemán grass used was collected from a histi-distric Gleysol (ISSS-ISRIC-FAO, 1998) with 115 000 mg kg^{-1} TPH in the superficial horizon Op (0-20/25 cm) at La Venta petroleum field, Tabasco. It was established in plastic containers in petroleum free soil, in (greenhouses, of the Colegio de Postgraduados, Montecillo, State of México, for its acclimatization during six months. Among mature stems, 5 cm long shoots with fully developed buds were selected; with this material a seed bed in polystyrene trays was established 30 d before the start of the experiment.

Experimental design

An experiment in a greenhouse, from January to May 2000 (120 d), was undertaken at Montecillo, State of México. The experimental design was completely randomised with 24 treatments

experimental fue completamente al azar con 24 tratamientos y cuatro repeticiones, con arreglo de tres factores completos: 1) Concentración de petróleo Istmo: 98 (concentración basal del suelo), 50 000 y 100 000 mg kg⁻¹ base seca de HTP; 2) tipo de microorganismos tolerantes a petróleo: 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; 3) rizosfera de pasto alemán: sin y con rizosfera. 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 1.3 kg cm⁻² durante 4 h). Los tratamientos con petróleo se prepararon con 22.45 g y 44.95 g de petróleo para obtener concentraciones de 50 000 y 100 000 mg de HTP por kg de suelo seco. Se agregaron 2 mL de inóculos de microorganismos para la asociación de las cuatro cepas de bacterias y el mismo volumen para las dos cepas de hongos; para la asociación de las seis cepas se agregaron 4 mL de bacterias y hongos. El suelo, el petróleo y los microorganismos se homogeneizaron con una varilla de vidrio estéril, la mezcla se colocó en los contenedores de vidrio; en los tratamientos con pasto alemán se establecieron dos plántulas por unidad experimental, y a los 20 d se eliminó una; se regó cada 24 h, la humedad del suelo se mantuvo entre 19 y 26%. Las variables evaluadas fueron poblaciones de bacterias y hongos (UFC), degradación de petróleo (mg kg⁻¹ suelo seco) y producción de biomasa vegetal (g).

Poblaciones de bacterias, hongos y degradación de petróleo

A los 60 y 120 d se muestreó suelo (25 a 30 g de muestra por unidad) con tubo de vidrio esterilizado (1 cm de diámetro), de 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 cuantificar las poblaciones de bacterias y hongos se almacenó a 4 °C durante una semana y a 0 °C por 10 d, para medir HTP. Esta cuantificación (UFC por gramo de suelo seco) se realizó con la técnica de recuento en placa de agar (Ingraham e Ingraham, 1998): Se tomaron 10 g de muestra, se localizaron diluciones decimales seriadas, se dispersó 0.1 mL de solución por caja Petri en medio de cultivos selectivos para bacterias fijadoras de N de vida libre degradadoras de petróleo y hongos degradadores de petróleo (medio de cultivo celulo-sa agar modificado) (Rivera *et al.*, 2002 b), y se incubó a 28 °C por 120 h para bacterias y 72 h para los hongos. La degradación de petróleo crudo se midió con la concentración de los HTP, que es la variable de la NOM-EM-138-ECOL-2002 (Diario Oficial de la Federación, 2002). La extracción y la cuantificación se realizó con el método analítico EPA 418.1 (EPA, 1986). La extracción se efectuó con diclorometano (Allied Signal Burdick and Jackson grado HPLC) en equipo soxhlet (Colombo-Mantle) durante 12 h. Se utilizó una muestra testigo y un blanco por tanda de 10 muestras; el extracto se condensó con un rotavapor (Buchi recipiente Thelco 184) y se conservó a 0 °C durante una semana, y el concentrado se resuspendió con tetracloruro de carbono (Merck para análisis). La cuantificación de los HTP se realizó en un espectrofotómetro infrarrojo Buck Scientific modelo 500 con sensibilidad de 5 mg kg⁻¹, la lectura se efectuó en la

and four replicates, and three complete factors: 1) Istmo oil concentration: 98 (soil basal concentration), 50 000 and 100 000 TPH dry weight; 2) type of microorganisms tolerant to petroleum: control, with four bacteria strains (CT11, CT16, CT26 y AT4), with two strains of fungi (*Paecilomyces* sp y *Trichoderma* sp), and with the association of the six bacteria and fungi strains; 3) alemán grass rhizosphere: without and with rhizosphere. The experimental unit was a glass container (17 cm height and 10 cm diameter receptacle) with 450 g sterile soil (wet heat at 121 °C in sterilizer at 1.3 kg cm⁻² during 4 h). Petroleum treatments were prepared with 22.45 g and 44.95 g petroleum to obtain concentrations of 50 000 and 100 000 mg of TPH for every kg of dry soil. An inoculation of 2 mL of microorganisms for the associations of the four bacteria strains and the same volume for the two fungi strains were added; 4mL for the association of four bacteria strains and the same volume for the two fungi strains were used; and for the association of the six strains, 4 mL of bacteria and fungi were added. Soil, petroleum and microorganisms were homogenized with a sterile glass rod, the mixture was located in glass containers; in the alemán glass treatments two plants per experimental unit were established; and after 20 days one was eliminated; water was added every 24 h, soil humidity was maintained between 19 and 26%. The evaluated variables were bacteria and fungi populations (CFU), petroleum degradation (mg kg⁻¹ dry weight) and vegetal biomass production (g).

Bacteria and fungi populations, and petroleum degradation

At 60 and 120 days soil was sampled (25 to 30 g of sample per unit) with a sterilized glass tube (1 cm diameter), from five points of every experimental unit (at 1.5 cm distance from the stem in the experimental units with alemán grass rhizosphere). To quantify the bacteria and fungi populations the sample was stored at 4 °C during one week and at 0 °C for 10 days, in order to measure TPH. This counting (CFU per gram of dry soil) was made by the agar plate counting technique (Ingraham and Ingraham, 1998): 10 g of sample were taken, serial decimal dilutions were prepared, 0.1 mL of solution were dispersed in each Petri dish using selective culture media for free living petroleum degrading N fixing bacteria and petroleum degrading fungi (modified agar cellulose culture media) (Rivera *et al.*, 2002 b), and it was incubated at 28 °C for 120 h for bacteria and 72 h for fungi. Crude petroleum degradation was measured by means of the TPH concentration, which is the variable of the NOM-EM-138-ECOL-2002 (Official Diary of the Federation, 2002). Extraction and quantification was made with the EPA 418.1 analytic method (EPA, 1986). Extraction was obtained with dichloromethane (Allied Signal Burdick and Jackson HPLC grade) in soxhlet equipment (Colombo-Mantle) during 12 h. A control sample was used and a blank for every group of 10 samples; the extract was condensed with a rotary evaporator (Buchi container Thelco 184) and preserved at 0 °C during one week, and the concentrated was resuspended with carbon tetrachloride (Merck for analysis). TPH quantification required a Buck Scientific 500 infrared spectrophotometer 5 mg kg⁻¹ sensitivity; the reading was taken at 2930 cm⁻¹ wavelength. Petroleum recovery fluctuates from 85 to 93%.

longitud de onda de 2930 cm^{-1} . La recuperación de petróleo varió de 85 a 93%.

Biomasa vegetal

A los 120 d de la siembra de las plántulas se evaluó la producción de MS de la parte aérea y de la raíz de la planta. El material vegetal se cosechó y se secó a 70 °C durante 48 h; la biomasa total fue la suma del peso seco de las biomásas aérea y radical.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza y se compararon las medias con la prueba de Tukey ($p=0.05$) (SAS, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Poblaciones de bacterias y hongos

Las poblaciones de bacterias tuvieron diferencias a los 60 y 120 d ($p=0.05$). El petróleo y el sistema rizosférico del pasto alemán incrementaron las poblaciones (Figura 1), las cuales alcanzaron un máximo de 50 000 mg kg^{-1} HTP a los 60 d en suelo rizosférico; se encontraron 12×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco. Esta población fue 24 veces mayor que la población de bacterias del suelo con 50 000 mg kg^{-1} HTP, pero sin rizosfera. A los 120 d el patrón de las poblaciones fue similar; el tratamiento con rizosfera y con 50 000 mg kg^{-1} HTP tuvo la mayor población con 16×10^7 UFC, y fue 800 veces mayor que en el suelo sin rizosfera. Este incremento de la población bacteriana es atribuible a la mayor disponibilidad de carbono y nitrógeno, ya que ambos elementos son fuentes energéticas para su metabolismo (Curl y Truelove, 1986); además, por la adaptación de las bacterias autóctonas realizadas previamente *in vitro* (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b). Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Radwan *et al.* (1995) en las rizosferas del maíz y tomate en suelo con 10% de petróleo, donde se determinó 3×10^8 y 8×10^8 UFC de bacterias. Concentraciones de 100 000 mg kg^{-1} HTP inhibieron las poblaciones a los 60 y 120 d (Figura 1); este efecto restrictivo de la contaminación fue identificado también por Atlas *et al.* (1991). La influencia de los 100 000 mg kg^{-1} HTP es un factor que puede originar efectos restrictivos en los procesos de aclimatación de las bacterias en invernadero, de modo que puede ocurrir un nivel de estrés que repercuta en la automultiplicación de las bacterias e, incluso, en la planta (Lambers *et al.*, 1998).

En las poblaciones de los hongos inoculados solos, se observaron diferencias ($p=0.05$) entre tratamientos a los 60 y 120 d. La población más grande a los 60 d fue 170×10^3 UFC g^{-1} suelo, y correspondió al suelo con rizosfera y contaminado con 50 000 mg kg^{-1} HTP

Vegetal biomass

The production of DM in both the exposed area and the root of the plant were evaluated at 120 d from the plants sowing. Vegetal material was harvested and dried at 70 °C during 48 h; total biomass was the sum of the exposed and root biomasses dry weight.

Statistical analysis

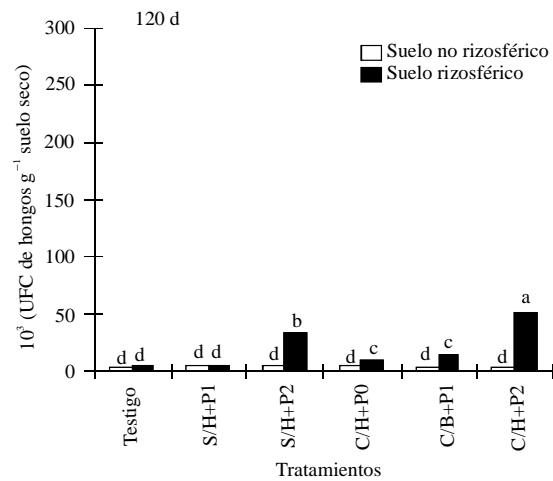
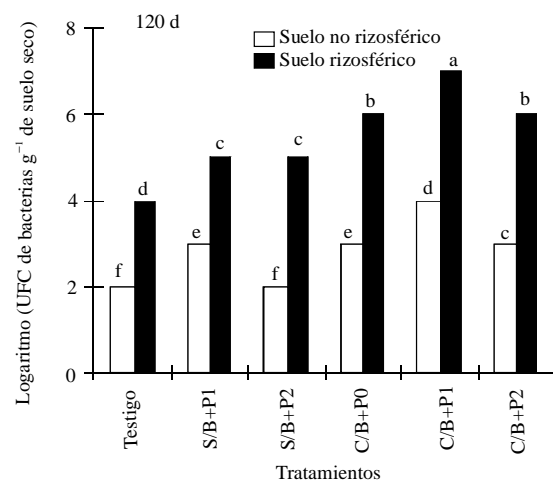
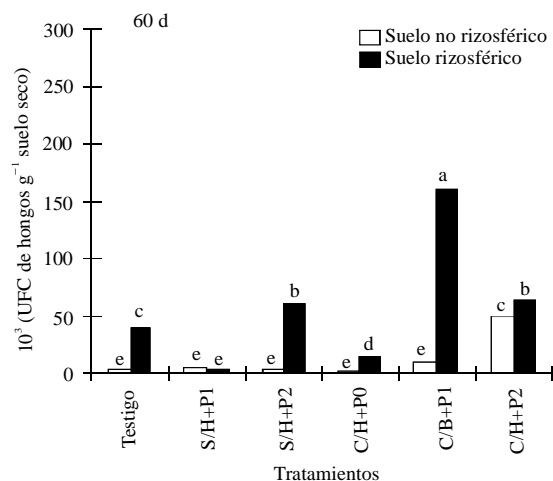
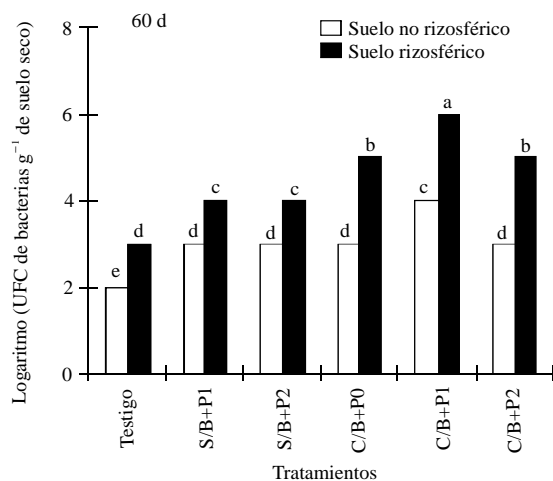
An analysis of variance was performed and means were compared using the Tukey test ($p=0.05$) (SAS, 1989).

RESULTS AND DISCUSSION

Bacteria and fungi populations

Bacteria populations had differences at 60 and 120 d ($p=0.05$). Petroleum and the *alemán* grass rhizospheric system increased the populations (Figure 1), to a maximum of 50 000 mg kg^{-1} TPH at 60 d in rhizospheric soil; 12×10^6 CFU g^{-1} of dry soil were found. This population was 24 times bigger than the population of soil bacteria with 50 000 mg kg^{-1} TPH, but without rhizosphere. At 120 d the populations pattern was similar; the treatment with rhizosphere and with 50 000 mg kg^{-1} of TPH had the highest population with 16×10^7 CFU, which was 800 times bigger than for the soil without rhizosphere. This increase in the bacterial population is related to the higher carbon and nitrogen availability, since both elements are energy sources for their metabolism (Curl and Truelove, 1986), and also because of the native bacteria *in vitro* adaptation previously performed (Rivera-Cruz *et al.*, 2002 b). These results agree with those reported by Radwan *et al.* (1995) for maize rhizosphere and tomato in soil with 10% petroleum, where 3×10^8 y 8×10^8 CFU of bacteria was determined. TPH concentrations of 100 000 mg kg^{-1} inhibited populations at 60 and 120 d (Figure 1); this contamination restrictive effect was also identified by Atlas *et al.* (1991). The influence of the 100 000 mg kg^{-1} TPH is a factor which can create restrictive effects in the adaptation processes of bacteria in greenhouse; therefore, a level of stress which could affect the bacteria self-multiplication and even in the plant can occur (Lambers *et al.*, 1998).

In populations of fungi inoculated alone, differences were found ($p=0.05$) among treatments at 60 and 120 d. The largest population at 60 d was 170×10^3 CFU g^{-1} of soil, and belongs to the soil with rhizosphere and contaminated with 50 000 mg kg^{-1} TPH (Figure 2). However, at 120 d the population in all treatments diminished, even though in the *alemán* grass and with 100 000 mg kg^{-1} of TPH less reduction was found where mainly *Paecilomyces* fungus was isolated. This indicates that fungi can have different level of sensitivity to



Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

Figura 1. Población de bacterias degradadoras de petróleo en suelos no rizosférico y rizosférico de pasto alemán, no inoculado (S/B) e inoculado con bacterias (C/B), no contaminado (P0), con 50 000 (P1) y 100 000 (P2) mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo, a los 60 y 120 d.

Figure 1. Population of petroleum decomposing bacteria in non rhizospheric and rhizospheric soils with *alemán* grass, not inoculated (S/B) and inoculated (C/B) with bacteria, not contaminated (P0), with 50 000 (P1) and with 100 000 (P2) mg kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbons, at 60 and 120 d.

(Figura 2). Sin embargo, a los 120 d la población disminuyó en todos los tratamientos, aunque se encontró menor reducción en el tratamiento con pasto alemán y con 100 000 mg kg⁻¹ de HTP desde donde se aisló principalmente el hongo *Paecilomyces*. Esto indica que los hongos pueden tener diferente grado de sensibilidad al petróleo a través del tiempo. Según Alexander (1994), algunas especies de hongos llegan a ser abundantes inmediatamente después de agregar la fuente de carbono, pero

Figura 2. Población de hongos degradadores de petróleo en suelos no rizosférico y rizosférico de pasto alemán, no inoculado (S/H) e inoculado con hongos (C/H), no contaminado (P0), contaminado con 50 000 (P1) y con 100 000 mg kg⁻¹ (P2) de hidrocarburos totales del petróleo, a los 60 y 120 d.

Figure 2. Population of petroleum decomposing fungi in non rhizospheric and rhizospheric soils with *alemán* grass, not inoculated (S/H) and inoculated (C/H) with fungi, not contaminated (P0), contaminated with 50 000 (P1) and with 100 000 mg kg⁻¹ (P2) of total petroleum hydrocarbons at 60 and 120 d.

petroleum over time. According to Alexander (1994), some fungi species become abundant immediately after the addition of a carbon source, but decrease in short time after the initial increase; this is caused by the higher availability of oxidized carbon substrates. Other factors which could influence on the lower population of fungi at 120 d was the absence of bacteria in order to establish parasitic and predatory relationships; or probably, because

disminuyen poco tiempo después del incremento inicial; lo que es causado por la mayor disponibilidad de sustratos de carbono oxidado. Otros factores que pudieron influir en la menor población de hongos a los 120 d fue la ausencia de bacterias para establecer relaciones de parasitismo y depredación; o probablemente a que en ese momento la población se encontraba en la fase de muerte de su ciclo de crecimiento (Madigan *et al.*, 1998). El pH inicial del suelo (5.1) no tuvo cambios significativos ($p>0.05$) (datos no presentados) respecto a las diferentes concentraciones de petróleo; esta variable no fue un factor determinante, al igual que la humedad del suelo, que se mantuvo entre 19 y 26%.

Las medias de las poblaciones de bacterias en asociación con hongos fueron diferentes ($p=0.05$). La población más grande a los 60 d fue 80×10^6 UFC g^{-1} suelo seco, y se encontró en el suelo rizosférico contaminado con $100\,000\text{ mg kg}^{-1}$ HTP (Figura 3). La tendencia poblacional a los 60 d evidencia una respuesta lineal considerando las dos fuentes de carbono (exudados de la rizosfera y el petróleo): Mayor población por el efecto de la rizosfera y por el petróleo. Las poblaciones fueron más grandes a los 120 d en los tratamientos testigo que a los 60 d. Este aumento está relacionado con la colonización por cepas no degradadoras de petróleo; en cambio, el tratamiento con rizosfera y con $50\,000\text{ mg kg}^{-1}$ HTP tuvo la población más grande de bacterias a los 120 d con 50×10^6 UFC g^{-1} suelo seco (Figura 3).

A diferencia de las poblaciones más grandes de los tratamientos donde se inocularon solamente bacterias (Figura 1), cuando éstas se asociaron con hongos, las poblaciones de bacterias fueron más pequeñas (Figura 3). Este decremento es atribuible a las interacciones bacteria-hongo, donde el hongo obtiene beneficios por las relaciones de parasitismo o depredación (Alexander, 1994; Thorn, 1997). En la Figura 4 se presentan las medias de las poblaciones de hongos asociados con bacterias. A los 60 d el efecto rizosfera del pasto alemán fue el principal factor que determinó que en el tamaño de la población de hongos en todos los tratamientos, con excepción del testigo, no hubiera diferencias ($p=0.05$). El efecto rizosfera, reportado por Katznelson (1946), ocurre por acumulación de compuestos orgánicos ricos en carbono y nitrógeno utilizados como fuente energética (Curl y Truelove, 1986; Foster y Rovira, 1978) y, además, por la inoculación de bacterias y hongos autóctonos adaptados *in vitro* al petróleo (Rivera *et al.*, 2002 b).

La población más grande de hongos a los 120 d correspondió al tratamiento con $50\,000\text{ mg kg}^{-1}$ HTP, y fue 5×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco en suelo en la rizosfera; la población más baja (10×10^3 UFC; 179 veces menor), se encontró en el tratamiento testigo y fue 179 veces menor. La comparación de las poblaciones de hongos solos (Figura 2) respecto a los asociados con bacterias (Figura 4)

in such moments the population was on the dead phase of its growing cycle (Madigan *et al.*, 1998). The initial soil pH (5.1) had no significant changes ($p>0.05$) (non presented data) related with the different petroleum concentrations. This variable, as well as the soil humidity which was maintained between 19 and 26%, was not a significant factor.

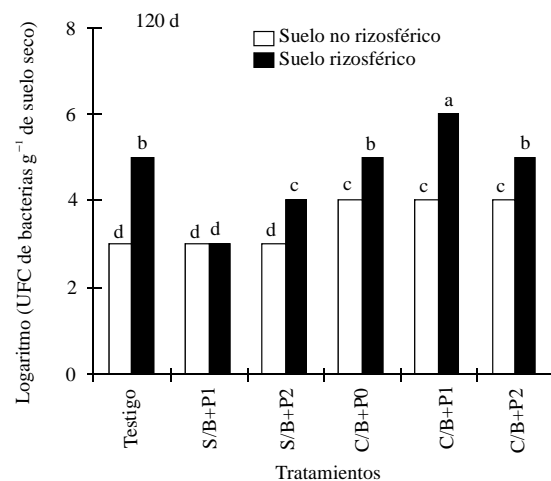
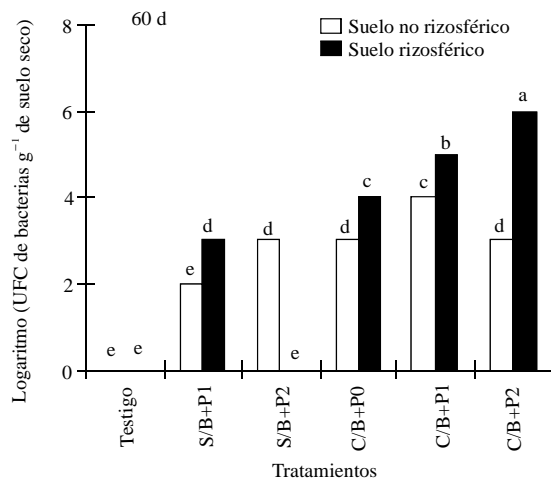
The average population of bacteria in association with fungi was different ($p=0.05$). The highest population at 60 d was 80×10^6 CFU g^{-1} of dry soil, and was found in the rhizospheric soil contaminated with $100\,000\text{ mg kg}^{-1}$ TPH (Figure 3). Population tendency at 60 d show a linear response considering the two carbon sources (exudates from the rhizosphere and the petroleum): a higher population due to the effect of the rhizosphere and the petroleum. Populations were higher at 120 d in the control treatments than at 60 d. This increase is related to the colonization by oil non degrading strains; on the contrary, the treatment with rhizosphere and with $50\,000\text{ mg kg}^{-1}$ TPH had the highest bacteria population at 120 d with 50×10^6 CFU g^{-1} dry soil (Figure 3).

Differently to the highest populations of the treatments where only bacteria were inoculated (Figure 1), when these were associated with fungi, the bacteria populations were smaller (Figure 3). This decrease is attributed to the bacteria-fungi interactions, where the fungi obtains the benefits from the parasitic or predatory relationships (Alexander, 1994; Thorn, 1997). In Figure 4 the average of the fungi populations associated with bacteria are presented. At 60 d the effect of *alemán* grass rhizosphere was the main factor that determined the size of the fungi populations in all treatments, with the exception of control, there would be no differences ($p=0.05$). Rhizosphere effect, which was reported by Katznelson (1946), occurs through the accumulation of organic compounds, rich in carbon and nitrogen, which are used as energy source (Curl and Truelove, 1986; Foster and Rovira, 1978). Rhizosphere effect is also due to inoculation of bacteria and native fungi adapted *in vitro* to petroleum (Rivera *et al.*, 2002b).

The largest populations of fungi after 120 d were in the treatment with $50\,000\text{ mg kg}^{-1}$ TPH, which was 5×10^6 CFU g^{-1} of dry soil in soil in the rhizosphere; the smallest population (10×10^3 CFU; 179 times lower), was found in the control treatment. The comparison of fungi populations (Figure 2) and fungus associated with bacteria (Figure 4) confirms that associations increase the population density.

Crude petroleum degradation

Differences ($p=0.05$) among treatments are shown in Figures 5 and 6. The rhizospheric soil associated with bacteria and fungi had greater capacity to decompose



Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

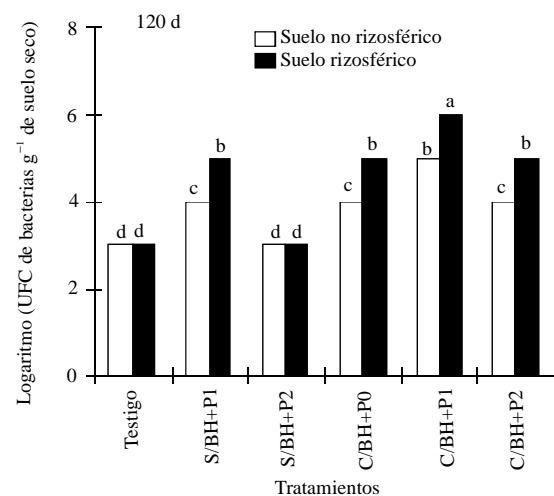
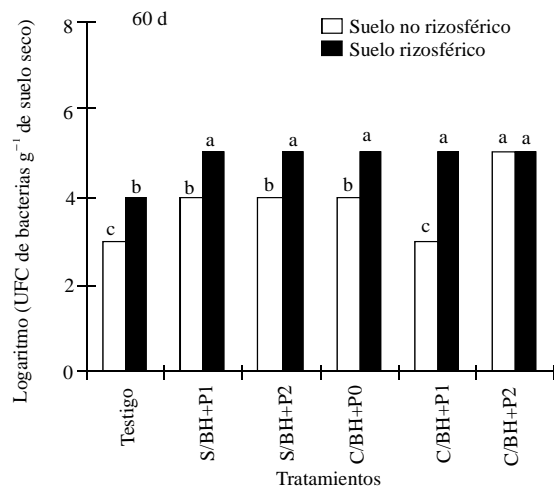
Figura 3. Población de bacterias (asociadas con hongos) degradadoras de petróleo en suelos no rizosférico y rizosférico de pasto alemán, no inoculado (S/BH) e inoculado con asociación de bacterias y hongos (C/BH), no contaminado (P0), con 50 000 (P1) y con 100 000 (P2) mg kg^{-1} de hidrocarburos totales del petróleo, a los 60 y 120 d.

Figure 3. Population of petroleum decomposing bacteria (associated with fungi) in non rhizospheric and rhizospheric soils with *alemán* grass, not inoculated (S/BH), and inoculated (C/BH) with bacteria and fungi association, not contaminated (P0), with 50 000 (P1) and with 100 000 (P2) mg kg^{-1} of total petroleum hydrocarbons at 60 and 120 days.

confirma que los consorcios aumentan la densidad de las poblaciones.

Degradación de petróleo crudo

En las Figuras 5 y 6 se aprecian diferencias ($p=0.05$) entre los tratamientos. El suelo rizosférico con la asociación

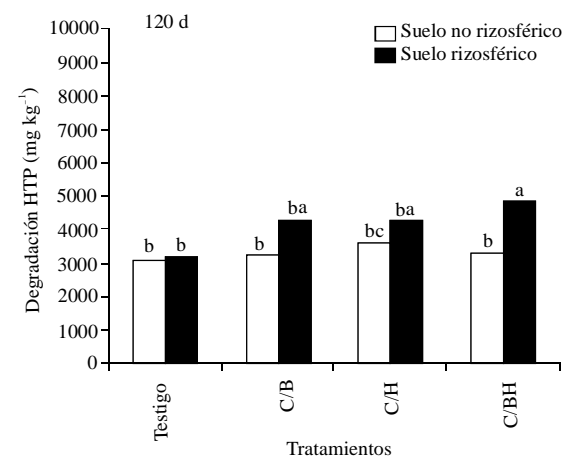
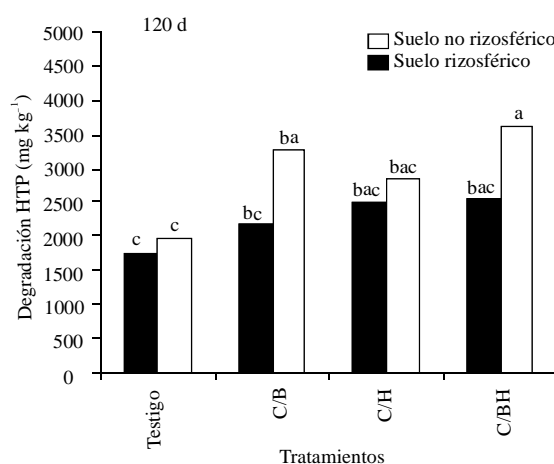
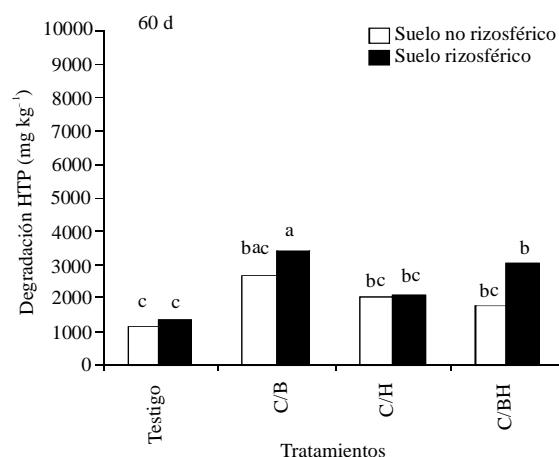
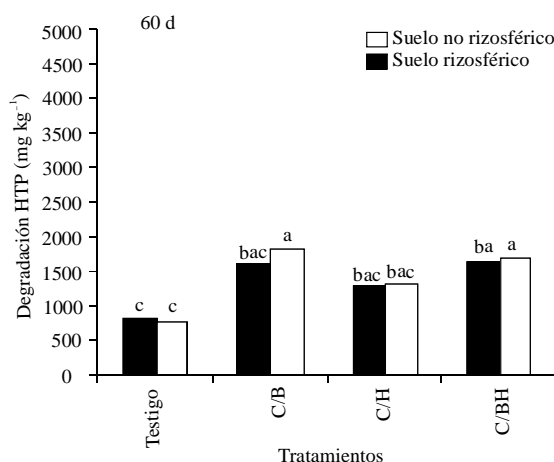


Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

Figura 4. Población de hongos (asociados con bacterias) degradadores de petróleo en suelos no rizosférico y rizosférico de pasto alemán, no inoculado (S/BH) e inoculado con asociación de bacterias (C/BH), no contaminado (P0), con 50 000 (P1) y con 100 000 (P2) mg kg^{-1} de hidrocarburos totales del petróleo, a los 60 y 120 d.

Figure 4. Petroleum decomposer fungi population (associated with bacteria) in non-rhizospheric and rhizospheric soil, with *alemán* grass, non-inoculated (S/BH) and inoculated, associated with bacteria (C/BH) and cultivated non-polluted (P0), with 50000 (P1) and with 100000 (P2) mg kg^{-1} of total petroleum hydrocarbons at 60 and 120 d.

petroleum. The degradation of 50,000 mg kg^{-1} TPHP in 60 d was 36%, and 62% in 120 d (Figure 5). The same trend was found in the treatments with 100 000 mg TPH : 34% had been decomposed after 60 d and 48% after 120 d (Figure 6). Colombo *et al.* (1996) obtained 35% reduction of oil in 90 d by the action of fungi-bacteria association. The microorganisms from the Bermuda grass (*Cynodon dactylon*) removed 69% of TPH in nine months, but in



Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

Las barras con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, $p=0.05$)

Figura 5. Degradación de petróleo en suelo con 50 000 mg kg⁻¹ HTP, no inoculado (testigo), inoculados con bacterias (C/B), con hongos (C/H), con asociación de bacterias y hongos (C/BH), en suelos no rizosférico y rizosférico, a los 60 y 120 d.

Figure 5. Petroleum degradation in soil with 50 000 mg kg⁻¹ TPH, not inoculated (control), inoculated with bacteria (C/B), with fungi (C/H), with association of bacteria and fungi (C/BH), in non rhizospheric and rhizospheric soils at 60 and 120 d.

Figura 6. Degradación de petróleo en suelo con 100 000 mg kg⁻¹ HTP, no inoculado (testigo), inoculados con bacterias (C/B), con hongos (C/H), con asociación de bacterias y hongos (C/BH), en suelos no rizosférico y rizosférico, a los 60 y 120 d.

Figure 6. Petroleum degradation in soil with 100 000 mg kg⁻¹ TPH, not inoculated (control), inoculated with bacteria (C/B), with fungi (C/H), with association of bacteria and fungi (C/BH), in non rhizospheric and rhizospheric soils at 60 and 120 d.

de bacterias y hongos tuvo mayor capacidad para la degradación del petróleo. La degradación de los 50 000 mg kg⁻¹ HTP a los 60 d fue 36% y 62% a los 120 d (Figura 5). La misma tendencia se presentó en los tratamientos con 100 000 mg de HTP; a los 60 d se había degradado 34%, y 48% a los 120 d (Figura 6). Colombo *et al.* (1996) obtuvieron 35% de reducción del petróleo en 90 d por efecto del consorcio de bacterias-hongos. Los microorganismos de la rizosfera del pasto bermuda (*Cynodon dactylon*) removieron, en nueve meses, 69%

grass free soil only 4% was removed (Banks, 1997). Bacteria are less effective to degrade hydrocarbons with large chemical structure, but fungi has a more effective enzymatic machinery to attack hydrocarbons with larger molecular weight (Munnecke and Huysmans, 1998). Besides, the consortiums work better to carry out petroleum degradation than individual populations (Benka-Coker and Ekundayo, 1997). The loss of the light photooxidized fraction of n-alkane was not evaluated, which volatilise through the soil pores and reach the

de los HTP, pero en suelo sin planta se removió sólo 4% (Banks, 1997). Las bacterias son menos efectivas en la degradación de hidrocarburos con estructuras químicas grandes, pero los hongos poseen una maquinaria enzimática más efectiva para atacar los hidrocarburos de mayor peso molecular (Munnecke y Huysmans, 1998). Además, los consorcios funcionan mejor que las poblaciones individuales para efectuar la degradación del petróleo (Benka-Coker y Ekundayo, 1997). No se evaluó la pérdida de la fracción ligera fotooxidable de los n-alcanos, los cuales se volatilizan a través de los poros del suelo y llegan a la atmósfera (Kesley *et al.*, 1997) en las primeras 24 h, en climas templados (Rhykerd *et al.*, 1998). Tampoco se valoraron los hidrocarburos aromáticos volátiles como naftaleno, los cuales tienen una vida media de dos a cuatro semanas en el suelo (Cerniglia, 1992).

Producción de biomasa vegetal

En la Figura 7 se muestra las diferencias ($p=0.05$) en la producción de MS del pasto alemán a los 120 d con diferentes concentraciones de petróleo y con inóculos de bacterias y hongos. La mayor producción de MS (98 mg kg^{-1} HTP) fue en el tratamiento testigo. El petróleo adicionado al suelo restringió la producción de MS; las reducciones fueron 51 y 53% cuando se evaluó el pasto alemán en suelo con $50\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ y $100\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Cuadro 1). Estos resultados son similares a los obtenidos por Li *et al.* (1997) en plantas de cebada establecidas en suelo con $40\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de hidrocarburos totales extractables, y se redujo más de 50% de la biomasa. Asimismo, en maíz en suelo contaminado con 4400 mg kg^{-1} de hidrocarburos totales extractables, disminuyó 57% la biomasa aérea (Porta *et al.*, 1999).

CONCLUSIONES

El efecto conjunto de los hidrocarburos del petróleo y del sistema rizosférico del pasto alemán fue significativo en el tamaño de las poblaciones de las bacterias, de los hongos y de la asociación bacterias-hongos. La asociación bacteria-hongo tuvo efecto positivo y significativo en el tamaño de la población de los hongos. La reducción de los hidrocarburos del petróleo a los 120 d fue significativo por efecto de la asociación bacterias-hongos y por la rizosfera del pasto alemán. Esto confirma que las asociaciones son más efectivas en la descontaminación del suelo que las poblaciones individuales. La producción de biomasa del pasto alemán se relacionó significativamente con el suelo sin hidrocarburos (con 98 mg kg^{-1} HTP de origen biogénico), en menor grado con la misma concentración de petróleo pero con inóculos de bacterias, con hongos y con la asociación bacterias-

atmosphere (Kesley *et al.*, 1997) in the first 24 h, in temperate climates, (Rhykerd *et al.*, 1998). Volatile aromatic hydrocarbons such as naphthalene were not evaluated either; these hydrocarbons have an average life of two to four weeks in the soil (Cerniglia, 1992).

Vegetal biomass production

Differences ($p=0.05$) in DM production of *alemán* grass in 120 d with different concentrations of petroleum and with bacteria and fungi inoculations, are shown in Figure 7. The largest production of DM (98 mg kg^{-1} TPH) was found in the control treatment. The petroleum added to the soil restricted the production of DM; reductions of 51% and 53% were found when *alemán* grass was evaluated in a soil with $50\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ and $100\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Table 1). These results are similar to those obtained by Li *et al.* (1997) in barley planted in soils with $40\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ of total extractable hydrocarbons, and the biomass decreased more than 50%. Similarly, 57% of aerial biomass decreased 57% in corn produced in a polluted soil with 4400 mg kg^{-1} of total extractable hydrocarbons (Porta *et al.* 1999).

CONCLUSIONS

The combined effect of petroleum hydrocarbons and the rhizospheric system of the *alemán* grass was

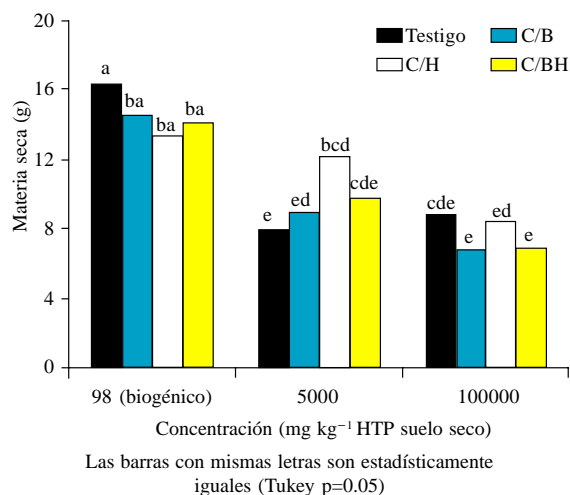


Figura 7. Producción de materia seca de pasto alemán a los 120 d en función del grado de contaminación del suelo con petróleo, no inoculado (testigo), inoculado con bacterias (C/B), con hongos (C/H) y con asociación de bacterias y hongos (C/BH).

Figure 7. Dry matter production of alemán grass at 120 d as a function of the level of petroleum soil contamination, not inoculated (control), inoculated with bacteria (C/B), with fungi (C/H) and with bacteria and fungi association (C/BH).

Cuadro 1. Reducción de materia seca del pasto alemán a los 120 d por efecto del petróleo y de los inóculos de bacterias y hongos.
Table 1. Reduction of dry matter of alemán grass, at 120 d, due to the effect of petroleum and inoculum of bacteria and fungi.

Tratamiento de microorganismos	Concentración de petróleo (mg kg ⁻¹ HTP)				
	98 (biogénico)	50 000		100 000	
	Materia seca (g)	Materia seca (g)	Reducción [†] (%)	Materia seca (g)	Reducción (%)
Testigo	16.3a [‡]	7.9e	51	8.8cde	46
Bacterias	14.5ab	9.0de	28	6.8e	53
Hongos	13.3ab	12.0cd	10	9.9de	25
Bacterias + hongos	14.2ab	9.8cde	31	7.3e	49

[†] Reducción en relación con el tratamiento con 98 mg kg⁻¹ de HTP dentro de la misma hilera.

[‡] Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, p=0.05).

hongos. 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 hidrocarburos del petróleo, aunque se reduce la producción de biomasa vegetal.

AGRADECIMIENTOS

Al Sr. José García Herrera y al Biólogo Mauricio Ortiz Ocampo, del Laboratorio de Remediación de Suelos del IMP, México, D. F., por el apoyo proporcionado en la extracción y cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo. Al CONACYT y al FIES, del Instituto Mexicano del Petróleo, por el financiamiento del proyecto.

LITERATURA CITADA

- Alexander, M. 1994. Introducción a la Microbiología del Suelo. 2a. Reimp. AGT Editor, S. A. México, D. F. 491 p.
- Aprill, W., and C. R. Sims. 1990. Evaluation of the prairies grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
- Atlas, M. R., A. Horowitz, M. Krichevly, and K. A. Bej. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiol. Ecol.* 22: 249-256.
- Banks, M. K. 1997. Phytoremediation of petroleum contaminated soils: field assessment. In: Coleman, B. C., and A. Lesson (Symposium Chairs). In situ and On-site bioremediation, Volumen 3. Papers from the Fourth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. New Orleans, USA. pp: 305-308.
- Benka-Coker, M. O., and J. A. Ekundayo. 1997. Applicability of evaluation the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil. *Environ. Monitoring Assessment* 45: 259-272.
- Cerniglia, C. E. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368.
- Colombo, J. C., M. Cabello, and A. M. Arambarri. 1996. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolitic fungi. *Environ. Poll.* 94: 355-362.
- Cunningham, S. D., T. A. Anderson, A. P. Schwab, and F. C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- Curl, E. A., and B. Truelove. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. 288 p.

significant in the size of populations of bacteria, fungi and bacteria-fungi association. Bacteria-fungi association had a positive and significant effect on the size of the fungi population. The reduction on petroleum hydrocarbons at 120 d was significant, based on the effect of the bacteria-fungi association and of the *alemán* grass rhizosphere. This proves that associations are more effective in soil decontamination than individual populations. *Alemán* grass biomass production was significantly related with soil without hydrocarbons (with 98 mg kg⁻¹ TPH of biogenic origin), at lower level with the same concentration of petroleum but with bacteria, fungi and association bacteria-fungi inoculated. Soil decontamination by bacteria associations, native fungi and grazing grasses, is a viable alternative for cleaning of soils contaminated with petroleum hydrocarbons, even though the biomass production is reduced.

—End of the English version—



- Diario Oficial de la Federación. 2002. NOM-EM-138-ECOL-2002. Diario Oficial de la Federación Tomo DLXXXVII No. 14. 20 de agosto 2002. pp: 44-53.
- EPA (Environmental Protection Agency). 1986. Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbon, Total Recoverable. Spectrophotometric Infrared. 8 p.
- Flathman, P. E., and G. R. Lanza. 1998. Phytoremediation: current views on an emerging green technology. *J. Soil. Contam.* 7: 415-432.
- Foster, R. C., and A. D. Rovira. 1978. The ultrastructure of the rhizosphere of *Trifolium subterraneum* L. In: Loutit, M. W., and J. A. R. Miles (eds.). *Microbial Ecology*. Springer-Verlag, Berlin, Germany. pp: 278-290.
- Gould, F. W., y R. B. Shaw. 1992. Gramíneas. Clasificación Sistemática. 1a. ed. AGT Editor, S. A. México. 381 p.
- INEGI. 2001. Síntesis de Información Geográfica del estado de Tabasco. 1ª. ed. Aguascalientes, Ags. 89 p. Anexo cartográfico.
- Ingraham, J. L., y C. A. Ingraham. 1998. Introducción a la Microbiología. Volumen 1. Editorial Reverté. Barcelona, España. 328 p. Apéndices.

- ISSS-ISRIC-FAO. 1998. World Reference Base for Soil Resources. World Soil Resources Reports 84. Rome, Italy. 91 p.
- Katznelson, H. 1946. The rhizosphere effect on mangels on certain group of microorganisms. *Soil Sci.* 62: 343-354.
- Kesley, J., B. Kottler, and M. Alexander. 1997. Selective chemicals extractants to predict bioavailability of soil-aged organic chemicals. *Environ. Sci. Technol.* 31: 214-217.
- Lambers, H., F. S. Chapin III, and T. L. Pons. 1998. *Plant Physiological Ecology*. Springer-Verlag. New York, USA. 540 p.
- Li, X., Feng, Y., and N. Sawatsky. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant and Soil* 192: 251-261.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, y J. Parker. 1998. *Brock Biología de los Microorganismos*. 8a. ed. rev. y aum. Prentice Hall Iberia. Madrid, Esp. 1064 p.
- Munnecke, D. M., and K. Huysmans. 1998. Fungal composting processes for polyaromatic hydrocarbons. Annual AAPG Conventions. Salt Lake City, Utah, USA. 5/17-20. Extended Abst. No. A477 Vol. 2.
- Nichols, T. D., D. C. Wolf, H. B. Rogers, C. A. Beyrouty, and C. M. Reynolds. 1997. Rhizosphere microbial populations in contaminated soils. *Water Air Soil Poll.* 95: 165-178.
- Porta, A., N. Filliat, and N. Plata. 1999. Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. *In*: Leeson, A. and B. C. Alleman (eds). *Phytoremediation and innovative strategies for specialized remedial applications*. The Fifth International In Situ and On-Site Bioremediation Symposium. San Diego, CA, USA. Batelle Press. pp: 51-56.
- PROFEPA. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente. 2002. *Emergencias ambientales*. Delegación Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 1 p.
- Pothuluri, V. J., and C. E. Cerniglia. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *In*: Chaudry, R. G. (ed.). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Dioscorides Press Portland. Oregon, USA. pp: 92-123.
- Radwan, S., N. Sorkhoh, and I. El-Nemr. 1995. Oil degradation around roots. *Nature (London)* 376: 302.
- Rhykerd, R. L., D. Sen, K. J. McInnes, and R. W. Weaver. 1998. Volatilization of crude oil from soil amended with bulking agents. *Soil Sci.* 163: 87-92.
- Rivera-Cruz, M. del C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke H., R. Rodríguez V., y L. Fernández L. 2002 a. Población microbiana en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia* 36: 149-160.
- Rivera-Cruz, M. del C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke H., R. Rodríguez V., y L. Fernández L. 2002 b. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20: 423-434.
- SAS Institute Inc. 1989. *SAS/IML* Software: Usage and Reference*, version 6, First edition. SAS Institute Inc. Cary, NC, USA. 501 p.
- Thorn, G. 1997. The fungi in soil. *In*: van Elsland, J. D., J. T. Trevors, and E. M. H. Wellington (eds). *Modern Soil Microbiology*. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. pp. 63-127.