

FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON COMBUSTÓLEO UTILIZANDO *Phaseolus coccineus* Y FERTILIZACIÓN ORGÁNICA E INORGÁNICA

PHYTOREMEDIATION OF A FUEL OIL-POLLUTED SOIL WITH *Phaseolus coccineus* USING ORGANIC OR INORGANIC FERTILIZATION

Ronald Ferrera-Cerrato¹, Alejandro Alarcón¹, María R. Mendoza-López², Wendy Sangabriel³, Dora Trejo-Aguilar³, J. Samuel Cruz-Sánchez², Carlos López-Ortiz¹ y Julián Delgadillo-Martínez¹

¹Área de Microbiología. Campus Montecillo. Colegio de Postgraduados. 56230. Carretera México- Texcoco km 36.6. Montecillo, Estado de México. (alexala@colpos.mx). ²Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA). Universidad Veracruzana. 91190. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Colonia Industrial Ánimas. Xalapa, Veracruz. ³Facultad de Agronomía. Universidad Veracruzana s/n. Lomas del Estadio. C.P. 91090. Xalapa, Veracruz.

RESUMEN

La fitorremediación es una tecnología alternativa de bajo costo para limpiar suelos contaminados con petróleo, al estimular la actividad microbiana en la rizósfera para degradar contaminantes. En este trabajo se evaluó la bioestimulación con fertilización inorgánica (solución nutritiva) u orgánica (vermicomposta de café) de *Phaseolus coccineus* (Pcocc) para determinar su potencial de limpiar un suelo contaminado con combustóleo (50 000 mg kg⁻¹). Se evaluó el crecimiento de la planta, poblaciones microbianas, y la desaparición cualitativa de hidrocarburos del combustóleo mediante GC-MS. El combustóleo redujo significativamente ($p \leq 0.05$) el crecimiento de Pcocc. El efecto negativo de este contaminante fue compensado con la fertilización, particularmente inorgánica, al estimular el crecimiento y la acumulación de materia seca de las plantas. La población microbiana de la rizósfera contaminada fue parcialmente estimulada por la presencia de la planta y por la aplicación de los fertilizantes. La fertilización redujo los hidrocarburos del combustóleo en la rizósfera. Este estudio es uno de los primeros reportes de la fitorremediación de hidrocarburos en suelo usando Pcocc.

Palabras clave: Frijol ayocote, hidrocarburos, rizósfera, solución nutritiva, vermicomposta.

INTRODUCCIÓN

En México, el derrame accidental de hidrocarburos derivados del petróleo conduce a una contaminación constante de tierras de cultivo. En el Estado de Veracruz en el 2002 hubo 41 emergencias ambientales asociadas con el derrame de sustancias, incluyendo hidrocarburos, elementos alcalinotérreos, ácidos, alcoholes y otros (PROFEPA, 2003). La mayoría de los derrames accidentales ocurren durante la

ABSTRACT

Phytoremediation is an alternative, low-cost technology to clean up petroleum contaminated soils by stimulating microbial activity in the rhizosphere to degrade pollutants. This study evaluated biostimulation by fertilizing *Phaseolus coccineus* (Pcocc) with inorganic (nutrient solution) or organic (vermicompost made of coffee residues) fertilizer to determine its potential during phytoremediation of soil contaminated with fuel oil (50 000 mg kg⁻¹). Plant growth, microbial populations, and qualitative disappearance of fuel oil-derived hydrocarbons were evaluated with GC-MS. Fuel oil reduced growth of Pcocc significantly ($p \leq 0.05$). The negative effect of this pollutant was compensated by fertilization, particularly with inorganic fertilizer, which stimulated plant growth and accumulation of dry matter of the plants. The microbial population in the contaminated rhizosphere was partially stimulated by the presence of the plant and by application of the fertilizers. Fertilization reduced fuel oil hydrocarbons in the rhizosphere. This study is one of the first reports of soil phytoremediation with Pcocc.

Key words: Ayocote bean, hydrocarbons, rhizosphere, nutrient solution, vermicompost.

INTRODUCTION

In México, accidental spills of fuel oil-derived hydrocarbons lead to constant pollution of croplands. In 2002 in the State of Veracruz there were 41 environmental emergencies associated with spills of substances, including hydrocarbons, alkaline earth metals, acids, alcohols and others (PROFEPA, 2003). Most of the accidental spills occur when fuels are transported overland or through pipelines, such as the 2003 accident in Frijol Colorado, Veracruz. At this site, soil samples were taken to experiment with phytoremediation under controlled conditions. Fuel oil (No. 6) is a complex, variable mixture of alkanes,

Recibido: Octubre, 2006. Aprobado: Octubre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 41: 817-826. 2007.

conducción y el transporte de combustibles, como el sucedido en 2003 en Frijol Colorado, Veracruz, donde se tomaron muestras de suelo para hacer ensayos de fitorremediación en condiciones controladas. El combustible (fuel oil No. 6) es una mezcla compleja y variable de alcanos, alquenos, cicloalcanos, hidrocarburos aromáticos y porcentajes bajos de compuestos que contienen azufre y nitrógeno (Philip *et al.*, 1984).

Para limpiar suelos contaminados hay tecnologías costosas como la excavación, la incineración, el lavado y la bioventilación. La fitorremediación es una alternativa donde se usa plantas y la asociación microorganismo-raíz para remover o contener contaminantes en el suelo (Cunningham *et al.*, 1996). En suelos moderadamente contaminados, la fitorremediación tiene bajo costo en comparación con técnicas físicas y químicas (Siciliano and Germida, 1998).

Se ha evaluado el efecto de las plantas y la asociación rizosférica en la degradación de hidrocarburos del petróleo (Ferro *et al.*, 1994; Schwab y Banks, 1994; Reilley *et al.*, 1996). Las leguminosas normalmente tienen un sistema radical poco ramificado pero profundo que les permite actuar sobre contaminantes en las capas más profundas del suelo (Kirk *et al.*, 2002). Su simbiosis con fijadores de nitrógeno (N) del género *Rhizobium* las libera de la necesidad de absorber N, por lo que son más competitivas en suelos con baja fertilidad. Esta característica es importante, ya que la contaminación con hidrocarburos incrementa la relación C/N, afectando la disponibilidad del N.

Comparadas con gramíneas, las leguminosas pueden incrementar hasta diez veces la población de bacterias en su rizósfera (Yateem *et al.*, 1999). Sin embargo, para la fitorremediación de hidrocarburos es importante seleccionar especies de leguminosas con adaptación a las condiciones de sitio y a la concentración del contaminante. Sangabriel *et al.* (2006) reportaron tolerancia de *Phaseolus coccineus* al combustible. Por lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el potencial de *P. coccineus* en la fitorremediación de un suelo contaminado con combustible con dos tratamientos de fertilización.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de muestras de suelo

Se usó suelo contaminado (SC) con combustible (50 000 mg kg⁻¹) de la localidad de Frijol Colorado, Veracruz, 19° 35' 16" N y 97° 21' 06" O, y 2410 m de altitud. El área afectada por el derrame fue aproximadamente 100 m². El suelo presentó pH 6.6, 0.1% N, 25 µg g⁻¹ P Olsen, 2.1% materia orgánica (MO), y textura franca. Se tomaron siete muestras de el suelo de la

alkenes, cyclo-alkanes, aromatic hydrocarbons, and low percentages of compounds containing sulfur and nitrogen (Philip *et al.*, 1984).

For cleaning polluted soils there is costly technology, such as excavation, incineration, lixiviation, and bio-ventilation. Phytoremediation is an alternative in which plants and the microorganism-root associations are used to remove or contain soil pollution (Cunningham *et al.*, 1996). In moderately contaminated soils, phytoremediation is inexpensive compared with physical and chemical techniques (Siciliano and Germida, 1998).

The effect of plants and their rhizospheric associations on petroleum hydrocarbon degradation has been evaluated (Ferro *et al.*, 1994; Schwab and Banks, 1994; Reilley *et al.*, 1996). Legumes normally have a scantily ramified, but deep, radical system that allows them to act on pollutants in the deepest layers of soil (Kirk *et al.*, 2002). Symbiosis with nitrogen-fixing bacteria of the genus *Rhizobium* frees them from the necessity of absorbing N, making them more competitive in unfertile soils. This characteristic is important since pollution by hydrocarbons increases the C/N ratio and affects availability of N.

Compared with grasses, legumes can increase the population of bacteria in their rhizosphere by up to 10 times (Yateem *et al.*, 1999). However, for phytoremediation of hydrocarbons, it is important to select leguminous species that are able to adapt to the conditions of the site and to the concentration of the pollutant. Sangabriel *et al.* (2006) reported that *Phaseolus coccineus* tolerates the presence of fuel oil. Thus, the objective of this study was to evaluate the potential of *P. coccineus* in phytoremediation of a soil contaminated by fuel oil under two treatments of fertilization.

MATERIALS AND METHODS

Soil sampling

A soil polluted (SC) by fuel oil (50 000 mg kg⁻¹) was collected from Frijol Colorado, Veracruz, 19° 35' 16" N and 97° 21' 06" W, altitude 2410 m. The area affected by the spill was approximately 100 m². Characteristics of the soil were pH 6.6, 0.1% N, 25 µg g⁻¹ P Olsen, 2.1% organic matter (OM), and loam texture. Seven soil samples were taken from the polluted zone (20-30 cm deep); these were homogenized to obtain a compound sample of 35 kg. Near the sampled area, non-polluted soil (SNC) was sampled. This soil, cultivated under corn, had similar characteristics of texture and pH (Sangabriel *et al.*, 2006). Samples were taken in a zig-zag pattern (Paetz and Wilke, 2005).

zona contaminada (20-30 cm profundidad) que se homogeneizaron para obtener una muestra compuesta de 35 kg. Cerca de la área muestreada se tomaron muestras de suelo no contaminado (SNC), cultivado con maíz, con similares características en textura y pH (Sangabriel *et al.*, 2006). El método de muestreo fue en zig-zag (Paetz y Wilke, 2005).

Establecimiento del experimento

Se estableció en invernadero el experimento de fitorremediación; la temperatura máxima/mínima y humedad relativa promedio fueron 23.5/11.9 °C y 63/71%. Las unidades experimentales fueron recipientes de cristal ámbar rellenos con suelo (250 g por unidad). Se usó SC con combustóleo y SNC que se prepararon así: la muestra compuesta se dividió en tres partes, en una parte se aplicó 5% MO (FOrg; vermicomposta de café); en otra parte se aplicó solución nutritiva completa de Long Ashton (Hewitt, 1966) que fue el tratamiento con fertilización inorgánica (FInor); el suelo restante se mantuvo sin fertilización (NoF). Se usó *P. coccineus* L. (Pcocc) como la especie a evaluar. En cada unidad experimental se sembraron dos semillas de Pcocc. Se hicieron riegos controlados con agua destilada para mantener el suelo a capacidad de campo.

Hubo dos tratamientos más (SC y SNC sin planta) para evaluar la posible atenuación natural del combustóleo. Pero no se fertilizó, por lo que los datos de población microbiana, se analizaron por separado del experimento con Pcocc.

Variables

1) En las plantas se determinó la altura semanalmente empezando 7 d después de la emergencia. A los 90 d se midió el volumen radical y la materia seca (MS) producida.

2) La población de bacterias y hongos rizosféricos totales y degradadores de hidrocarburos se determinó a los 90 d usando el método de dilución y cuenta viable de unidades formadoras de colonias (UFC) crecidas en su medio de cultivo en caja de Petri (Ingraham e Ingraham, 1998). Para bacterias totales se usó agar nutritivo (Baker[®]) y para hongos totales papa-dextrosa agar (PDA, Baker[®]). Para las poblaciones de bacterias y hongos tolerantes a petróleo se usó medio mineral (por L: 0.8 g K₂HPO₄; 0.2 g KH₂PO₄; 0.2 g MgSO₄·7H₂O; 0.06 g CaCl₂; 0.1 g NaCl₂; 0.025 Na₂MoO₄·2H₂O; 0.28 NaFe-EDTA; 5 µg biotina y 10 µg ácido *p*-amino benzoico; pH 7) con petróleo crudo como fuente de carbono. El petróleo se aplicó en papel filtro embebido y adherido en el interior de la contratapa de la caja de Petri. Las cajas se incubaron 24-72 h a 25 °C, dependiendo del crecimiento microbiano. Los conteos se transformaron a unidades logarítmicas para su análisis estadístico y presentación de resultados.

3) La degradación de combustóleo se determinó a los 90 d, mediante extracción y cuantificación de hidrocarburos de dos muestras compuestas de suelo de cada tratamiento. La extracción se hizo con diclorometano mediante agitación mecánica (Schwab *et al.*, 1999) usando el método modificado EPA 8270B SW-846 (USEPA 1986; Louchouart *et al.*, 2000). Los extractos se concentraron por

Experimental setup

The phytoremediation experiment was set up in a greenhouse with maximum/minimum temperatures of 23.5/11.9 °C and relative humidity of 63/71%. Experimental units were amber-colored glass recipients filled with soil (250 g per unit). Soil polluted (SC) by fuel oil and non-polluted soil (SNC) were prepared in the following manner. The compound soil sample was divided into three parts: 5% organic fertilizer (FOrg: vermicompost made from coffee residues) was applied in one of the parts; in another part complete Long Ashton (Hewitt, 1966) nutritive solution (inorganic fertilization treatment; FInor) was applied; the remaining third was kept without fertilization (NoF). *Phaseolus coccineus* L. (Pcocc) was used as the species to be assessed. In each experimental unit, two Pcocc seeds were planted and irrigated twice with distilled water; irrigation was controlled to maintain soil moisture at field capacity.

There were two additional treatments (SC and SNC without plants) to evaluate the possible natural degradation of the fuel oil. These treatments were not fertilized, and so the data on microbial population were analyzed separately.

Variables

1) Plant height was measured weekly as of 7 d after emergence. On day 90, root volume and dry matter (MS) produced were measured.

2) Total populations of rhizospheric bacteria and fungi, and hydrocarbon degraders were determined on day 90 using the method of dilution and viable count of colony-forming units (UFC) grown in culture medium in a Petri dish (Ingraham and Ingraham, 1998). For total bacteria, nutritive agar (Baker[™]) was used, and for total fungi, potato-dextrose agar (PDA, Baker[™]) was used. For bacterial and fungal populations tolerant to fuel oil, a mineral medium was used (per L: 0.8 g K₂HPO₄, 0.2 g KH₂PO₄, 0.2 g MgSO₄·7H₂O, 0.06 g CaCl₂, 0.1 g NaCl₂, 0.025 g Na₂MoO₄·2H₂O, 0.28 NaFe-EDTA, 5 µg biotin, and 10 µg *p*-amino benzoic acid; pH 7) with crude oil as the source of carbon. Filter paper was saturated with crude oil and adhered to the inner part of the Petri dish cover. The Petri dishes were incubated 24-72 h at 25 °C, depending on microbial growth. Counts were transformed to logarithmic units for statistical analysis and presentation of results.

3) Fuel oil degradation was determined at 90 d by extraction and hydrocarbons of two compound samples of soil from each treatment were quantified. Extraction was done by mechanical shaking with dichloromethane (Schwab *et al.*, 1999) using the modified EPA 8270B SW-846 method (USEPA 1986; Louchouart *et al.*, 2000). The extracts were concentrated by evaporating the solvent; a 1 mL final aliquot was collected for qualitative analysis with GC-MS in a gas chromatograph (Hewlett-Packard GCD PLUS G1800-B) and HP-5 capillary column (5%-phenyl)-methylpolysiloxane (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 µm film thickness). Each component was identified on the basis of its retention time and by comparing its mass spectrum (70 eV) in the HP-Chemstation-NIST MS, version A.00.00-1995 library. Qualitative analysis of the fuel oil compounds is presented in the chromatograms.

evaporación del solvente, recolectando una alícuota final de 1 mL para su análisis cualitativo con GC-MS en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard GCD PLUS G1800-B y una columna capilar HP-5 (5%-fenil)-metilpolisiloxano (30 m; 0.25 mm i.d.; 0.25 μ m espesor de película). Cada componente se identificó con base en su tiempo de retención y por la búsqueda y comparación de su espectro de masas (70 eV) en la biblioteca del HP-Chemstation-NIST MS, versión A.00.00-1995. El análisis cualitativo de los compuestos del combustóleo se presenta en los cromatogramas.

Análisis estadístico

El diseño experimental fue completamente al azar con un arreglo factorial 2 \times 3, y seis tratamientos con 8 repeticiones cada uno. Los factores fueron condición del suelo (SC y SNC) y fertilización (NoF, FInorg, y FOrg). Se hizo un análisis de varianza de los datos y se usó la prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$), con el programa SAS (SAS Institute, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La presencia del combustóleo en el suelo redujo significativamente el crecimiento y desarrollo de *Pcocc*, mientras que la fertilización (tratamiento FInor y FOrg) estimuló significativamente ($p \leq 0.001$) la altura de las plantas desde los 70 d, con respecto a plantas testigo (NoF) en SC (Figura 1). Estos efectos se mantuvieron hasta los 90 d, cuando la FInor en SC produjo alturas semejantes a la de plantas en SNC (Cuadro 1).

La fertilización en SC, particularmente con FInor, tuvo efectos significativos ($p \leq 0.05$) en todas las variables de crecimiento, excepto para el peso seco de la parte aérea (Cuadro 1). Las plantas en SC presentaron menor altura y MS comparado con plantas en SNC. La interacción condición del suelo \times fertilización tuvo efectos significativos ($p \leq 0.05$) en todas las variables de crecimiento (Cuadro 1). Las plantas expuestas a SC tuvieron menor peso seco total, el cual fue estimulado con FInor y comparable al de plantas en SNC (Figura 2).

El combustóleo redujo 56% el peso seco total de *Pcocc* a los 90 d, lo cual corrobora el efecto negativo de los hidrocarburos del petróleo en el crecimiento de las plantas reportado por Baker (1970), Adam y Duncan (2003) y Quiñones-Aguilar *et al.* (2003).

Al aplicar FInor y FOrg, la MS de las plantas aumentó 150% y 90%, con respecto al testigo en SC. Así se muestra el efecto benéfico de la fertilización en el crecimiento de plantas establecidas en suelos contaminados, como se reportó para gramíneas (Hutchinson *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002). Sin embargo, pocos estudios han evaluado leguminosas con importancia agrícola en fitorremediación (Wiltse *et al.*, 1998;

Statistical analysis

The complete random experimental design had a factorial arrangement of 2 \times 3 and six treatments with 8 replications each. The factors were soil condition (SC and SNC) and fertilization (NoF, FInorg and FOrg). An analysis of variance and the Tukey test of comparison of means ($p \leq 0.05$) were performed on the data, using the SAS software (SAS Institute, 2002).

RESULTS AND DISCUSSION

The presence of fuel oil significantly reduced growth and development of *Pcocc*, while fertilization (treatments FInor and FOrg) significantly stimulated ($p \leq 0.001$) plant height from 70 d, compared with control plants (NoF) in SC (Figure 1). These effects persisted up to 90 d when FInor in SC produced heights similar to plants in SNC (Table 1).

Fertilization in SC, particularly with FInor, had significant effects ($p \leq 0.05$) on all of the growth variables, except for dry weight of the aerial part (Table 1). Plants in SC had lower height and DM as compared to SNC plants. The soil condition \times fertilization interaction had significant effects ($p \leq 0.05$) in all growth variables Table 1. Plants exposed to SC had lower total dry weight, which was stimulated by FInor and comparable to SNC plants (Figure 2).

Fuel oil reduced total dry weight of *Pcocc* by 56% at 90 d, corroborating the negative effect of petroleum hydrocarbons on plant growth reported by Baker

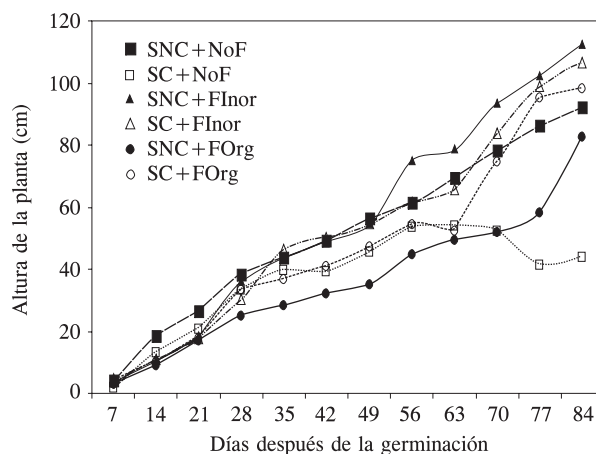


Figura 1. Valores promedio de la altura de *Phaseolus coccineus* L. sin fertilización (NoF), fertilización inorgánica (FInor) o fertilización orgánica (FOrg) en suelo no contaminado (SNC, símbolos cerrados) o suelo contaminado con combustóleo (SC, símbolos abiertos). $n=8$.

Figure 1. Average values for height of *Phaseolus coccineus* L. without fertilization (NoF), inorganic fertilization (FInor) or organic fertilization (FOrg) in non-polluted soil (SNC, blacked in symbols) or soil polluted by fuel oil (SC, outlined symbols). $n=8$.

Cuadro 1. Crecimiento de *Phaseolus coccineus* con fertilización (F) inorgánica (FInor) u orgánica (FOrg), en suelo no-contaminado (SNC) o contaminado con combustóleo (SC), después de 90 d.**Table 1. *Phaseolus coccineus* growth with inorganic (FInor) or organic (FOrg) fertilization (F) in non-polluted soil (SNC) or contaminated by fuel oil (SC) after 90 d.**

Condición del suelo (CS)	F	Altura (cm)	Volumen radical (cm ³)	Peso seco (g)		Raíz/Parte aérea (g g ⁻¹)
				Parte aérea	Raíz	
SNC	NoF	103.4 ab	2.3 b	1.7 a	0.6 ab	0.4 ab
	FInor	112.4 a	2.2 b	1.7 a	0.7 ab	0.4 ab
	FOrg	82.4 c	2.6 a	1.6 a	0.3 bc	0.2 b
SC	NoF	87.6 bc	0.9 c	0.8 b	0.2 c	0.3 ab
	FInor	106.6 a	2.1 b	1.7 a	0.8 a	0.5 a
	FOrg	98.1 abc	2.3 b	1.4 ab	0.5 bc	0.3 ab
	CS	NS	0.001	0.05	NS	NS
	F	0.001	0.001	NS	0.001	0.05
	CS×F	0.001	0.001	0.01	0.001	0.05

abc = Medias en una columna con diferente letra son estadísticamente diferentes ($p \leq 0.05$); NS = no significativo; n = 8.

Robson *et al.*, 2003; Merkl *et al.*, 2005). El presente estudio es uno de los primeros reportes sobre la adaptación de Pcoc en SC y respuesta positiva a la FOrg o FInor.

Con respecto al análisis microbiológico de la rizósfera, la condición del suelo, fertilización y la interacción de ambos factores no tuvieron efectos significativos en la población de bacterias y hongos filamentosos totales (Cuadro 2). Para las bacterias de vida libre-fijadoras de N atmosférico (BFN), la condición de suelo y la interacción condición de suelo×fertilización tuvieron efectos significativos ($p \leq 0.05$). Para bacterias tolerantes a hidrocarburos, el factor fertilización ($p \leq 0.01$) y la interacción condición del suelo×fertilización ($p \leq 0.05$) fueron significativos. La población de hongos tolerantes fue afectada significativamente por la interacción condición de suelo×fertilización ($p \leq 0.05$).

Al comparar las poblaciones microbianas de la rizósfera con las del suelo sin planta, sólo la población de hongos tolerantes fue mayor en presencia de Pcoc (Cuadros 2 y 3). La población de BFN fue menor en presencia de Pcoc comparado con el suelo sin planta (Cuadros 2 y 3). No hubo diferencias significativas en las poblaciones microbianas entre el SNC y el SC sin planta (Cuadro 3).

Típicamente, los hidrocarburos estimulan la población microbiana en el suelo (Atlas, 1995; Van Hamme *et al.*, 2003), y ésta aumenta significativamente en la rizósfera (Kim *et al.*, 2005). Lo anterior es contrario a lo observado en el presente estudio para bacterias y hongos totales, cuya población no presentó diferencias significativas entre tratamientos, excepto la población de BFN que fue mayor en la rizósfera de SC con FOrg.

(1970), Adam and Duncan (2003) and Quiñones-Aguilar *et al.* (2003).

When FInor and FOrg was applied, plant dry weight (MS) increased by 150% and 90%, compared with the control in SC. Thus, the effect of fertilization on growth of plants established in polluted soils was beneficial as reported for grasses (Hutchinson *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2002). However, few studies have evaluated important crop legumes in

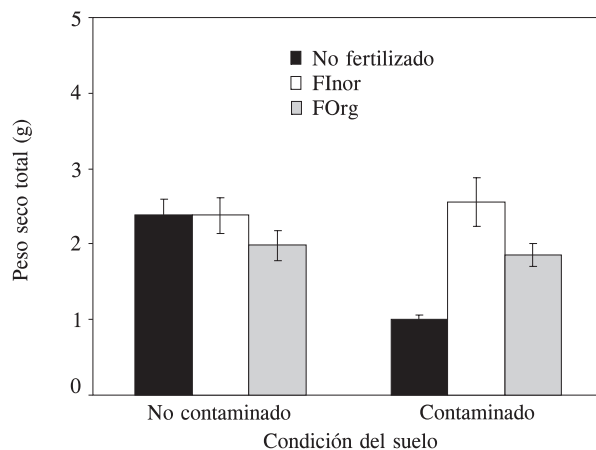


Figura 2. Efecto de la fertilización inorgánica (FInor) y orgánica (FOrg) en el peso seco total de *Phaseolus coccineus* en suelo no contaminado o contaminado con combustóleo, después de 90 d. Condición del suelo ($p \leq 0.05$); fertilización ($p \leq 0.01$); interacción de ambos factores ($p \leq 0.01$). Barras ± error estándar; n=8.

Figure 2. Effect of inorganic (FInor) and organic (FOrg) fertilization in total dry weight of *Phaseolus coccineus* in non-polluted soil or soil polluted with fuel oil after 90 d. Soil condition ($p \leq 0.05$); fertilization ($p \leq 0.01$); interaction of both factors ($p \leq 0.01$). Bars ± standard error.

Cuadro 2. Efecto de combustóleo y fertilización (F) inorgánica (FInor) y orgánica (FOrg), en la población microbiana (unidades logarítmicas formadoras de colonias, Log₁₀UFC) de la rizósfera de *Phaseolus coccineus*, después de 90 d.

Table 2. Effect of fuel oil and fertilization (F), inorganic (FInor) and organic (FOrg), on the microbial population (logarithmic colony forming units, Log₁₀UFC) of the *Phaseolus coccineus* rhizosphere, after 90 d.

Condición del suelo (CS)	F	Bacterias Log ₁₀ UFC			Hongos filamentosos Log ₁₀ UFC	
		Totales	BFN [†]	Tolerantes a hidrocarburos	Totales	Tolerantes a hidrocarburos
SNC	NoF [‡]	7.2	Nd	7.0 b	4.2	4.1
	FInor	7.4	6.6 ab	7.4 a	4.3	3.9
	FOrg	7.4	6.5 b	7.3 ab	4.2	3.7
SC	NoF	7.4	Nd	7.2 ab	4.3	4.2
	FInor	7.3	6.7 ab	7.2 ab	4.3	3.6
	FOrg	7.3	7.3 a	7.4 a	4.2	4.2
	CS	NS	0.05	NS	NS	NS
	F	NS	NS	0.01	NS	NS
	CS×F	NS	0.05	0.05	NS	0.05

[†] Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico.

[‡] NoF = no fertilizado.

ab = Medias en una columna con letra son estadísticamente diferentes (p≤0.05); Nd = no determinado; NS = no significativo. n = 3.

Cuadro 3. Efecto de combustóleo en la población microbiana (unidades logarítmicas formadoras de colonias, Log₁₀UFC) en suelo sin presencia de planta, después de 90 d.

Table 3. Effect of fuel oil on microbial population (colony-forming logarithmic units, Log₁₀UFC) in soil without plants, after 90 d.

Condición del suelo sin planta	Bacterias Log ₁₀ UFC			Hongos filamentosos Log ₁₀ UFC	
	Totales	BFN [†]	Tolerantes a hidrocarburos	Totales	Tolerantes a hidrocarburos
SNC	7.2	7.1	7.2	4.3	3.0
SC	7.2	7.1	7.2	4.3	3.0
Tratamiento	NS	NS	NS	NS	NS

[†] Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico.

NS = no significativo. n = 3.

Además, la población de microorganismos rizosféricos fue similar a la observada en SC sin planta. Este efecto puede estar relacionado con la estimulación de la población microbiana cuando los hidrocarburos son recién derramados en el suelo (Atlas, 1995), misma que se atenúa al aumentar el tiempo de exposición al contaminante. Dicha reducción en la estimulación microbiana puede relacionarse con el aumento de la relación C:N, causando que el N sea limitante para plantas y microorganismos (Adam y Duncan, 2003).

La proliferación de bacterias que fijan N atmosférico puede ser importante en la dinámica del N en el suelo durante la fitorremediación (Adam y Duncan, 2003). En el presente estudio la población de BFN fue estimulada principalmente por la rizósfera. Pero ni en SC ni en SNC se detectaron nódulos radicales de *Rhizobium*, indicando que las rizobias compatibles a Pcooc están limitadas en el suelo muestreado.

phytoremediation (Wiltse *et al.*, 1998; Robson *et al.*, 2003; Merkl *et al.*, 2005). Our study is one of the first reports on adaptation of Pcooc in SC and the positive response to FOrg or FInor.

With respect to the microbiological analysis of the rhizosphere, soil condition, fertilization, and the interaction between the two factors had no significant effects on the total populations of bacteria and filamentous fungi (Table 2). For free-living nitrogen-fixing bacteria (BFN), the soil condition and the interaction soil condition×fertilization had significant effects (p≤0.05). For hydrocarbon-tolerant bacteria, fertilization (p≤0.01) and the interaction soil condition×fertilization (p≤0.05) had significant effects. The population of petroleum-tolerant fungi were significantly affected only for the interaction between soil condition×fertilization (p≤0.05).

When microbial populations in the rhizosphere were compared with those in soil without plants,

La degradación del combustóleo en la rizósfera fue estimulada al aplicar FOrg o FInor (Figura 3C-D). El beneficio de la fertilización en SC se relaciona con la estimulación del crecimiento de plantas y microorganismos rizosféricos, contribuyendo en la degradación del contaminante (Anderson *et al.*, 1993; Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2004; Pilon-Smits, 2005). La sola presencia de Pcoc no influyó en la degradación del combustóleo (Figura 3A-B) en comparación con los tratamientos fertilizados (Figura 3C-D). Esto denota la importancia de aplicar fertilizantes en plantas como Pcoc, cuya capacidad de tolerar la contaminación por hidrocarburos se había evaluado (Sangabriel *et al.*, 2006), para facilitar la degradación de los compuestos contaminantes en su rizósfera, como se mostró en este estudio.

El combustóleo está constituido por una mezcla compleja de hidrocarburos: parafinas (n-alcanos, alcanos ramificados, cicloalcanos), compuestos alquil monoaromáticos (tolueno, etilbenceno), poliaromáticos (PAH; fenantreno, pireno, naftaleno, etcétera); y compuestos con N y azufre (Yender *et al.*, 2002). Los PAH son muy insolubles, poco degradables y por tanto muy persistentes en el ambiente, y presentan gran afinidad por los tejidos grasos lo que favorece su bioacumulación y permanencia por muchos años (Neff *et al.*, 2000).

only the tolerant fungal populations were greater in the presence of Pcoc (Tables 2 and 3). The BFN population was lower in the presence of Pcoc compared with that in soil without plants (Tables 2 and 3). There were no significant differences between the microbial populations in SNC and SC without plants (Table 3).

Typically, hydrocarbons stimulate microbial populations in the soil (Atlas, 1995; Van Hamme *et al.*, 2003), and these increase significantly in the rhizosphere (Kim *et al.*, 2005). This contrasts with the results of our study for total bacteria and fungi, whose populations did not exhibit significant differences among treatments, except for the BFN population, which was greater in the rhizosphere of SC with FOrg.

Also, the population of microorganisms in the rhizosphere was similar to that observed in SC without plants. This effect could be related to stimulation of the microbial population when a hydrocarbon spill is recent in the soil (Atlas, 1995); however, this population tends to decrease with time of exposure to the pollutant. This reduction in microbial stimulation can be related to the increase in the C:N ratio, limiting N for plants and microorganisms (Adam and Duncan, 2003).

Proliferation of N-fixing bacteria can be important in the dynamics of soil N during phytoremediation

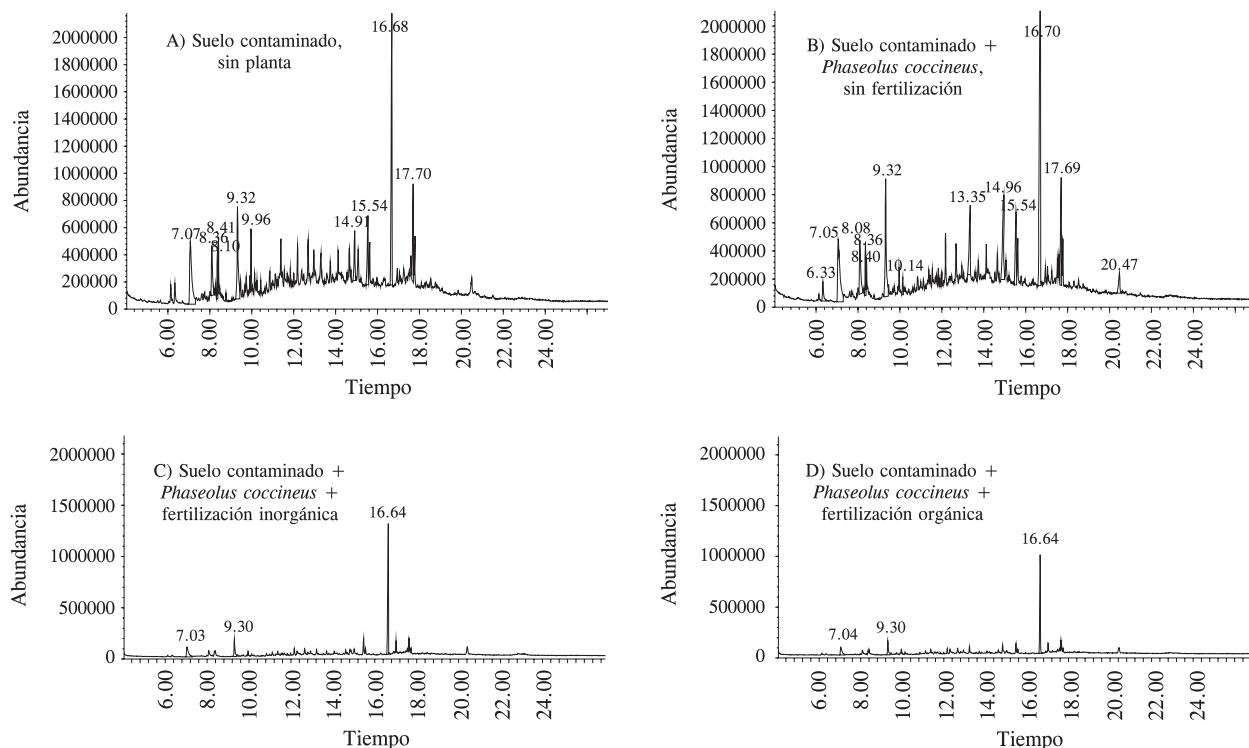


Figura 3. Cromatogramas que muestran la presencia/desaparición de compuestos del combustóleo, después de 90 d.
Figure 3. Chromatograms that show the presence/disappearance of fuel oil compounds, after 90 d.

Mediante análisis de GC-MS se ha identificado la presencia de compuestos orgánicos derivados del combustóleo en SC, destacando los hidrocarburos monoaromáticos (3,4-dimetiltiofeno) y poliaromáticos (naftaleno y sus derivados), descritos por Sangabriel *et al.* (2006).

En el presente estudio la biodegradación del combustóleo fue estimulada por la FOrg y FInor lo cual contribuyó a disminuir la proporción de los hidrocarburos aromáticos en el suelo contaminado. La proporción de los hidrocarburos 3,4-dimetiltiofeno, 1,2-dihidro-1-fenilnaftaleno, 1-fenilnaftaleno, y 1-metil-2-fenil-1H-indol, reportados inicialmente en el mismo SC (Sangabriel *et al.*, 2006), disminuyó después del tratamiento.

No todos los hidrocarburos se degradan con la misma facilidad porque la tasa de biodegradación disminuye con el aumento del peso molecular y la complejidad de los hidrocarburos, y es inversamente proporcional al número de anillos y de sustituciones. Los más volátiles son los hidrocarburos monoaromáticos y su disminución es notable en el proceso de degradación natural, llegando incluso a desaparecer (Wang y Fingas, 1994).

La planta Pocc se cultiva en la zona donde se produjo el derrame accidental, por lo que puede contribuir a largo plazo en la desaparición del contaminante. No obstante, la fertilización puede estimular la rápida desaparición del combustóleo. En nuestro entendimiento, este estudio es uno de los primeros reportes de fitorremediación utilizando Pocc.

CONCLUSIONES

Phaseolus coccineus tiene potencial de uso en la fitorremediación de suelos contaminados con combustóleo; además, la fertilización orgánica e inorgánica contribuyó en la reducción de los hidrocarburos del combustóleo en la rizósfera de Pocc. El efecto negativo del combustóleo en el crecimiento de Pocc fue compensado con la FInor y la FOrg, mientras que la población microbiana de la rizósfera contaminada fue parcialmente estimulada por la planta o por la fertilización.

AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por proyecto SEMARNAT-CONACYT 2002-CO1-0023.

LITERATURA CITADA

Adam G., and H. Duncan. 2003. The effect of diesel fuel on common vetch (*Vicia sativa* L.) plants. *Environ. Geochem. Health* 25: 123-130.

(Adam and Duncan, 2003). In our study, the BFN population was stimulated mainly by the rhizosphere. But root nodules of *Rhizobium* were not detected in SC nor in SNC, indicating that the rhizobia compatible with Pocc are limited in the sampled soil.

Degradation of fuel oil in the rhizosphere was stimulated with FOrg or FInor (Figure 3C-D). The benefit of fertilization in SC is related to stimulation of plant and rhizospheric microorganism growth, contributing to degradation of the pollutant (Anderson *et al.*, 1993; Ferrera-Cerrato and Alarcon, 2004; Pilon-Smits, 2005). The presence of Pocc alone had no influence on fuel oil degradation (Figure 3A-B), by comparison with the effect of the fertilizer treatments (Figure 3C-D). This underlines the importance of applying fertilizers in plants such as Pocc, whose capacity to tolerate hydrocarbon pollution has been reported (Sangabriel *et al.*, 2006), to facilitate degradation of contaminants compounds in their rhizosphere, as was shown in our study.

Fuel oil is composed of a complex mixture of hydrocarbons: parafins (n-alkanes, ramified alkanes, cyclo-alkanes), monoaromatic alquil (toluene, ethylbenzene), polyaromatics (PAH, phenanthrene, pyrene, naphthalene, etc.), and N and sulfur compounds (Yender *et al.*, 2002). PAH are quite insoluble, hard to degrade, and therefore, persistent in the environment; they have an affinity for fatty tissues, which favors its bioaccumulation and permanence for many years (Neff *et al.*, 2000).

With GC-MS, organic compounds derived from fuel oil in SC have been identified, notably: monoaromatic hydrocarbons (3,4-dimethyltiophene) and polyaromatics (naphthalene and its derivatives), described by Sangabriel *et al.* (2006).

In our study biodegradation of fuel oil was stimulated by FOrg and FInor, contributing to reducing the proportion of aromatic hydrocarbons in the polluted soil. The proportion of the hydrocarbons 3,4-dimethyltiophene, 1,2-dihidro-1-fenilnaphthalene, 1-fenilnaphthalene, and 2-metil-2-fenil-1H-indol, first reported in the same SC (Sangabriel *et al.*, 2006), decreased after applying the fertilizer treatment.

Not all hydrocarbons are degraded at the same rate; the biodegradation rate decreases with the molecular weight and complexity of the hydrocarbons and is inversely proportional to the number of rings and substitutions. The most volatile are monoaromatic hydrocarbons, and their decrease is notable in the natural degradation process to the point of disappearing (Wang and Fingas, 1994).

Pocc is cultivated in the area where the accidental spill occurred and can thus contribute to eliminating the pollutant over the long term. Nevertheless,

- Anderson T. A., E. A. Guthrie, and B. T. Walton. 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environmental Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
- Anderson T. A., D. P. Shupack, and H. Awata. 2002. Biotic and abiotic interactions in the rhizosphere: organic pollutants. *In: Huang, P. M., J-M. Bollag, and N. Senesi (eds). Interactions between Soil Particles and Microorganisms, Impact on the Terrestrial Ecosystem. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems. Vol. 8. John Wiley & Sons. New York. pp: 438-455.*
- Atlas R. M. 1995. Bioremediation of petroleum pollutants. *Intern. Biodeter. Biodegr.* 1: 317-327.
- Baker J. M. 1970. The effect of oils on plants. *Environ. Pollut.* 1: 27-44.
- Cunningham S. D., T. A. Anderson, P. A. Schwab, and F. C. Hsu 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.
- Ferrera-Cerrato R., y A. Alarcón. 2004. Papel de los microorganismos rizosféricos en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *In: Tundo, P., y R. Hoyos de Rossi (eds). Química Verde en Latinoamérica. IUAPAC-INCA. Argentina. pp: 89-109.*
- Ferro, A. M., R. C. Sims, and B. Bugbee. 1994. Hycrest crested wheatgrass accelerates the degradation of pentachlorophenol in soil. *J. Environ. Qual.* 23: 272-281.
- Hewitt E. J. 1966. Sand and water culture methods used in the study of plant nutrition. *Tech. Commun.* 22. Commonwealth Agricultural Bureau. Farnham, United Kingdom. pp: 187-246.
- Hutchinson S. L., M. K. Banks, and A. P. Schwab. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
- Ingraham J. L., y C. A. Ingraham. 1998. *Introducción a la Microbiología.* Editorial Reverte. Barcelona. 328 p.
- Kim S. J., D. H. Choi, D. S. Sim, and T. S. Oh. 2005. Evaluation of bioremediation effectiveness on crude oil-contaminated sand. *Chemosphere* 59:845-852.
- Kirk J.L., J.N. Klironomos, H. Lee, and J.T. Trevors. 2002. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Bioremed. J.* 6:57-63.
- Louchouart P., J. S. Bonner, P. Tissot, T. J. McDonald, C. Fuller, and C. Page 2000. Quantitative determination of oil films/slicks from water surfaces using a modified solid phase extraction (SPE) sampling method. *Proc. of the 23rd Arctic Marine Oil Spill Program Meeting, Vancouver, Canada. Vol. 1: 59-68.*
- Merkel N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 165: 195-209.
- Neff, J.M., S. Ostazeski, W. Gardiner, and I. Stejskal. 2000 Effects of weathering on the toxicity of three offshore Australian crude oils and a diesel fuel to marine animals. *Environ. Toxicol. Chem.* 19:1809-1821.
- Paetz A., and B-M. Wilke. 2005. Soil sampling and storage. *In: Margesin, R., and F. Schinner (eds). Manual of Soil Analysis - Monitoring and Assessing Soil Bioremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp: 1-45.*
- Philip C. V., J. A. Bullin, and R. G. Anthony. 1984. GPC characterization for assessing compatibility problems with heavy fuel oils. *Fuel Process. Technol.* 9: 189-201.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant. Biol.* 56: 15-39.
- PROFEPA. 2003. Reporte de emergencias ambientales en México 2002. Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA). México. <http://www.profepa.gob.mx/profepa>. Consultada en septiembre, 2003.
- Quiñones-Aguilar E. E., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez, and A. Alarcón. 2003. Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia* 37: 585-594.
- Reilley K. A., K. M. Banks, and A. P. Schwab. 1996. Organic chemicals in the environment: dissipation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere. *J. Environ. Qual.* 25: 212-219.
- Robson D. B., J. D. Knight, R. E. Farrell, and J. J. Germida. 2003. Ability of cold-tolerant plants to grow in hydrocarbon-contaminated soil. *Int. J. Phytorem.* 5: 105-123.
- Sangabriel W., R. Ferrera-Cerrato, D. Trejo-Aguilar, M. R. Mendoza-López, J. S. Cruz-Sánchez, C. López-Ortiz, J. Delgadillo-Martínez, y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22: 63-73.
- SAS Institute Inc. 2002. The SAS system for windows, ver. 9.0. SAS Institute Inc, Cary, North Carolina. USA.
- Schwab A. P., and K. M. Banks. 1994. Biologically mediated dissipation of polyaromatic hydrocarbons in the root zone. *In: Anderson, T., and J. Coats (eds). Bioremediation through Rhizosphere Technology. American Chemical Society Symposium Series. pp: 132-141.*
- Schwab A. P., J. Su, S. Wetzel, S. Pekarek, and K. M. Banks 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environ. Sci. Technol.* 33: 1940-1945.
- Siciliano S. D., and J. J. Germida. 1998. Mechanisms of phytoremediation: biochemical and ecological interactions between plants and bacteria. *Environ. Rev.* 6: 65-79.
- USEPA (United States Environment Protection Agency). 1986. Organic analytes. *In: Test Methods for Evaluating Solid Wastes. 3rd ed. Document SW-846, Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response, Washington D. C. pp: 1-16.*
- Van Hamme J. D., A. Singh, and O. P. Ward. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.* 67: 503-549.
- Wang, Z., and M. Fingas 1994. Study of the Effects of weathering on the chemical composition of a light crude oil. *Proceedings of the Seventeenth Arctic and Marine Oil Spill Program Technical Seminar, Vancouver, British Columbia, Canada pp: 133-171.*
- Wiltse C. C., W. L. Rooney, Z. Chen, A. P. Schwab, and K. M. Banks. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude

CONCLUSIONS

Phaseolus coccineus has the potential to be used in phytoremediation of soils polluted with fuel oil. Organic and inorganic fertilization contributed to the reduction of the hydrocarbons in the rhizosphere of Pccc. The negative effect of the fuel oil in Pccc growth was compensated with FInor and FOrg, while the microbial population in the polluted rhizosphere was partially stimulated by the plant or by the fertilizers.

—End of the English version—



- oil-phytoremediation potential among alfalfa genotypes. *J. Environ. Qual.* 27: 169-173.
- Yateem A., M. T. Balba, A. S. El-Nawawy, and N. Al-Awadhi. 1999. Experiments in phytoremediation of Gulf War contaminated soil. *Soil Groundwater Cleanup* 2/3: 31-33.
- Yender, R., J. Michel, and C. Lord. 2002. Managing seafood safety after an oil spill. Seattle: Hazardous materials response division, office of response and restoration, NOAA. 72 p.