



IMPACTO DEL PETRÓLEO CRUDO EN SUELO SOBRE LA MICROBIOTA DE VIDA LIBRE FIJADORA DE NITRÓGENO

[IMPACT OF CRUDE OIL IN SOIL ON THE NITROGEN-FIXING FREE-LIVING MICROBIOTA]

Mayra Vázquez-Luna, Araceli Montiel-Flores^{1*}, Dinorah Vázquez-Luna² y Mario F. Herrera-Tenorio¹

¹Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias, Región Orizaba-Córdoba. Peñuela-Amatlán s/n, Mpio. Amatlán de los Reyes, CP 94945. Veracruz, México. *chelim3@hotmail.com, mariofht3@hotmail.com*

²Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Km 36.5 Carr. México-Texcoco. Montecillo, Mpio. Texcoco, CP 56230. Edo. de México, México.

*Autor para correspondencia: *amontiel@uv.mx*

RESUMEN

Los derrames de petróleo afectan las propiedades físicas del suelo y especialmente las poblaciones naturales de microorganismos. En particular causan disminución en bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, encargadas de asimilar y reciclar nutrientes en los ciclos biogeoquímicos; al alterarse éstos, se afecta la fertilidad del suelo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el impacto del petróleo crudo sobre bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en un suelo bajo condiciones controladas. Se experimentó en suelo contaminado con cinco concentraciones de petróleo (1200, 3500, 10,000, 20,000 y 40,000 mg kg⁻¹ en peso seco) en un diseño completamente al azar. Se midieron las poblaciones bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en cada concentración. El índice del impacto microbiano de las bacterias mostró que al final de la prueba (219 h), en cada una de las cinco concentraciones de petróleo hubo un incremento exponencial de colonias bacterianas altamente significativo ($P \leq 0.01$), 2 a 3.5 veces más abundantes que en el testigo. Se infiere un fenómeno de recolonización y adaptación al medio. A nivel macroscópico, en los tratamientos con mayor concentración de petróleo hubo menor diversidad de colonias, pero las poblaciones fueron significativamente mayores. También, en los tratamientos de mayor concentración del hidrocarburo, se observaron colonias bacterianas no presentes en el tratamiento testigo. Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre podrían adaptarse a condiciones adversas. La selección de las más aptas sería útil en la biorremediación o saneamiento de zonas impactadas por petróleo crudo.

Palabras clave: Degradación de petróleo; unidades formadoras de colonias; contaminación; restauración; cepas bacterianas.

SUMMARY

Petroleum oil spills affect the physical properties of the soil and overall the natural populations of microorganisms. They cause a particular decrease in nitrogen-fixing free-living bacteria, responsible to absorb and recycle nutrients in biogeochemical cycles; by altering these, soil fertility can be affected. The aim of this study was to evaluate the impact of crude oil on nitrogen-fixing free-living bacteria in soil under controlled conditions. Experiments were performed in soil, contaminated with five petroleum oil concentrations (1200, 3500, 10,000, 20,000 and 40,000 mg kg⁻¹ on dry weight) in a completely randomized design. Nitrogen-fixing free-living bacteria populations were measured on each concentration. The index of microbial impact of bacteria showed that at the end of the test (219 h), there was a highly significant ($P \leq 0.01$) exponential increase of bacterial colonies in all five oil concentrations, 2 to 3.5 times more abundant than the control. A self-resettling and adjustment to the environment phenomenon was inferred. Macroscopically, there was lower diversity of colonies, but significantly higher populations on treatments with higher oil concentration. Also, bacterial colonies were observed on treatments with major concentration of the hydrocarbon, but these were not present on the control. Nitrogen-fixing free-living bacteria seem to adapt to adverse conditions. Selection of the most suitable might be useful in bioremediation or reparation of impacted areas by crude oil.

Key words: Petroleum oil degradation; colony-forming units; pollution; restoration; bacterial strains.

INTRODUCCIÓN

La economía mexicana ha dependido en gran medida de la industria del petróleo. A pesar de la generación de residuos por esta industria, de los derrames accidentales y el consecuente impacto sobre el ambiente, hasta la década de 1970 no se aplicaban criterios ambientales en la ejecución de las actividades petroleras. No se conoce con exactitud la magnitud del daño que la industria del petróleo ha causado al ambiente a lo largo de su existencia. Para entender el impacto de los contaminantes del petróleo sobre los suelos es necesario conocer la relación que existe entre la cantidad, composición y grado de afectación sobre los organismos vivos (Al-Mutairi *et al.*, 2008). Los derrames de petróleo ocasionan efectos importantes sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Elías-Murguía y Martínez, 1991; Martínez y López, 2001), cambios que a su vez ejercen un efecto directo sobre las poblaciones de microorganismos existentes en el mismo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). El impacto puede ser mayor al alterar el equilibrio de las condiciones ecológicas originales. Lo anterior provoca la disminución de poblaciones microbianas importantes para la asimilación y reciclado de nutrientes dentro de los ciclos biogeoquímicos, como es el caso de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Vázquez-Luna *et al.*, 2010). El nitrógeno es uno de los principales nutrimentos para los organismos vivos y en su ausencia limita la producción de alimentos. La mayoría de las transformaciones del nitrógeno en el suelo ocurren a través de microorganismos, cuyos mecanismos dependen de la influencia de factores abióticos, como la concentración de oxígeno, de nitrógeno inorgánico y el pH (Rosswall, 1982).

Dado que los derrames de petróleo pueden ocasionar efectos secundarios en los ciclos biogeoquímicos al afectar su fertilidad y su posterior restauración, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el impacto del petróleo crudo sobre las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, en un suelo bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas y Agropecuarias de Córdoba, Universidad Veracruzana. El estudio se llevó a cabo en cuatro etapas.

Trabajo de campo

Comprendió la selección del sitio de muestreo localizado en el municipio de La Perla, Veracruz (18° 56' LN, 97° 08' LO). Se tomaron muestras

superficiales de suelo (0 a 30 cm), que fueron secadas a la sombra y llevadas al laboratorio para su análisis.

Análisis de suelo

Se determinaron las características físicas y químicas del suelo, según métodos analíticos de la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). La textura se obtuvo por el método del hidrómetro de Bouyoucos. El pH fue determinado por potenciometría a una mezcla suelo:solución 1:2. En esa misma solución, después de 24 h, se midió la conductividad eléctrica (C.E). La materia orgánica se determinó por el método de Walkley-Black. Para el nitrógeno total se utilizó el método de Kjeldahl. El fósforo asimilable se obtuvo por el método de Bray para $\text{pH} \leq 7.2$. Las bases intercambiables se midieron por lixiviación con acetato de amonio 1N $\text{pH} 7.0$. Los elementos Ca, Mg, Na y K se determinaron a través de absorción atómica. La capacidad de intercambio catiónica (CIC) se midió con el método de NH_4OAC $\text{pH} 7.0$ y NaOAC $\text{pH} 8.2$ (Aguilar-Noh, 1987), y el sodio mediante absorción atómica. Los microelementos extractables fueron establecidos por el método del DTPA, y los elementos Fe, Cu, Zn, y Mn por absorción atómica. El boro se extrajo por el método de reflujo con agua caliente y se determinó mediante UV-VIS con curcomina.

Análisis microbiológico

Se establecieron los ensayos con suelos contaminados con petróleo y se midieron las poblaciones de bacterias de la siguiente manera:

a) Se evaluaron cinco concentraciones del hidrocarburo respecto a un testigo sin petróleo, mediante un diseño experimental completamente al azar (DCA) con tres repeticiones. Se tuvieron 18 unidades experimentales en total. Los tratamientos se muestran en la Tabla 1.

b) Preparación de suelo. Los ensayos se realizaron de acuerdo con el procedimiento del Protocolo No. 208 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OECD, 1984) modificado para bacterias. El suelo se secó bajo sombra durante ocho días, hasta alcanzar aproximadamente 15 % de humedad. El suelo seco se molió con un mortero y se tamizó con malla de 0.5 cm de abertura. Se pesaron 250 g de suelo por unidad experimental y se colocaron en materiales esterilizados de vidrio (longitud 10 cm, ancho 10 cm y profundidad 10 cm). El petróleo se pesó según la concentración a evaluar (Tabla 1); se utilizó el método peso sobre peso, para adicionar y mezclar el petróleo en el suelo. Se efectuó el riego con agua destilada estéril, hasta alcanzar 30 % de humedad.

Tabla 1. Tratamientos en suelo con diferentes concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

| Tratamientos | Descripción | Peso de HTP (g)** | Concentración de HTP (mg kg ⁻¹ , peso seco) | |
|--------------|-------------|-------------------|--|--------|
| Testigo | Suelo | + | - | 0 |
| 1 | Suelo | + | 10 | 1,200 |
| 2 | Suelo | + | 10 | 3,500 |
| 3 | Suelo | + | 10 | 10,000 |
| 4 | Suelo | + | 10 | 20,000 |
| 5 | Suelo | + | 10 | 40,000 |

* Testigo (sin HTP); **Cantidad de petróleo adicionada por contenedor.

c) Variables microbiológicas en suelo. Para estimar las poblaciones de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre en suelo contaminado con petróleo crudo, se utilizó el método de conteo viable de células vivas por siembra en superficie (Madigan *et al.*, 1998) por dilución seriada. Se prepararon diluciones decimales seriadas con 10 g de suelo en 90 mL de agua estéril, hasta 1 en 10⁵. Se utilizó un medio de cultivo con carbón combinado para bacterias de vida libre fijadoras de N₂ (Rennie, 1981), un medio específico para *Azotobacter* sp., y agar nutritivo para bacterias totales. El material de vidrio se esterilizó durante 5 h con calor seco a 180 °C en estufa. Los medios de cultivo se esterizaron con calor húmedo a 121 °C, en olla de vapor a 1.3 kg cm⁻³ durante 18 min (Ingraham e Ingraham, 1998).

d) Caracterización macro y microscópica de bacterias. Las bacterias se caracterizaron por los rasgos morfológicos externos de las colonias, como forma, color, elevación, bordes, movilidad, textura, tinción de Gram y forma microscópica.

Análisis de resultados

a) Se efectuó un análisis de varianza para cada una de las variables evaluadas, de acuerdo al modelo lineal del diseño completamente al azar propuesto. La comparación de medias se realizó de acuerdo a la prueba de Tukey ($P \leq 0.01$). Los datos se procesaron mediante "PROC GLM" y la declaración "MEANS" de SAS (Statistical Analysis System) versión 1999. b) El índice del impacto microbiano se obtuvo de restar una unidad al índice de tolerancia (Porta *et al.*, 1999), que permite evaluar la respuesta biológica en un suelo contaminado.

$$IIMF = \frac{\sum_{i=1}^n IIMx}{n} \quad IIMx = 1 - \frac{Tp}{\bar{X}Tt} \quad i = 1, 2, \dots, t$$

Donde:

IIMx: Índice de impacto microbiano para la variable *i*-ésima.

IIMF: Índice de impacto microbiano de fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Tp: Tratamiento con petróleo (UFC g⁻¹ suelo seco).

T: Tratamiento testigo (UFC g⁻¹ suelo seco).

n: número de variables (número de colonias encontradas).

Los resultados se interpretaron de la siguiente forma:

Si el *IIMx* = 0, el petróleo no afectó la variable en ningún sentido.

Si el *IIMx* < 0, el petróleo estimula la expresión de la variable.

Si el *IIMx* > 0, el petróleo indujo un efecto negativo sobre la variable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características físicas y químicas del suelo

Los resultados que se muestran en la Tabla 2 se interpretaron con los rangos de la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). El análisis sólo comprendió la primera capa de suelo (0 a 30 cm), debido a que los suelos sin petróleo tienen mayores poblaciones de bacterias en los horizontes superficiales y disminuyen con la profundidad (Rivera-Cruz *et al.*, 2006). Los horizontes superiores presentan altos contenidos de oxígeno y de raíces, lo que favorece la presencia de mayores poblaciones de microorganismos (Campbell y Claridge, 1987). Además, por el tamaño de las partículas del suelo, los microorganismos proliferan más en presencia de humus que en granos de arena.

Poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFNVL) en un suelo contaminado con petróleo crudo

La Figura 1 muestra las poblaciones resultantes de la observación y conteo cada 48 h durante 219 h, de las colonias de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFNVL), en medio de cultivo de carbón

combinado y con tratamientos de distintas concentraciones de petróleo crudo. El testigo y la concentración de 1200 mg kg⁻¹ de petróleo no fueron significativamente diferentes ($P \leq 0.01$). Lo mismo ocurrió con las concentraciones de 3500 y 10,000 mg

kg⁻¹, sólo que en ellos hubo un incremento de 350 % de UFC g⁻¹ de suelo seco. Los tratamientos con 40,000 y 20,000 mg kg⁻¹ mostraron incrementos significativamente mayores ($P \leq 0.01$) que el testigo, en alrededor de 200 % de UFC.

Tabla 2. Análisis de las características físicas y químicas del suelo utilizado en la evaluación del impacto del petróleo crudo sobre microbiota bacteriana.

| Propiedades químicas del suelo (0 a 30 cm) | | | | | Textura | | | | |
|--|--------------------|-------|---------------------------|-------|--------------|-------|---------|----------------|----------------|
| pH | CE | MO | CCB | CIC | arena | limo | arcilla | Clase textural | |
| H ₂ O | Sd.m ⁻¹ | (%) | (Cmol. kg ⁻¹) | | % fracciones | | | | |
| 5.54 | - 5.09 | 0.070 | 13.67 | 14.98 | 19.76 | 70.00 | 24.00 | 6.00 | Franco arenoso |

pH relación 1:2 (potenciometría); CE: conductividad eléctrica (potenciometría); MO: materia orgánica (Método de Walkley y Black); CCB: Bases cambiables (método de lixiviación con acetato de amonio); CIC (método de NH₄O AC pH 7.0 y NaO AC pH 8.2); Textura (Bouyoucos).

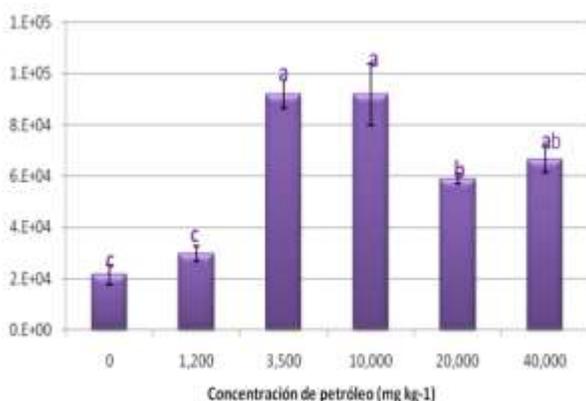


Figura 1. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

Esto coincide con Freedman (1989), quien menciona que algunos microorganismos incrementan su población en presencia de hidrocarburos. Sin embargo, los hidrocarburos modifican las características físicas y químicas del suelo (Nava y Tirado, 1980; Li *et al.*, 1997; Riser-Roberts, 1998), ya que ocasionan el bloqueo del intercambio de gases del suelo con la atmósfera (Hersman y Flein, 1979; Segal y Mancinelli, 1987), con la afectación de las poblaciones microbianas del suelo. Gobat *et al.* (2004) mencionan que las poblaciones de BFNVL llegan a ser abundantes

en el horizonte superficial del perfil agrológico, ya que en esa profundidad se localiza la mayor cantidad de oxígeno, debido a que lo requieren para fijar el nitrógeno (Silva, 2007). Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre encontradas a diferentes concentraciones de petróleo crudo, se consideran cepas especializadas y degradadoras de petróleo, con capacidad de multiplicarse en suelos con concentraciones altas de petróleo (Atlas *et al.*, 1991). Estas bacterias han desarrollado un alto potencial genético al usar el petróleo como fuente de carbono y energía en los procesos metabólicos que llevan a cabo, como para ser utilizadas en la degradación de hidrocarburos.

Índice de impacto microbiano

El análisis de varianza mostró diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) entre la concentración de 1200 mg kg⁻¹ de petróleo crudo y el testigo (Figura 2). El índice del impacto microbiano de las poblaciones de BFNVL mostró que en cada una de las cinco concentraciones de petróleo hubo un decremento de las poblaciones bacterianas desde el inicio de la contaminación hasta las 72 h. Sin embargo, a partir de las 144 h empezó un incremento exponencial, altamente significativo de las mismas ($P \leq 0.01$), 200 % mayor que el testigo al final de la prueba (219 h). Lo anterior permite inferir que se presenta un fenómeno de recolonización y adaptación al medio.

La Figura 3 muestra el efecto del petróleo con respecto a la concentración de 3500 mg kg⁻¹ de petróleo crudo sobre las BFNVL, las cuales disminuyen en 50 % a las 72 h. Sin embargo, muestran un crecimiento estable durante el transcurso de las 48 h siguientes. El tratamiento con petróleo fue 3.5 veces mayor al testigo, 219 h posteriores a la exposición al contaminante, comportamiento similar al descrito en la Figura 2. En ambos casos (Figura 2 y 3), el decremento inicial en las poblaciones bacterianas fue resultado de la modificación de algunas características del suelo causadas por la contaminación por hidrocarburos, como la densidad aparente y la proporción del tamaño de la partícula del suelo; ello ocasionó a su vez menor aireación (Nava y Tirado, 1980 y Li *et al.*, 1997) y el cambio en la microflora existente del suelo. El análisis de varianza mostró diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre el tratamiento de 10,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo y el testigo.

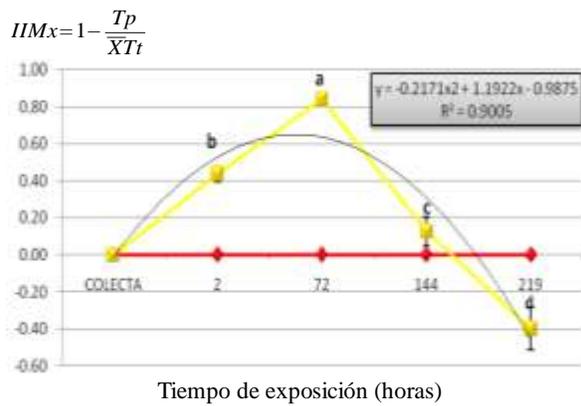


Figura 2. Índice de impacto microbiano de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre con 1200 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, respecto al testigo \blacklozenge . Pares de valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

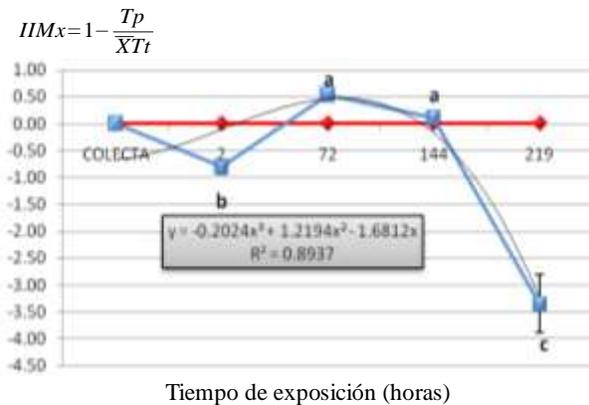


Figura 3. Índice de impacto microbiano de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre con 3500 mg kg⁻¹ de petróleo crudo con respecto al tratamiento testigo \blacklozenge . Diferentes literales indican diferencia estadística (Tukey, $P \leq 0.01$).

La Figura 4 muestra un comportamiento similar que la anterior concentración (Figura 3), con 50 % más de población de BFNVL a las 72 h. A partir de las 219 h de exposición al petróleo crudo, se observó un crecimiento exponencial, 3.5 veces mayor al testigo.

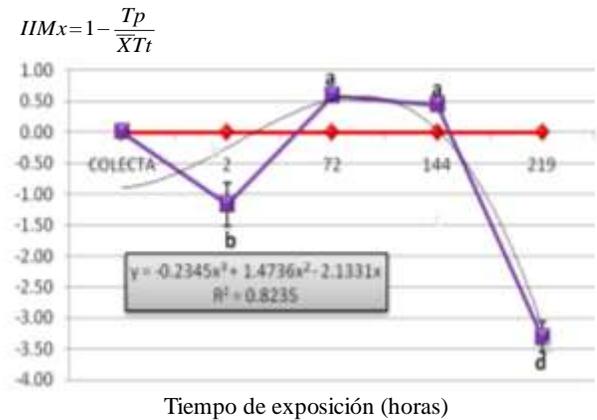


Figura 4. Índice de impacto microbiano de las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre con 10,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo con respecto al tratamiento testigo \blacklozenge . Pares de valores con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

Este incremento coincide con observaciones realizadas por Vázquez-Luna *et al.* (2010), quienes encontraron que las poblaciones de BFNVL se incrementaron 1.3 veces más en suelo con 10,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo a los 210 h de exposición al contaminante. El análisis de la varianza mostró diferencias significativas ($P \leq 0.01$) entre la presencia de 20,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo y el testigo.

En la Figura 5 se observa un decremento de petróleo en el suelo a partir de las 2 h de su contaminación. A las 72 h se presenta una estabilidad lineal, significativamente similar al testigo ($P \leq 0.01$). A partir de las 144 h el incremento fue exponencial, tendencia mantenida hasta las 219 h de evaluación.

El índice de impacto microbiano mostrado en la Figura 6, muestra la disminución de las poblaciones de BFNVL en el tratamiento cinco (40,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo) a partir de las 2 h de exposición al contaminante. Aunque en la gráfica se observa una leve disminución, no hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$). Pero a partir de las 144 h se evidenció un incremento de la población bacteriana, el cual fue dos veces mayor al testigo al final de la prueba.

Este comportamiento de disminución e incremento de las poblaciones microbianas, concuerda con lo expresado por diversos investigadores (Frois-Duarte *et al.*, 2001) que mencionan que las comunidades

microbianas tienden a responder ante la presencia del petróleo, cambiando su estructura a una que favorezca a los organismos capaces de sobrevivir a las nuevas condiciones a expensas de otros organismos que son reprimidos. Sin embargo, los efectos provocados por exposiciones agudas pueden ocasionar problemas en el ecosistema (Botello *et al.*, 1996), ya que ocasionan un desequilibrio en el mismo (Weber, 1981; Patin, 1982).

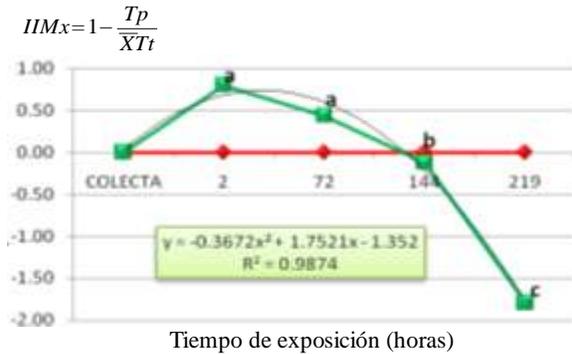


Figura 5. Índice de impacto microbiano de las BFNVL con 20,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo con respecto al tratamiento testigo. Las columnas con misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P ≤ 0.01).

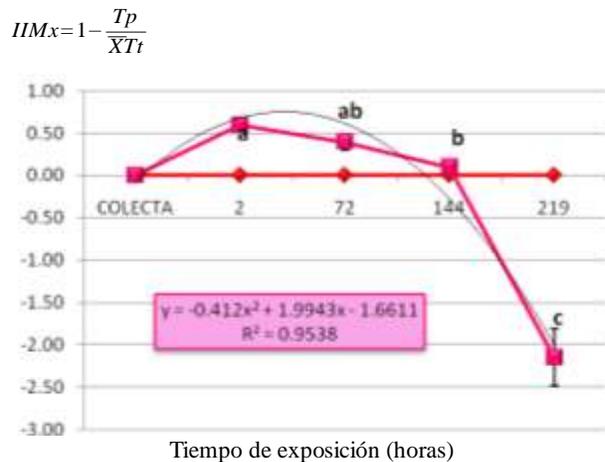


Figura 6. Índice de impacto microbiano de las BFNVL con 40,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo con respecto al tratamiento testigo. Las columnas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey, P ≤ 0.01).

Descripción macro y microscópica de las colonias de las bacterias totales sobrevivientes a las 219 horas de exposición al petróleo

a) Descripción y clasificación de las colonias de bacterias. En las Tablas 3a y 3b se muestran las características de las colonias bacteriales que sobrevivieron a las 219 h de contaminación por

petróleo. En general, las bacterias mostraron una forma colonial diversa (tipo rizoide, circular y amiboidea). De manera similar, su borde fue lobulado, ondulado, o entero. Se presentaron variaciones en la elevación: elevada, convexa, realzada con borde biselado cóncavo, papilar y plano. La textura no fue muy variada (viscosa, opaca lisa y opaca tosca). La coloración se presentó entre beige, beige oscuro y transparente; finalmente, el tipo de formación fue translúcida, opaca lisa, opaca tosca y transparente.

Respecto a la diversidad bacteriana encontrada, el estudio microscópico indicó formas redondas (cocos aislados, cocos a pares) y bacilares (bacilos, bacilos con bordes redondeados y cocobacilos). Se diferenciaron sólo nueve colonias en el medio de cultivo, la mayoría Gram negativa. Esto coincide con Cárdenas *et al.* (2005), quienes mencionan que las bacterias Gram negativas dominan el medio, en el caso de ambientes contaminados con hidrocarburos y metales, debido a que son más resistentes que las Gram positivas. El conocimiento derivado de los biomarcadores se limita al estado nutricional o fisiológico de la comunidad bacteriana más que a su diversidad. Esto concuerda con Rivera-Cruz *et al.* (2006), quienes localizaron en la primera capa de suelo una mayor cantidad de bacterias Gram negativas.

b) Efecto del petróleo sobre las poblaciones de Bacterias Totales de acuerdo a sus características microscópicas. De acuerdo con los análisis de varianza de las poblaciones microbianas agrupadas según sus características microscópicas, se encontraron diferencias significativas (P ≤ 0.01) entre tratamientos (Figuras 7 y 8).

Las poblaciones de bacterias de tipo cocos aislados no fueron afectadas en concentraciones menores a 20,000 mg kg⁻¹ de petróleo, y fueron significativamente similares (P ≤ 0.01) respecto al testigo. Sin embargo, esas poblaciones se vieron favorecidas con 40,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo. Las poblaciones de bacterias de tipo cocos distribuidos en pares, se favorecieron en concentraciones de 3500 y 20,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo; sin embargo a concentraciones mayores no estuvieron presentes. En el caso de las bacterias tipo cocobacilos, sólo estuvieron presentes en concentraciones de 10,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo.

Los cocos en racimos en la concentración de 3500 mg kg⁻¹ fueron significativamente similares (P ≤ 0.01 al testigo). En la concentración de 1200 mg kg⁻¹ se observó un incremento (P ≤ 0.01), que fue aún mayor a partir de 10,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo.

Los bacilos con bordes redondeados en los tratamientos con 3500 y 10,000 mg kg⁻¹ no presentaron diferencias significativas (P ≤ 0.01),

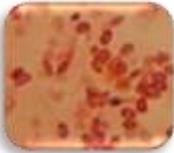
mientras que en 20,000 mg kg⁻¹ se presentó un mayor crecimiento. Con 40,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo

empezaron a tener un decrecimiento que no se presentó en el testigo.

Tabla 3a. Descripción y clasificación de las colonias de bacterias totales (BT) encontradas en medio de cultivo agar.

| | | Descripción de la colonia | | Descripción microscópica (100x) | | |
|-------------------------|---|---|---|--|---|-----------------------------------|
| COCOS AISLADOS | | | | | | |
| BT1 |  | Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Color: Tipo de formación: | 1-14 mm Rizoide Lobulado Papilar Viscosa Beige Opaca tosca |  | Forma: Reacción Gram: Morfología: | Bacilo (-) Cocos aislados |
| BT2 |  | Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Color: Tipo de formación: | 1 – 6 mm Circular Ondulada Realzada, con borde bicelado cóncavo Viscosa Beige oscuro Opaca lisa |  | Forma: Reacción Gram: Morfología: | Bacilo (+) Cocos aislados |
| BT3 |  | Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Color: Tipo de formación: | 1 -7 mm Circular Ondulado Plano Viscosa Beige Translúcido |  | Forma: Reacción Gram: Morfología: | Bacilo (-) Cocos aislados |
| COCOS EN RACIMOS | | | | | | |
| BT4 |  | Tamaño: Forma: Borde: Elevación: Textura: Color: Tipo de formación: | > 1 mm Puntiforme Entero Convexa Viscosa Transparente Transparente |  | Forma: Reacción Gram: Morfología: | Bacilo (-) Cocos en racimos |

Tabla 3b. Descripción y clasificación de las colonias de bacterias totales (BT) encontradas en medio de cultivo agar nutritivo.

| Descripción de la colonia | | Descripción microscópica (100x) | | |
|---------------------------------------|---|---|--|--|
| COCOS A PARES | | | | |
| BT5 | Tamaño: 40 – 3 mm Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Plano Textura: Viscosa Color: Beige Tipo de formación: Opaca tosca |  |  | Forma: Bacilos Reacción Gram: (+) Morfología: Cocos a pares |
| BT6 | Tamaño: 7 – 5 mm Forma: Ameboide Borde: Entero Elevación: Elevada Textura: Viscosa Color: Beige Tipo de formación: Translúcido |  |  | Forma: Bacilos Reacción Gram: (-) Morfología: Cocos a pares |
| COCOBACILOS | | | | |
| BT7 | Tamaño: 14 - 2 mm Forma: Circular Borde: Ondulado Elevación: Realzada con borde bicelado cóncavo Textura: Viscosa Color: Beige oscuro Tipo de formación: Opaca lisa |  |  | Forma: Bacilo Reacción Gram: (-) Morfología: Cocobacilos |
| BACILOS CON BORDES REDONDEADOS | | | | |
| BT8 | Tamaño: 2 – 1 mm Forma: Circular Borde: Entero Elevación: Convexa Textura: Viscosa Color: Transparente Tipo de formación: Transparente |  |  | Forma: Bacilos Reacción Gram: (+) Morfología: Bacilos con bordes redondeados |
| BT9 | Tamaño: 6 – 1 mm Forma: Ameboide Borde: Lobulado Elevación: Elevada Textura: Viscosa Color: Beige Tipo de formación: Translúcido |  |  | Forma: Bacilos Reacción Gram: (-) Morfología: Bacilos con bordes redondeados |

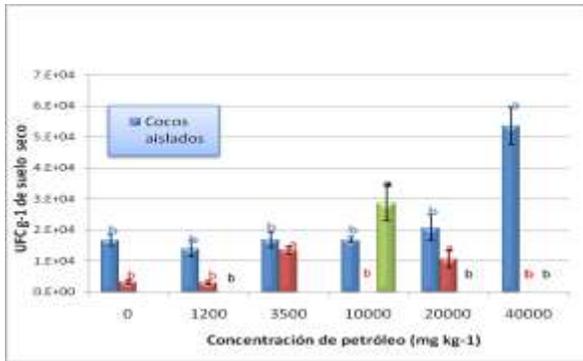


Figura 7. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de bacterias totales de acuerdo a sus características microscópicas. Las columnas con misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

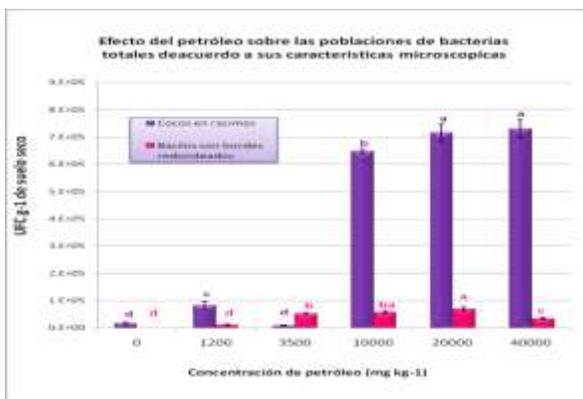


Figura 8. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de bacterias totales de acuerdo a sus características microscópicas. Las columnas con misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

Poblaciones de bacterias totales

La Tabla 4 muestra las poblaciones de bacterias totales, según su clasificación en el orden y abundancia en que fueron encontradas. Se estimaron las unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC g^{-1}) en cada uno de los tratamientos; los resultados mostraron diferencias significativas ($P \leq 0.01$) ocasionado por las diversas concentraciones del hidrocarburo. La Tabla 4 muestra que ciertas colonias de bacterias no estuvieron presentes en el testigo, sólo en tratamientos con las concentraciones más altas de

petróleo. Los T1 y T2 no expresaron diferencias significativas ($P > 0.01$), pero a partir de las concentraciones más altas presentes en T3, T4 y T5 se observó un incremento estadísticamente igual.

Al respecto, Vargas *et al.* (2004) mencionan que los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos, pero su diversidad microbiana es más reducida en comparación con los suelos no contaminados; lo que explica el aumento en las concentraciones de 10,000, 20,000 y 40,000 $mg\ kg^{-1}$ de petróleo crudo. Estos datos concuerdan con los obtenidos por Rivera-Cruz, *et al.* (2004), que obtuvieron un incremento altamente significativo en las poblaciones de bacterias totales de petróleo crudo. La BT-1 mostró una disminución directamente proporcional al incremento de la concentración del petróleo, ya que con 40,000 $mg\ kg^{-1}$ de petróleo no se encontró dicha colonia. A diferencia de BT-2, que se vio favorecida por dicha concentración. En el caso de BT-3 no se encontraron diferencias significativas ($P > 0.01$) entre el testigo y los tratamiento hasta 10,000 $mg\ kg^{-1}$ de petróleo; sin embargo, al igual que BT-4 se observó el incremento de la población microbiana a partir de 20,000 $mg\ kg^{-1}$ de petróleo crudo. De igual forma la BT-5 se incrementó con esa concentración; aunque con 40,000 $mg\ kg^{-1}$ de petróleo crudo se inhibió el crecimiento. Las colonias denominadas BT-6, BT-7, BT-8 y BT-9 no aparecieron en el testigo; estuvieron sólo en presencia del contaminante. Las concentraciones de 3500 $mg\ kg^{-1}$ y 40,000 $mg\ kg^{-1}$ favorecieron a BT-6 y BT-9 respectivamente; mientras que BT-7 y BT-8 aumentaron con 10,000 $mg\ kg^{-1}$. Esto coincide con Vargas *et al.* (2004) quienes afirman que los suelos contaminados contienen una gran cantidad de microorganismos que pueden incluir el número de bacterias capaces de utilizar hidrocarburos, que representan el uno por ciento de la población total (aproximadamente de 10^4 a 10^6 células por g de suelo). Esto explica el aumento y la desaparición de algunas bacterias, e incluso la aparición de otras que no se encontraban en el suelo testigo. También explica que concentraciones grandes de petróleo inhiban el crecimiento de las poblaciones y disminuyan la biodiversidad de las comunidades microbianas (Rhodes y Hendricks, 1990). Los efectos letales provocados por exposiciones agudas originan alteraciones de los ecosistemas (Botello, 1996) al existir un desequilibrio dentro de los ciclos biogeoquímicos (Rhodes y Hendricks, 1990).

Tabla 4. Poblaciones de bacterias encontradas en el análisis microbiológico realizado a las 219 horas de exposición al contaminante.

| Concentración de HTP | BT-1 | BT-2 | BT-3 | BT-4 | BT-5 | BT-6 | BT-7 | BT-8 | BT-9 |
|----------------------|--------|--------|--------|---------|-------------------|-------|--------|--------|--------|
| 0 (testigo) | 1829b* | 8943c | 6098b | 16260d | 3252bc | 0c | 0b | 0d | 0c |
| 1200 (T1) | 4609a | 2469d | 6996b | 82305c | 3086bc | 0c | 0b | 10500c | 0c |
| 3500 (T2) | 2675b | 8436c | 5844b | 8642d | 6173ab | 7407a | 0b | 9000a | 4333a |
| 10,000 (T3) | 2363b | 14557b | 0b | 648101b | 0c | 0c | 28692a | 57333a | 0c |
| 20,000 (T4) | 1250cb | 0d | 19583a | 716667a | 7500 ^a | 3208b | 0b | 36667b | 42000a |
| 40,000 (T5) | 0c | 33120a | 20513a | 730769a | 0c | 0c | 0b | 23000b | 10000b |

*Cifras con la misma letra en cada columna, no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$) ($a > b$).

Petróleo crudo sobre las poblaciones de bacterias totales

La Figura 9 muestra el efecto general en las poblaciones de bacterias a las 219 h de exposición al petróleo en cada uno de los tratamientos. En el tratamiento testigo (0 mg kg⁻¹ de petróleo) se observaron bajas poblaciones de bacterias, a diferencia de los tratamientos contaminados con el hidrocarburo.

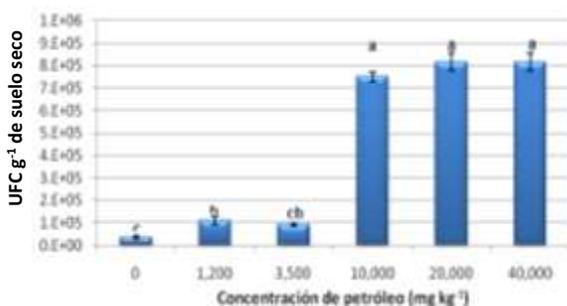


Figura 9. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de bacterias totales. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

Los factores limitantes para el crecimiento microbiano aerobio son la saturación por agua, el nivel de agua freática (0.36 m) y la textura arcillo limosa, que origina disminución de la porosidad (Rivera-Cruz *et al.*, 2006). El suelo franco arenoso, con un contenido menor de arcilla en esta investigación favoreció el crecimiento bacteriano. Sin embargo, el petróleo afecta la composición biológica del suelo, ya que las concentraciones tóxicas del petróleo inhiben el crecimiento de las poblaciones de microorganismos y mesofauna; por ello alteran los ciclos biogeoquímicos del ecosistema, lo que afecta su productividad (Rhodes y Hendricks, 1990). Freedman (1989), indica que algunos microorganismos pueden incrementar su población en presencia de hidrocarburos.

Poblaciones de *Azotobacter* sp., en suelo expuesto a diferentes concentraciones de petróleo crudo

La Figura 10 muestra el efecto general que revelaron las poblaciones de bacterias de *Azotobacter* sp., a las 219 h de exposición al petróleo crudo, en cada una de las distintas concentraciones. Para *Azotobacter* sp., se observó un comportamiento similar en los tratamientos testigo y el de 1200 mg kg⁻¹ de petróleo, al igual que en los tratamientos con 3500, 10,000 y 20,000 mg kg⁻¹ de petróleo. Sólo ocurrió un incremento significativo ($P \leq 0.01$) en el tratamiento con 40,000 mg kg⁻¹, respecto al testigo. Existen dos factores que presentan mayor influencia en la población de *Azotobacter* en el suelo, ambos asociados a la acción antagonista de la microflora y los contenidos de la materia orgánica en el suelo (Mishustin y Shilnikova, 1969). Muchos microorganismos aceleran el crecimiento de *Azotobacter* y la fijación de nitrógeno, pero otros microorganismos (*Cephalosporium* spp) inhiben el crecimiento de *Azotobacter* y consecuentemente su habilidad para fijar el nitrógeno.

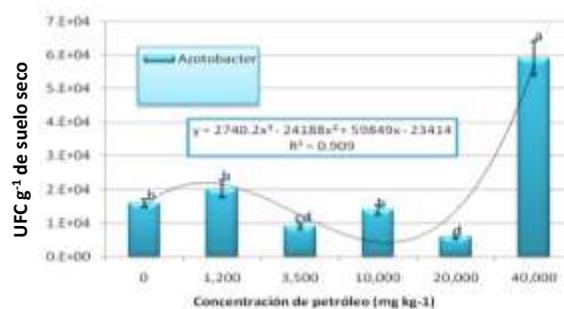


Figura 10. Efecto del petróleo sobre las poblaciones de *Azotobacter* sp y *Rhizobium* sp. Columnas con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.01$).

Jensen (1951), así como Bhardwaj y Gaur (1970) afirman que la falta de materia orgánica en el suelo es

un factor limitante. El efecto benéfico de pequeñas cantidades de humus en el crecimiento de *Azotobacter* y la fijación de N son ya conocidos (Silva, 2007).

Los hidrocarburos modifican las características físicas y químicas del suelo (Nava y Tirado, 1980; Li *et al.*, 1997; Riser-Roberts, 1998), que provocan el bloqueo del intercambio de gases entre el suelo y la atmósfera (Hersman y Flein, 1979; Segal y Mancinelli, 1987) y que afectan a las poblaciones microbianas del suelo. A pesar de ello, se destaca el comportamiento de *Azotobacter* sp., como una bacteria capaz de sobrevivir en ambientes hostiles, además de hacer patente que en vida libre fijan al menos 10 mg de N₂ por g de carbohidrato (glucosa) consumido (Espín, 2007).

CONCLUSIÓN

En suelo contaminado con petróleo, las bacterias presentaron un aumento sostenido en la población de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre a partir de las 144 h de desarrollo, incluso en las concentraciones más altas de petróleo crudo utilizadas. El índice del impacto microbiano mostró que a las 219 h, las poblaciones de bacterias se incrementaron satisfactoriamente en número, aunque no en diversidad. Se presentó una menor diversidad de colonias en los tratamientos con petróleo; al incrementar la concentración del hidrocarburo se hallaron colonias bacterianas que no se presentaron en el tratamiento testigo. Las poblaciones de *Azotobacter* sp., fueron mayores a concentraciones mayores del contaminante (40,000 mg kg⁻¹). Las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, poseen la característica de adaptarse a condiciones adversas, por lo que pueden ser aptas en estudios de biorremediación de suelos contaminados por petróleo crudo. Se podrían seleccionar microorganismos tolerantes y degradadores de hidrocarburo útiles para el saneamiento de zonas impactadas.

REFERENCIAS

Aguilar-Noh, A. G. 1987. Capacidad de intercambio catiónico. *In:* Aguilar-Santelises A., Etchevers-Barra, J. D., Castellanos-Ramos, J. Z. (eds.). Análisis Químico para Evaluar la Fertilidad del Suelo. Publicación especial 1. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Chapingo, México. pp. 93-107.

Al-Mutairi N., Bufarsan A., Al-Rukaibi F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere*. 74: 142-148.

Atlas, M. R., Horowitz, A., Krichevly, M., Bej, K. A. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiological Ecology*. 22: 249-256.

Bhardwaj, K. K., Gaur, A. C. 1970. The effect of HA on growth and efficiency of N fixation of *Azotobacter chroococum*. *Folia Microbiologica*. 15: 367.

Botello, V. A. 1996. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In:* Botello, V. A., Rojas J. L. G., Benítez, J. A., Zárate-Lomelí, D. (eds.). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX. Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México. pp. 203-210.

Campbell, I. B., Claridge, G. G. C. 1987. Antarctica: Soils, Weathering Processes and Environment. *Developments in Soil Science* 16. Elsevier Science Publishers B.V.

Cárdenas, J. F., Díaz, M. J., Tova, J., Gutiérrez, C., Moctezuma, M. G., Acosta, I. R. 2005. Aislamiento e Identificación de Bacterias y Levaduras Tolerantes a Petróleo a Partir de Algunos Ríos de la Huasteca Potosina. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Laboratorio de Micología Experimental y Laboratorio de Microbiología. CIEP. Facultad de Ciencias Químicas. SLP, México.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. NOM-021-RECNAT-2000. Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios de muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. Martes 31 de Diciembre del 2002. pp. 1-75.

Elías-Murguía, R. L., Martínez, V. 1991. Suelos contaminados con hidrocarburos. *In:* Ruiz, F. J. F. (ed.). Causas y Consecuencias de la Contaminación del Suelo. Mesa Redonda, Departamento de Suelos. UACH, Chapingo, México. pp. 46-53.

Espín, G. 2007. Biología de *Azotobacter vinelandii*. Instituto de Biotecnología. UNAM. México. pp. 1-17.

Freedman, B. 1989. Environmental Ecology: The Impacts of Pollution and other Stresses on Ecosystem Structure and Function. Academic Press, Inc. San Diego, California. USA.

- Frois-Duarte, G., Soares-Rosado, A., Seldin L., de Araujo, W., van Elsas, J. D. 2001. Analysis of bacterial community structure in sulfurous-oil-containing soils and detection of species carrying dibenzothiophene desulfurization (*dsz*) genes. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(3): 1052-1062.
- Gobat, J. M., Aragno, M., Matthey, W. 2004. *The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Science Publishers. Enfield, New Hampshire, USA.
- Ingraham, J. L., Ingraham, A. C. 1998. *Introducción a la Microbiología*. Vol. I. Editorial Reverté, S. A. Barcelona, España.
- Jensen, H. L. 1951. Notes on the biology of *Azotobacter*. *Proceedings of the Society of Applied Bacteriology*. 14: 89-94.
- Hersman, L. E., Flein, D. A. 1979. Retorted oil shale effects on soil microbiological characteristics. *Journal of Environmental Quality*. 8: 520-524.
- Li X., Feng Y., Sawatsky, N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. *Plant Soil*. 192: 219-226.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M., Parker, J. 1998. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 8ª Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, España. 1024 p.
- Martínez, V. E., López, S. F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*. 19(1): 9-17.
- Mishustin, E. N., Shilnikova, V. K. 1969. Free-living nitrogen fixing bacteria of the genus *Azotobacter*, In: *Soil Biology, Reviews of Research*. UNESCO Publication. pp. 72-124.
- Nava, D. J., Tirado, S. D. 1980. Efectos residuales en suelos por derrames de petróleo crudo. In: *Memoria del XIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Tomo I. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Toluca, México. pp. 127-140.
- OECD (Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico). 1984. *Terrestrial Plant Growth Test Guidelines for Testing Chemicals No. 208*. OECD. France.
- Patin, S. A. 1982. *Pollution and the Biological Resources of the Ocean*. Butterworth Scientific. London, UK.
- Porta, A., Filliat, N., Plata, N. 1999. Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. In: Lesson A., Alleman, B. C. (ed). *Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications*. Battelle. Columbus, Ohio. USA. pp. 51-56.
- Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylenoreducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*. 27: 8-14.
- Riser-Roberts, E. 1998. *Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical and Chemical Processes*. Lewis Publishers. Boca Raton, Florida, USA.
- Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R. 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos de petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia*. 36: 149-160.
- Rivera-Cruz, M. C., Ferrara-Cerrato, R., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. *Agrociencia*. 38: 1-12.
- Rivera-Cruz M. C., Trujillo-García, A., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Vázquez, R., Volke-Haller, V., Sánchez-García, P., Fernández-Linares, L. 2006. Fitorremediación de suelos con benzo (a) pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H-B-K-) Hitchc. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 22(1): 1-12.
- Rhodes, A. N., Hendricks, C. W. 1990. A continuous-flow method for measuring effects of Chemicals on soil nitrification. *Toxicity Assessment*. 5: 77-89.
- Rosswall, T. 1982. Microbiological regulation of the biogeochemical nitrogen cycle. *Plant and Soil*. 67: 15-34.

- Segal, W., Mancinelli, R. L. 1987. Extent of regeneration microbial community in reclaimed spent oil shale land. *Journal of Environmental Quality*. 16: 44-48.
- Silva, L. J. C. 2007. Potencial de bacterias en el suelo y rizosfera del limón persa (*Citrus latifolia* L.) para la formulación de biofertilizantes. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Cárdenas, Tabasco, México.
- Vargas, G. P. A., Cuéllar, R. R., Dussan, J. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. <http://www.mindefensa.gov.co/derecho/mea01gua.html> (Consultado: 16/01/2008).
- Vázquez-Luna, D., Castelán-Estrada, M., Rivera-Cruz, M. C., Ortiz-Ceballos, A. I., Izquierdo, R. F. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26(3): 183-191.
- Weber, C. I. 1981. Evaluation of the effects on the aquatic life in receiving waters. An overview. In: Bates, J. M., Weber, C. I. (eds.). *Ecological Assessment of Effluent on Communities on Indigenous Aquatic Organisms*. ASTM, American Society for Testing and Materials. USA. pp. 3-13.

Submitted February 16, 2011 – Accepted June 21, 2011
Revised received August 01, 2011