



Terra Latinoamericana

E-ISSN: 2395-8030

terra@correo.chapingo.mx

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo,
A.C.
México

Rivera, María del Carmen; Ferrera, Ronald; Volke, Víctor; Rodríguez, Refugio; Fernández, Luis
Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con
petróleo crudo

Terra Latinoamericana, vol. 20, núm. 4, octubre-diciembre, 2002, pp. 423-434

Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo, A.C.

Chapingo, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57320407>

- 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

ADAPTACION Y SELECCION DE MICROORGANISMOS AUTOCTONOS EN MEDIOS DE CULTIVOS ENRIQUECIDOS CON PETROLEO CRUDO

Adaptation and Selection of Autochthonous Microorganisms in Culture Media Enriched with Crude Petroleum

María del Carmen Rivera-Cruz¹, Ronald Ferrera-Cerrato², Víctor Volke Haller²,
Refugio Rodríguez Vázquez³ y Luis Fernández Linares⁴

RESUMEN

Los resultados que se presentan en el presente trabajo se refieren a la versatilidad adaptativa y de tolerancia de 46 hongos y 34 cepas de bacterias autóctonas de la rizósfera de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya*) y cabezón (*Paspalum virgatum*) establecidos en Gleysoles, receptores de derrames recientes y crónicos de petróleo crudo y aguas aceitosas en el estado de Tabasco. La evaluación sucesiva se realizó en laboratorio, durante tres fases, de hongos y bacterias sembrados en medios sólidos y líquidos enriquecidos con 1% de petróleo tipo Maya como fuente energética. Los microorganismos que presentaron crecimiento abundante en las tres fases fueron: tres cepas de bacterias gramnegativas y los hongos *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp. y *Trichoderma* spp. La mayoría procede de la rizósfera del pasto cabezón, expuesto a periodos largos y crónicos de contaminación hasta con 322 841 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo. Las bacterias y hongos seleccionados pueden ser una alternativa de biorremediación mediante consorcios microbianos.

Palabras clave: Carbono, crecimiento microbiano, tiempo de generación, bacterias fijadoras de N, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

SUMMARY

The results presented in this work highlight the adaptive versatility and tolerance of 46 fungi and 34 strains of native bacteria of the rhizosphere of the "alemán" grass (*Echinochloa polystachya*) and "cabezón" grass (*Paspalum virgatum*) growing in Gleysols, which have been affected by recent and chronic petroleum spills in the state of Tabasco. Successive evaluations were carried out in laboratory during three phases. The fungi and bacteria were cultured in solid and liquid media enriched with 1% Maya-type petroleum as the energy source. The microorganisms that grew abundantly in the three phases were three strains of gramnegative bacteria and the fungi *Aspergillus* sp., *Paecilomyces* sp., *Penicillium* sp., and *Trichoderma* spp. Most of these are from the rhizosphere of "cabezón" grass exposed to long, chronic periods of pollution with up to 322 841 mg kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbons. The bacteria and fungi selected could offer a bioremediation through microbial consortia.

Index words: Carbon, microbial growth, generation time, nitrogen-fixing bacteria, *Aspergillus*, *Paecilomyces*, *Penicillium*, *Trichoderma*.

INTRODUCCION

Los derrames de petróleo constituyen una fuente de contaminación del suelo y del agua. Este tipo de contingencias ambientales originan efectos directos en las poblaciones de los microorganismos. La tolerancia microbiana a la presencia de petróleo en el suelo induce la selectividad y la disminución de la diversidad. Los microorganismos, tolerantes a este ambiente de estrés, desarrollan y utilizan respuestas enzimáticas y fisiológicas especializadas (Atlas *et al.*, 1991). Estos atributos propician las fluctuaciones poblacionales de los hongos y bacterias autóctonos y realizan, de manera natural, la degradación química del petróleo presente en el suelo. La biodegradación y

¹ Campus Tabasco-Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina s/n, km 3.5, 86500 H. Cárdenas, Tabasco. Tel. 01 (937) 3722386. (mariari@colpos.colpos.mx)

² Instituto de Recursos Naturales, Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 35.5, 56230 Montecillo, estado de México.

³ Departamento Biotecnología y Bioingeniería. Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados. Instituto Politécnico Nacional. México, DF.

⁴ Programa de Biotecnología. Instituto Mexicano del Petróleo, México, DF.

la foto oxidación en los ambientes tropicales encuentran condiciones favorables de temperatura, nutrientes, concentración de oxígeno y humedad en los edafoambientes, en particular, en la zona de la rizósfera.

El petróleo crudo contiene cientos de compuestos individuales, pero presenta cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos. Los compuestos saturados (C_nH_{2n+2}) agrupan a los alcanos y cicloparafinas; los aromáticos (C_nH_{2n-6}) incluyen a los mono, di y polinucleoaromáticos. Las resinas son agregados con una gran cantidad de estructuras, como: piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y aminas; el cuarto grupo son los asfaltenos, que incluyen los agregados de poliaromáticos, ácidos nafténicos, fenoles, ácidos grasos y metaloporfirinas (Leahy y Colwell, 1990).

Se ha demostrado que el crecimiento de los microorganismos requiere de fuentes de carbono derivadas de los hidrocarburos del petróleo. Los compuestos saturados y los aromáticos con uno a cinco anillos bencénicos son utilizados como fuentes energéticas; en cambio, los aromáticos de peso molecular alto (mayor que cinco anillos bencénicos), resinas y asfaltenos son difíciles de degradar por su recalcitrancia (Sugiura *et al.*, 1997).

La selección de bacterias y hongos a través de pruebas sucesivas de crecimiento poblacional en cultivo puro rico en petróleo, es una estrategia eficiente para evaluar la adaptación y sobrevivencia de cepas tolerantes a concentraciones altas de petróleo. Los resultados de las pruebas en laboratorio respaldan la selección de las cepas más tolerantes y adaptadas. El éxito de las etapas subsiguientes, en invernadero y en suelos contaminados en campo, depende de la calidad de la selección y de las condiciones ambientales.

La evaluación sucesiva de los microorganismos que utilizan hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de energía, es prioritaria para demostrar la eficiencia de las tecnologías de biorremediación en suelos expuestos a concentraciones tóxicas de petróleo en el suelo. El objetivo en este trabajo fue seleccionar de manera gradual en laboratorio, la respuesta de hongos y bacterias autóctonos capaces de crecer en cultivos puros enriquecidos con petróleo crudo Maya.

MATERIALES Y METODOS

Se colectaron rizósferas de los pastos alemán y cabezón, cultivados en dos suelos influenciados por las instalaciones del campo petrolero La Venta y del Complejo Procesador de Gas La Venta, ubicados al oeste del estado de Tabasco. La rizósfera testigo (sin petróleo) de ambos pastos se colectó en el ejido Hermenegildo Galeana 3a Sección, ubicado en el municipio de Teapa, Tabasco. El método consistió de cuatro etapas: 1) colecta de la rizósfera; 2) evaluación microbiológica de la rizósfera; 3) selección y estabilización de microorganismos en petróleo; 4) análisis estadístico. La Etapa 3 consistió de tres fases sucesivas para bacterias y tres para hongos (Figura 1).

Actividades de Preparación y Materiales Utilizados

El material de vidrio se sometió por 5 h a calor seco (180°C); los medios de cultivo, puntillas, petróleo y papel filtro se esterilizaron en olla de presión a 1.3 kg cm^{-2} (Ingraham e Ingraham, 1998). El papel filtro se cortó en cuadros de $1.5 \times 1.5\text{ cm}$ antes de la esterilización. Para la Etapa 2 se utilizaron medios de cultivos complejos para el crecimiento de

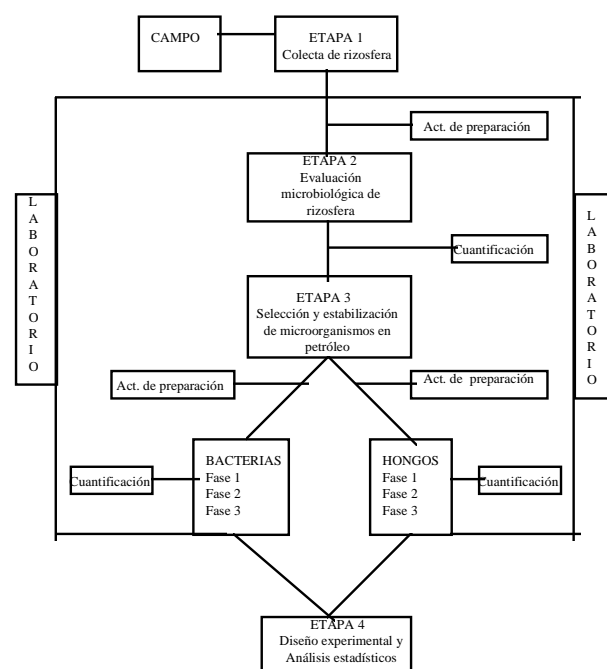


Figura 1. Protocolo del proceso de la investigación.

todo tipo de bacterias y hongos en menor tiempo, agar nutriente (AN) para bacterias y papa dextrosa agar (PDA) para hongos (Madigan *et al.*, 1998). Se utilizaron medios de cultivos selectivos de carbón combinado (CC) para bacterias fijadoras de N de vida libre (Rennie, 1981). Otro medio utilizado fue: carbón combinado modificado (CCM), específico para bacterias fijadoras de N atmosférico tolerantes a petróleo, basado en medio inorgánico + petróleo, el cual constó de dos soluciones. Solución I: K_2HPO_4 (0.8 g L⁻¹), NaCl (0.1 g L⁻¹), NaFeEDTA (0.007 g L⁻¹), $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ (0.25 g L⁻¹), agar, agua destilada, el pH se ajustó a 7.0. Solución II: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g L⁻¹), $CaCl_2$ (0.06 g L⁻¹), biotina y ácido p-aminobenzoico (10 mg L⁻¹) y petróleo (400 mg L⁻¹) (Rennie, 1981, modif. por R. Ferrera-Cerrato). El medio para hongos celulíticos modificado (HCM) para hongos tolerantes a petróleo, se formó con nutrimentos inorgánicos + petróleo. Este medio consistió de $(NH_4)_2SO_4$ (0.5 g L⁻¹), KH_2PO_4 (1.0 g L⁻¹), KCl (0.5 g L⁻¹), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (0.2 g L⁻¹), $CaCl_2$ (0.1 g L⁻¹), agar, agua destilada y estreptomycin. El pH se ajustó a 6.2 y se adicionó 1% de petróleo (vol./vol.) [Eggins y Rugh, citados por Johnson y Curl (1972)]. En la primera etapa se utilizó medio sólido, para la segunda y tercera fases de la Etapa 3, medio líquido.

Se utilizó petróleo Maya en la Etapa 2 y en las tres fases para bacterias y hongos de la Etapa 3. Este es un crudo ligero; las características son: gravedad 22.0, viscosidad (cp) a 20 °C 5300; tiene el siguiente contenido de hidrocarburos: C4-C10 = 48.8%, C11-C20 = 36.66%, C21-C30 = 10.26%, C30-C40 = 3.05% y C41-C51 = 1.05% (Duncan *et al.*, 1995).

Para la Etapa 3, en las tres fases de bacterias se utilizó el medio específico para bacterias fijadoras de N tolerantes a petróleo (CCM sólido y líquido); en las tres fases de la Etapa 3 de hongos se utilizó medio inorgánico + petróleo (HCM) sólido y líquido. El petróleo se incorporó como fuente energética al finalizar la siembra de los microorganismos.

Etapas 1. Colecta de rizósfera. Se colectaron núcleos rizosféricos (0 a 30 cm de profundidad) del pasto alóctono alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y del pasto nativo cabezón (*Paspalum virgatum* L.), establecidos en Gleysols sin influencia petrolera (17°40'58" N y 93°00'45" O); del pasto alemán cultivado en suelo con derrame reciente de petróleo crudo (18°06'52" N y 94°03'18" O) y del pasto nativo cabezón cultivado en suelo con derrame crónico muy contaminado (18° 05' 31" N y

94° 03' 05" O) en el campo petrolero La Venta, estado de Tabasco (Rivera, 2001).

En suelo sin influencia petrolera, se colectaron cuatro núcleos rizosféricos de cada pasto establecidos en Gleysol histi-orthiéutrico (abruptico) con 100 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales de petróleo (HTP), atribuibles a la síntesis biogénica y por quema *in situ* de material vegetal (Rivera, 2001). Otros cuatro núcleos se extrajeron del pasto alemán cultivado en un Gleysol histi-dístrico (abruptico) con 115 000 mg kg⁻¹ de HTP derivados de un derrame reciente sucedido durante agosto de 1998; del tercer sitio también se extrajeron cuatro núcleos colectados del pasto cabezón en un Gleysol histi-eutri-sódico (abruptico) con 322 800 mg kg⁻¹ de HTP. Este sitio ha estado expuesto, desde 1963, a la acumulación constante de petróleo crudo procedente de la rotura de oleoductos y del agua aceitosa del Complejo Procesador de Gas La Venta (Rivera, 2001). El muestreo se realizó durante el periodo de sequía (mayo 1999). Los núcleos rizosféricos se introdujeron de manera separada en recipientes de vidrio ámbar esterilizados (Atlas y Bartha, 1981; Boulding, 1994). La conservación de las rizósferas durante la recolección se realizó en hielera a 4 °C, después se almacenó en refrigeración a 4 °C durante una semana.

Etapas 2. Evaluación microbiológica de la rizósfera.

Se realizó con el método de conteo viable de células vivas por siembra en superficie (Madigan *et al.*, 1998). Se prepararon diluciones decimales seriadas con 10 g de suelo rizosférico en 90 mL de agua estéril, hasta 1/10⁸ para bacterias y 1/10⁵ para hongos. Se tomó 0.1 mL de cada dilución y se colocó en el centro de la caja Petri con medios de cultivos de agar nutriente (AN), papa dextrosa agar (PDA), carbón combinado (CC), carbón combinado modificado (CCM) y hongos celulíticos modificados (HCM). La dilución se distribuyó con una varilla de vidrio esterilizado en forma de L, se realizó por triplicado. A los cultivos sembrados en medios de CCM y HCM se les agregó cuadro de papel filtro impregnado con petróleo y se adhirió en la pared interior de la tapa de la caja Petri. Las cajas sembradas se invirtieron y se incubaron a 28 °C; los cultivos en AN, PDA y CC por 48 h y los cultivos en CCM y HCM durante 96 h. El conteo de viables se realizó contando unidades formadoras de colonias (UFC) expresadas en la superficie de la caja, luego se convirtió a UFC g⁻¹ de suelo seco. El conteo se realizó con contador de colonias Darkfield Quebec, Cia. American Optical.

Etapa 3. Selección y estabilización de microorganismos en petróleo. Las pruebas de selección de bacterias y hongos degradadores se basaron en la evaluación del crecimiento en medios de cultivos enriquecidos con petróleo. Se utilizaron 34 cepas de bacterias y 46 hongos, resultado de las cuantificaciones microbianas realizadas en núcleos rizosféricos de los pastos alemán y cabezón en suelos contaminados con petróleo y no contaminados. Todas las bacterias son fijadoras de N atmosférico de vida libre y son Gram negativas y móviles. Los hongos pertenecen a los géneros *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Paecilomyces* y ocho aislados no identificados.

Bacterias. Fase 1. Siembra en medio sólido. Esta consistió en probar el crecimiento de 34 aislados de bacterias previamente preservadas y caracterizadas. La pureza de las bacterias se midió con la técnica de tinción de Gram, se sembraron por triplicado, por el método de siembra por estría en placa (Ingraham e Ingraham, 1998) en medio de carbón combinado modificado. La muestra de la colonia se tomó con una asa esterilizada, se hizo el estriado sobre la superficie del medio de cultivo. El petróleo crudo se impregnó en un cuadro de papel filtro No. 42 y se adhirió en el interior de la tapa de la caja Petri. Las placas se incubaron durante seis días a 28 °C en incubadora de convección mecánica GCA Corp. Se seleccionaron las bacterias que crecieron sobre el medio de cultivo.

Fase 2. Siembra en medio líquido. Las 11 colonias que pasaron la prueba de la Fase 1 se colocaron de manera individual, por triplicado, en contacto directo con la fuente de carbono (petróleo). Se utilizó medio de cultivo mineral líquido estéril y se inoculó con una suspensión de bacterias tolerantes a petróleo en frasco con respiradero de vidrio tapado con algodón (Rivera, 2001). La suspensión de células microbianas se realizó en 5 mL de agua estéril y se vertió en 50 mL de medio de cultivo de carbón combinado modificado con 1% de petróleo. Las células se incubaron a 28 °C durante 45 días en agitación rotatoria a 180 revoluciones por minuto, en una agitadora-incubadora New Brunswick Scientific. La cuantificación se realizó por turbidimetría (Ingraham e Ingraham, 1998), se tomó de referencia la escala de turbidez de McFarland (Campbell *et al.*, 1970), pero con 1% de petróleo. La escala fue en porcentaje de turbidez visual: 0%, cristalino: indica falta de crecimiento o de formación de biomasa microbiana; 25%, medio ligeramente turbio: indica poco crecimiento; 50%, medio turbio: indica crecimiento

intermedio; 75% turbio: representa crecimiento normal; 100% muy turbio: indica crecimiento alto. Esta escala se diseñó y se aplicó porque el petróleo produjo interferencia en el espectrofotómetro. Las observaciones se realizaron a 0, 15, 30 y 45 días.

Fase 3. Cinética de crecimiento. Las cinco bacterias seleccionadas en la Fase 2 se evaluaron en esta fase. Se utilizó el método de cultivo enriquecido (Madigan *et al.*, 1998). Se tomó 1 mL del cultivo bacteriano obtenido en la Fase 2, se introdujo a un frasco con respiradero de vidrio con tapón de algodón y gasa con 50 mL de medio mineral de cultivo nuevo de carbón combinado modificado. Se realizó la incubación a 28 °C durante 12 días (288 h) en agitación rotatoria a 180 revoluciones por minuto, en una agitadora-incubadora New Brunswick Scientific. Se incubó durante 288 h, tiempo de adaptación de las bacterias al crecimiento en sustrato enriquecido con petróleo.

Las evaluaciones del crecimiento se realizaron a 0, 3, 6, 9 y 12 días y se utilizó el método de conteo de células viables por siembra en superficie. Se utilizaron diluciones seriadas con base en 1 mL de sobrenadante en 9 mL de agua estéril hasta $1/10^8$. Las cajas Petri se sembraron por triplicado, se agregó en el centro de la caja 0.1 mL de cada dilución, se distribuyó con una varilla esterilizada de vidrio y se adhirió el cuadro de papel filtro impregnado con petróleo en la pared interior de la tapa de la caja Petri. Las cajas se invirtieron y se incubaron a 28 °C. El conteo de colonias a las 96 h se realizó con el contador Darkfield Quebec, Cia. American Optical, luego se realizó la transformación a UFC mL⁻¹ de sobrenadante.

Hongos. Fase 1. Siembra en medio sólido. La pureza de los hongos se verificó con estudios microscópicos y con la identificación de los géneros. Se realizó la siembra por triplicado en medio sólido HCM. Se tomó con un saca-bocado una rodaja del hongo con estructura reproductiva, se colocó sobre un cuadro de tul (1.5 x 1.5 cm) impregnado con 0.005 g de petróleo Maya y se acomodó sobre el medio de cultivo mineral inorgánico sólido. Se incubó a 28 °C durante cuatro días en incubadora de convección mecánica GCA Corp. La evaluación se realizó a 20 días; el criterio de selección fue el crecimiento del hongo sobre el tul con petróleo.

Fase 2. Siembra en medio líquido. Se utilizaron los hongos seleccionados en la primera fase. Se colocó el micelio del hongo sobre el petróleo en el medio de cultivo líquido. Se introdujo al medio líquido un cuadro de tul (1.5 x 1.5 cm) impregnado con 0.005 g

de petróleo, éste se colocó suspendido en la superficie del cultivo líquido, sobre el tul con petróleo se colocó el micelio del hongo. Se incubó a 28 °C durante 12 días en una incubadora de convección mecánica GCA Corp. Se evaluó de manera visual la cantidad de micelio que creció sobre el cuadro de tul impregnado con petróleo. La escala visual tuvo cinco grados: 0%, el micelio no creció; 25%, el micelio cubrió la cuarta parte de la superficie del tul con petróleo; 50%, el micelio cubrió la mitad del tul; 75%, el micelio cubrió tres cuartas parte de la superficie del tul; 100%, el micelio cubrió totalmente la superficie del tul con petróleo.

Fase 3. Cinética de crecimiento. Se utilizó el método de vertido de suspensión de hongo (5 mL de agua estéril + 50 000 conidios) en 50 mL de medio inorgánico líquido + 1% de petróleo. En esta fase, el hongo estuvo en contacto directo con gotas de petróleo (0.1 mL de petróleo). Se incubó a 28 °C durante 18 días en agitación rotatoria a 180 revoluciones por minuto, en incubadora New Brunswick Scientific. La cinética del crecimiento se realizó con el método de conteo de viables en placa. Se utilizaron diluciones seriadas de 1 mL de sobrenadante en 9 mL de agua estéril, hasta $1/10^5$. Las cajas Petri con medio sólido inorgánico (HCM) + petróleo se sembraron e incubaron de la misma manera que las bacterias de la Etapa 3, Fase 3. Se realizó conteo viable a 0, 9 y 18 días.

Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Los factores y los niveles se agruparon en los diseños factoriales siguientes: a) para las bacterias en la primera fase se utilizó un 34 x 2 con tres repeticiones (34 aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%); en la segunda fase de selección un 11 x 2 con tres repeticiones (11 aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%), en la tercera fase un 5 x 2 con tres repeticiones (cinco aislados y dos niveles de petróleo: 0 y 1%). El análisis estadístico se aplicó a los resultados obtenidos de la tercera fase de selección de bacterias y hongos, se utilizó el programa ANOVA, diferencias de medias de Tukey ($P = 0.05$) entre tratamientos en tres tiempos (0, 6 y 12 días) y correlación (SAS, 1989). El tiempo de generación (G) de las bacterias en la tercera fase se calculó con la fórmula:

$$G = t / \log 3.3 b/B$$

Donde: t = periodo de tiempo, b = número de bacterias al final de un periodo dado, y B = recuento bacteriano en el tiempo 0 (Pelczar y Reid, 1980).

RESULTADOS Y DISCUSION

Microorganismos Rizosféricos en Suelos No Contaminados y Contaminados con Petróleo

Las poblaciones de bacterias totales, bacterias fijadoras de N atmosférico de vida libre, bacterias asimiladoras de N, bacterias degradadoras de petróleo, hongos totales y hongos degradadores de petróleo se encontraron en sistemas rizosféricos de los pastos alemán y cabezón, establecidos en Gleysols contaminados con derrame reciente, en Gleysol con derrame crónico y muy contaminado y en Gleysol no contaminado con petróleo. Los resultados evidenciaron diferencias estadísticas significativas en la media de las poblaciones (Cuadro 1) según el grado de la contaminación y el tipo de pasto.

Las poblaciones de bacterias totales, bacterias fijadoras de N y de hongos totales de la rizósfera del pasto alemán disminuyeron en Gleysol con derrame reciente (115 211 mg kg⁻¹ de HTP) respecto al Gleysol no contaminado (Cuadro 1). La reducción fue del orden de 6, 20 y 575 veces, respectivamente. La disminución fue mayor en la rizósfera del pasto cabezón colectada en Gleysol con derrame crónico (322 841 mg kg⁻¹ de HTP), las bacterias asimiladoras de N tuvieron 656 menor población que las existentes en el Gleysol sin contaminación. Atlas *et al.* (1991) mencionaron que las poblaciones microbianas resienten el efecto de la contaminación del suelo, lo cual se manifiesta en la disminución de las poblaciones microbianas originado por el estrés ambiental.

Otros resultados obtenidos fueron el aumento significativo de nueve y 33 veces las poblaciones de las bacterias asimiladoras de N atmosférico y de las bacterias fijadoras degradadoras de petróleo de la rizósfera del pasto alemán cultivado en Gleysol contaminado por derrame reciente respecto a la rizósfera del pasto alemán cultivado en Gleysol no contaminado. La rizósfera del pasto cabezón cultivado en Gleysol histi-eutri-sódico con derrame crónico tuvo nueve veces mayor población de hongos tolerantes a petróleo con respecto al no contaminado (Cuadro 1). Este potencial rizosférico se ha encontrado en otras

Cuadro 1. Unidades formadoras de colonias microbianas en la rizósfera de los pastos alemán y cabezón en suelos de zonas petroleras de Tabasco.

Microflora rizosférica	Pasto alemán		Relación [†]		Pasto cabezón		Relación [†]	
	GL [‡] no contam.	GL contam.	GL no contam.	GL contam.	GL no contam.	GL muy contam.	GL no contam.	GL muy contam.
	UFC (g suelo seco)				UFC (g suelo seco)			
HTPs (mg kg ⁻¹)	100	115 211			100	322 841		
B. [§] totales	37 x 10 ⁴ b [#]	6.6 x 10 ⁴ c	6	1	277 x 10 ⁴ a	0.8 x 10 ⁴ d	346	1
H. [¶] totales	92 x 10 ⁴ a	0.16 x 10 ⁴ c	575	1	6.1 x 10 ⁴ b	0.06 x 10 ⁴ d	102	1
B. asimiladoras de N	5 x 10 ⁴ b	5.5 x 10 ⁴ b	1	1	722 x 10 ⁴ a	1.1 x 10 ⁴ c	656	1
B. fijadoras de N	54 x 10 ⁴ b	2.7 x 10 ⁴ c	20	1	355 x 10 ⁴ a	1.4 x 10 ⁴ c	253	1
B. asimiladoras + petróleo	0.36 x 10 ⁴ c	3.1 x 10 ⁴ b	1	9	180 x 10 ⁴ a	0.4 x 10 ⁴ c	450	1
B. fijadoras de N + petróleo	0.30 x 10 ⁴ c	1.0 x 10 ⁴ b	1	33	420 x 10 ⁴ a	1.3 x 10 ⁴ b	323	1
Hongos + petróleo	0.33 x 10 ⁴ c	0.23 x 10 ⁴ d	1	1	0.55 x 10 ⁴ a	4.7 x 10 ⁴ b	1	9

[‡] La relación se obtuvo de la división de la población más grande, como UFC, entre la población más pequeña en la misma hilera.

[†] Gleysol. [§] Bacterias. [¶] Hongos.

[#] Letras diferentes en sentido horizontal indican medias de tratamientos con diferencias estadísticas significativas (P = 0.05).

regiones petroleras del mundo, por ejemplo en Kuwait (Radwan *et al.*, 1995), con 10% de petróleo en el suelo las bacterias y hongos en sistema rizosférico de plantas de maíz y tomate tuvieron respectivamente 3.0 x 10⁸ y 8.1 x 10⁸ UFC de bacterias por gramo de raíz fresca.

Las poblaciones de bacterias fijadoras de N y hongos tolerantes a HTP, obtenidos de los sistemas rizosféricos de los pastos alemán y cabezón, pueden considerarse, de acuerdo con Atlas *et al.* (1991), como cepas especializadas y degradadoras de petróleo, porque poseen la capacidad de multiplicarse en suelos con concentraciones altas de petróleo. Estas bacterias y hongos son importantes por el potencial genético que han desarrollado para el uso del petróleo como fuente de carbono y energía en los procesos metabólicos. Las ventajas de estos microorganismos son para la descontaminación de suelos.

Características de Bacterias y Hongos Degradadores de Petróleo Aislados de las Rizósferas de los Pastos Alemán y Cabezón

Las características morfológicas de las 34 cepas de bacterias fijadoras de N atmosférico de vida libre tolerantes a petróleo son heterogéneas, 27 cepas se localizaron en la rizósfera del pasto cabezón y siete en la rizósfera del pasto alemán. Las bacterias tuvieron morfología colonial diversa, desde colonias del tipo puntiforme, circulares y alargadas. El estudio microscópico mostró formas redondas individuales y en grupos, bacilares y cocobacilos, Gram negativas y móviles, márgenes lisos e irregulares, convexas y

planas; de colores transparentes, amarillas, rosadas y blancas.

Los 46 hongos degradadores de petróleo, aislados de las rizósferas del pasto alemán en suelo con derrame reciente y del pasto cabezón en Gleysol con derrame crónico, 18 pertenecen al género *Trichoderma*, 13 al género *Penicillium* sp., seis al *Aspergillus* sp., un *Mucor* sp., un *Paecilomyces* sp. y siete no identificados. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otras zonas petroleras. Radwan *et al.* (1995) encontraron hongos de los géneros *Penicillium* sp. y *Fusarium* sp. en el sistema rizosférico del tomate; April *et al.* (2000) identificaron varias especies de los géneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Penicillium* y *Trichoderma* en pastos en suelos contaminados en el oriente y sureste de Canadá.

Selección y Estabilización de Bacterias en Petróleo

La selección y estabilización de 34 bacterias aisladas en medios de cultivos sólidos enriquecidos con petróleo evidenció que 21 bacterias (62%) crecieron en forma abundante en el medio enriquecido, resultados similares obtuvieron Rosenberg *et al.* (1992) con cepas gramnegativas puras. La sobrevivencia de bacterias puras en esta primera fase de selección en condiciones de laboratorio, sugiere que poseen capacidad para utilizar hidrocarburos alifáticos y aromáticos como donadores de electrones (Madigan *et al.*, 1998), debido a que la fuente de carbono se colocó a unos milímetros de distancia de la superficie del medio de cultivo, en la pared interior de la tapa de la caja Petri.

Las bacterias que crecieron en el medio sólido + petróleo en la segunda fase se sometieron a medios de cultivo líquido enriquecidos con 1% de petróleo crudo Maya. Los resultados obtenidos demostraron mayor rigurosidad en la selección, ya que sólo 11 de las 21 bacterias crecieron en el medio líquido. Al respecto, se ha encontrado que 96% de bacterias aisladas de medios líquidos (lagos) presentan la capacidad de emulsificar hidrocarburos derivados del petróleo (Leahy y Colwell, 1990).

Los aislados de bacterias CT1, CT10, CT11, CT14, CT16, CT20 y CT26 nativas de la rizósfera del pasto cabezón en Gleysol con derrame crónico ($322\ 841\ \text{mg kg}^{-1}$ de HTP), además la bacteria AT4 de la rizósfera de pasto alemán en suelo con derrame reciente ($115\ 211\ \text{mg kg}^{-1}$ de HTP), tuvieron crecimiento logarítmico. La turbidez total (100%) resultó a 30 días en las cepas CT16, CT20 y CT26; las cepas CT1, CT10, CT11, CT14 y CT16 lograron este nivel de turbidez hasta 45 días, otras mostraron menor capacidad de multiplicación (Figura 2). Las cepas más tolerantes y adaptadas fueron la CT20 y la CT26 que desde 30 días alcanzaron 100% de turbidez, la menos adaptada fue la cepa CT17, con 50% de turbidez. Al respecto, Posten y Cooney (1993) afirmaron que la turbidez es un indicador confiable del crecimiento microbiano en condiciones ricas de carbono. Bury y Miller (1993) indicaron que el crecimiento bacteriano está basado en tres mecanismos del metabolismo de sustratos poco solubles: 1) interacción de las células con hidrocarburos disueltos en la fase acuosa, 2) contacto directo de las células con gotas de hidrocarburos, más grandes que las células,

3) interacción de las células con una pseudosolubilización de los hidrocarburos, en donde se acomodan en fracciones más pequeñas que la célula.

Los resultados de la medición de los tiempos de generación por cepa evidenciaron medias de tratamientos con diferencias estadísticas significativas ($P = 0.05$) entre cepas establecidas en sustrato inorgánico con petróleo y sin petróleo (Cuadro 2). Las bacterias inoculadas en medio de cultivo con petróleo requirieron menor tiempo de generación que las mismas bacterias sembradas en medio de cultivo mineral sin petróleo. Esta respuesta demuestra que las cepas CT10, CT11, CT14, CT16 y CT26 utilizan el carbono derivado del petróleo y son incapaces de efectuar crecimiento autotrófico con CO_2 como única fuente de carbono. La cepa que requirió menor tiempo de generación fue la CT16 del Tratamiento 7 con petróleo con 15 h, la misma bacteria pero sin petróleo necesitó 766 h (51 veces más tiempo) para duplicar la población (Cuadro 2). Esta respuesta posiblemente se originó por dos causas: la primera, es que todo ser vivo requiere fuente de carbono para crecer debido a que una célula típica consta de aproximadamente 50% de carbono (Madigan *et al.*, 1998); la segunda, estas cepas son tolerantes y presentan en la estructura celular mecanismos hidrofóbicos que permiten utilizar al petróleo como fuente de carbono y energía (Rosenberg y Ron, 1998). Otras bacterias requieren tiempos prolongados, según la estimación teórica basada en la fórmula de Pelczar y Reid (1980), para alcanzar la duplicación de la población.

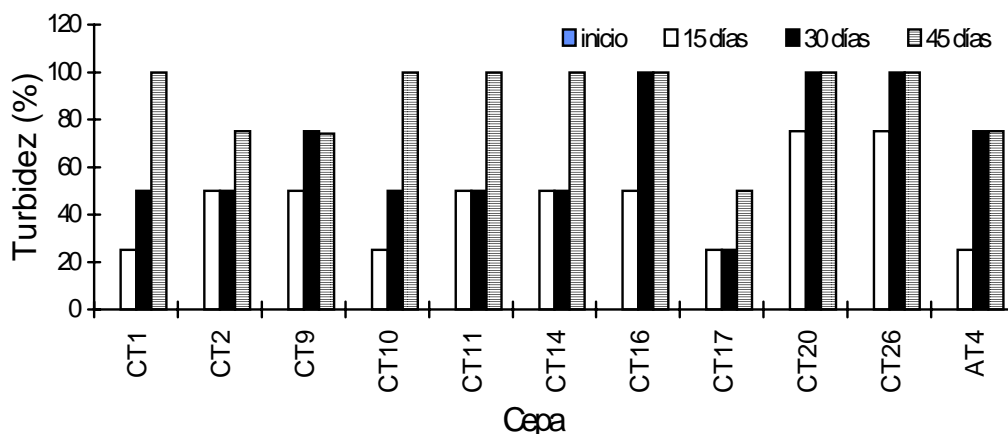


Figura 2. Crecimiento de bacterias fijadoras de N en sustrato inorgánico contaminado con petróleo 1% (segunda fase). A = pasto alemán, C = pasto cabezón, T = Tabasco.

Cuadro 2. Tiempo de generación de cinco cepas de bacterias en sustratos enriquecidos con petróleo y sin petróleo.

Tratamiento	Crecimiento inicial [†]	Crecimiento final [‡]	Tiempo de duración	Tiempo de generación
	----- UFC -----		----- h -----	
T ₁ (CT10 + Petróleo)	8.6 x 10 ³ c [§]	8960.6 x 10 ³ c	288	29
T ₂ (CT10 - Petróleo)	2.9 x 10 ³ d	3.0 x 10 ³ c	288	10 285
T ₃ (CT11 + Petróleo)	6.1 x 10 ³ c	270000 x 10 ³ bc	288	19
T ₄ (CT11 - Petróleo)	6.1 x 10 ³ c	6.8 x 10 ³ c	288	1926
T ₅ (CT14 + Petróleo)	8.6 x 10 ³ c	133.3 x 10 ³ c	288	74
T ₆ (CT14 - Petróleo)	8.3 x 10 ³ c	9.5 x 10 ³ c	288	1533
T ₇ (CT16 + Petróleo)	15.3 x 10 ³ a	1000000 x 10 ³ a	288	15
T ₈ (CT16 - Petróleo)	16.3 x 10 ³ a	21.3 x 10 ³ b	288	766
T ₉ (CT26 + Petróleo)	11.6 x 10 ³ b	943000 x 10 ³ b	288	21
T ₁₀ (CT26 - Petróleo)	11.6 x 10 ³ b	27 x 10 ³ c	288	244

[†] CV = 9.9; r² = 0.97 (P = 0.05). [‡] CV = 26.2; r² = 0.99 (P = 0.05).

[§] Letras diferentes indican medias de tratamientos con diferencias estadísticas (P = 0.05).

Las cepas CT16 y CT26, establecidas en medio mineral enriquecido con petróleo, presentaron durante los cuatro tiempos evaluados el mayor incremento de las UFC (Figura 3b); sin embargo, la cepa CT14 (Figura 3a) establecida en las mismas condiciones tuvo aumento en las UFC durante los cuatro tiempos evaluados y a 216 h disminuyó la cantidad de las UFC. También se observó que las cepas CT10 y CT11 fueron más lentas en el crecimiento, la población aumentó a partir de 144 h (Figura 3a). Asimismo, las cinco cepas de bacterias establecidas en medio de cultivo mineral, sin petróleo como fuente de carbono y energía, no experimentaron crecimiento, se mantuvieron en la fase de latencia (Figuras 3a y 3b). Por esta razón es que no hubo crecimiento y aparecen sobre la misma línea horizontal las cepas C10, C11 y C14 (Figura 3a) y las cepas CT16 y CT26 (Figura 3b).

La comparación estadística de las medias poblacionales de las cepas de bacterias en tres tiempos (inicial, seis y 12 días), destaca que en el tiempo inicial no existieron diferencias estadísticas significativas (P = 0.05), la población fue constante de 10³ UFC mL⁻¹; en cambio a seis días sucedieron diferencias estadísticas entre las medias de los tratamientos. La cepa CT16 tuvo 80x10⁷ UFC mL⁻¹, estadísticamente fue la mejor, el resto de las cepas aumentaron el número de UFC a 10⁴ hasta 10⁶ (Figura 4, letras mayúsculas en barras). Las cepas de bacterias a 12 días que tuvieron mayor significancia estadística fueron CT16 con 10x10⁹ UFC mL⁻¹, en segundo lugar CT26 con 94x10⁷ UFC mL⁻¹ y en tercer lugar la cepa CT11 con 12x10⁷ UFC mL⁻¹ (Figura 4, letras minúsculas en barras). El testigo tuvo una cinética de crecimiento constante en 10³, las cepas no se multiplicaron, esto se originó porque el sustrato

utilizado no se enriqueció con petróleo, que es la fuente de carbono.

Selección y Estabilización de Hongos en Petróleo

La selección y estabilización de 46 hongos aislados en medios de cultivo sólido enriquecido con 1% de petróleo Maya evidenció que 20 hongos (42%) se adaptaron a este sustrato. Los géneros más comunes fueron: *Trichoderma*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces*; algunos crecieron sobre el petróleo y formaron una red densa de hifas sobre la capa de petróleo y sobre el medio mineral. April *et al.* (2000) aislaron en medio mineral sólido, con petróleo como fuente de carbono, los hongos *Aspergillus niger*, *Gliocladium cf. catenulatum*, *Penicillium cf. janthinellum*, *Penicillium cf.* el más frecuente fue el género *Trichoderma*.

Los hongos puros evaluados en sustrato líquido con 1% de petróleo crecieron en esta fase de selección. La superficie impregnada con petróleo fue determinante para el crecimiento de hongos. Se encontró que a 20 días de establecido el experimento con 15 hongos, incluidos los géneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Paecilomyces*, cubrieron con micelio 100% de la superficie del sustrato sólido impregnado con petróleo. Asimismo, se identificó que algunos hongos crecieron en el interior de la fase líquida, otros hongos lograron 75% y 50% de cobertura del sustrato (Cuadro 3).

La respuesta de los hongos parece estar relacionada con las afirmaciones de Van Loosdricht *et al.* (1990), quienes reportaron que las superficies hidrofóbicas son las superficies más activas para la actividad microbiana, siguen una secuencia de cuatro

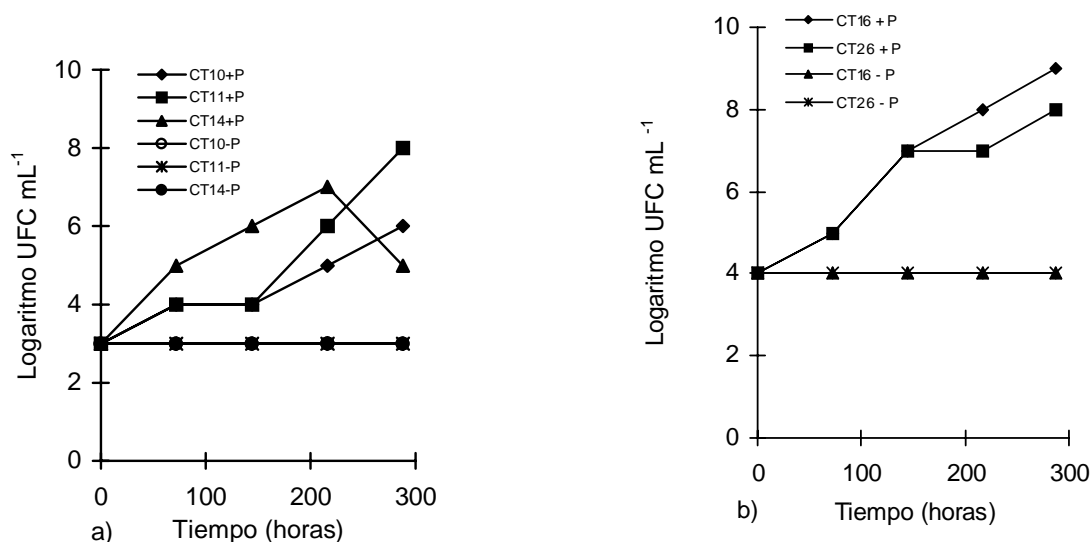


Figura 3. Cinética de crecimiento de cinco cepas de bacterias en medio de cultivo con petróleo y sin petróleo. C = Pasto cabezón; T = Tabasco; P = petróleo. Tiempo inicial. CV = 9.9; $r^2 = 0.97$ ($P = 0.05$). Tiempo seis días CV = 33.8; $r^2 = 0.98$ y tiempo de 12 días. CV = 26; $r^2 = 0.99$ ($P = 0.05$).

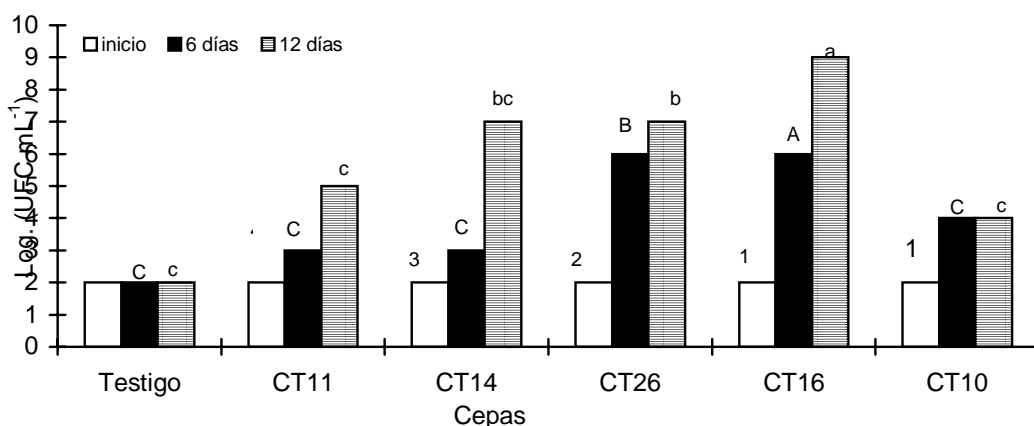


Figura 4. Comparación de crecimiento poblacional entre tratamientos en cada uno de los tres tiempos evaluados (fase tres). C = pasto cabezón; T = Tabasco. Medias de los tratamientos con diferentes números (inicio), letras mayúsculas (seis días) y minúsculas (12 días), tienen diferencias estadísticas ($P = 0.05$).

pasos para lograr establecerse: transporte de células a la superficie, adhesión inicial, fijación a través de polímeros y fibrillas; por último, la colonización.

La confirmación del crecimiento durante la fase en medio líquido permitió seleccionar de manera rigurosa los mejores hongos según la cinética logarítmica de crecimiento. El experimento para

confirmar el crecimiento en medio de cultivo líquido enriquecido con petróleo se realizó introduciendo el petróleo directamente al agua, se formó una interfase petróleo/agua a través de gotitas de petróleo. A nueve días de establecido el experimento, el micelio del hongo rodeó completamente la gota formando esferulas; conforme el tiempo aumentó, el hongo se

Cuadro 3. Crecimiento de hongos sobre sustrato de petróleo crudo y medio inorgánico líquido.

Hongo	Cantidad de micelio sobre petróleo crudo		
	0 días	10 días	20 días
	- - - - - % - - - - -		
CT1 (<i>Penicillium</i> sp.)	0 [†]	25	50
CT2 (<i>Paecilomyces</i> sp.)	0	50	75
CT3 (<i>Aspergillus</i> sp.)	0	50	50
CT4 (<i>Penicillium</i> sp.)	0	50	75
CT5 (<i>Aspergillus</i> sp.)	0	50	100
CT6 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	0	100
CT7 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	25	50
CT8 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	50	25
CT9 (No identificado)	0	25	25
CT10 (<i>Paecilomyces</i> sp.)	0	50	100
CT11 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	25	50
CT12 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	25	25
CT13 (<i>Penicillium</i> sp.)	0	0	50
CT14 (<i>Aspergillus</i> sp.)	0	25	50
AT1 (<i>Trichoderma</i> sp.)	0	25	75

[†] 0%, micelio escaso que cubre el sustrato; 25%, cantidad de micelio que cubre la cuarta parte del sustrato; 50%, cantidad de micelio que cubre la mitad del sustrato; 75 a 100%, micelio abundante que cubre el sustrato y el micelio tiende a dispersarse en el medio de cultivo.

extendió en la fase líquida, posiblemente sobre la película fina de petróleo, que correspondió a la fase disuelta.

La población de hongos al tiempo inicial varió de 10^1 a 10^2 UFC (Figura 5, números en barras), a nueve días la población aumentó y tuvo diferencias estadísticas significativas entre las medias de los tratamientos. La especie *Trichoderma* 2 fue el hongo que tuvo mayor población con 44×10^3 UFC mL⁻¹ (Figura 5, barras con letras mayúsculas). El hongo

Trichoderma 1 de la rizósfera del pasto cabezón tuvo mayor crecimiento a 18 días, fue el mejor con 29×10^5 UFC mL⁻¹, la segunda población correspondió al hongo *Trichoderma* 2 con 22×10^4 UFC mL⁻¹, los hongos *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces* formaron poblaciones del orden de 10^4 UFC mL⁻¹. El tratamiento testigo formó población constante en la cinética de crecimiento, posiblemente porque este hongo desde que se aisló de la rizósfera del pasto cabezón se adaptó al medio mineral enriquecido con petróleo como fuente de carbono y energía. Resultados de April *et al.* (2000) reportaron que los hongos de los géneros *Penicillium* y *Aspergillus* son buenos degradadores de petróleo.

Estos hongos presentaron el mismo comportamiento que en la fase anterior, formaron esférulas alrededor del petróleo. La tendencia natural fue transportarse a una fase sólida, la adhesión y finalmente la multiplicación. La gota de petróleo fue el área de colonización inicial de los hongos. Al respecto, existen reportes que mencionan que la gota de petróleo insoluble en agua es el centro de oxidación de los hidrocarburos, empezando en este lugar la descomposición y dispersión de las gotitas (Madigan *et al.*, 1998).

Microorganismos Autóctonos con Potencial para Crecer en Petróleo

Durante las tres fases de selección, algunos hongos y bacterias autóctonos demostraron la capacidad de adaptación y de crecimiento en medios sólidos y líquidos enriquecidos con petróleo como

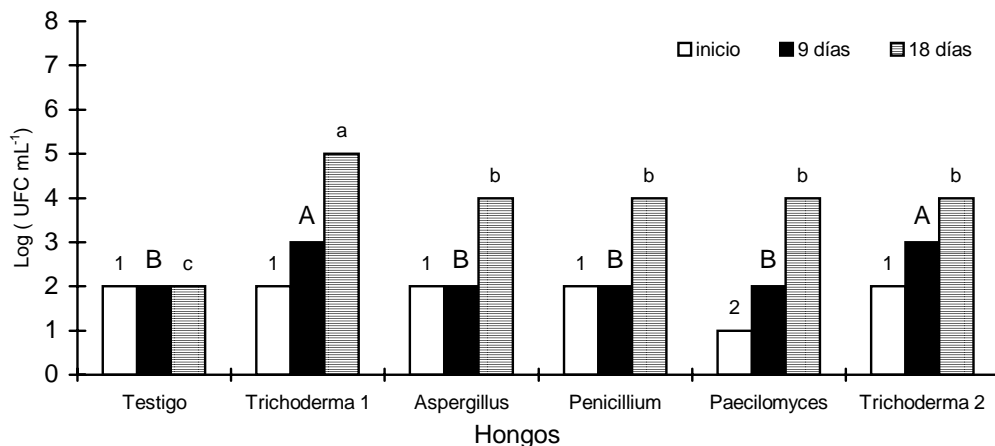


Figura 5. Crecimiento de hongos en medio inorgánico con petróleo crudo en tres tiempos. Medias de tratamientos con los mismos números (inicio), letras mayúsculas (nueve días) y minúsculas (18 días) tienen diferencias significativas ($P = 0.05$).

Cuadro 4. Microorganismos autóctonos que utilizan petróleo para su crecimiento.

Cepa	Población	Tiempo de generación
	UFC mL ⁻¹	h
Bacterias		
CT16	10 x 10 ⁹ a [†]	15
CT11	12 x 10 ⁷ bc	19
CT26	10 x 10 ⁹ a	21
Hongos		
<i>Trichoderma</i> sp 1	29 x 10 ⁵ a	44
<i>Trichoderma</i> sp 2	32 x 10 ⁴ b	55
<i>Aspergillus</i> sp	18 x 10 ⁴ b	65
<i>Penicillium</i> sp	24 x 10 ⁴ b	67
<i>Paecilomyces</i> sp	30 x 10 ³ c	52

[†] Medias con la misma letra en columna son estadísticamente iguales (P = 0.05). La comparación de medias se realizó dentro de bacterias y dentro de hongos.

fuelle de carbono y energía. Los microorganismos seleccionados con potencial para crecer en petróleo fueron ocho: tres colonias de bacterias: CT11, CT26 y CT16, y cinco especies de hongos: *Trichoderma* 1, *Trichoderma* 2, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Paecilomyces* (Cuadro 4).

Estos microorganismos posiblemente son oxidadores de hidrocarburos y deben poseer en la membrana un grupo específico de oxigenasa, asociado con la producción de agentes de superficie que son compuestos que tienen una fracción hidrofílica y una hidrofóbica, propiedad que reduce la tensión superficial del medio acuoso por lo que los hidrocarburos aumentan su solubilidad (Rosenberg y Ron, 1998).

CONCLUSIONES

- Las poblaciones microbianas rizosféricas del pasto alemán se afectaron por el petróleo acumulado en el suelo. La población de hongos totales disminuyó hasta 575 veces, también disminuyeron las poblaciones de bacterias fijadoras de N y de bacterias totales. Se encontraron en el suelo contaminado con petróleo poblaciones grandes de bacterias asimiladoras y fijadoras de N.

- La dinámica de los microorganismos rizosféricos del pasto cabezón, establecidos en Gleysol histi-eutri-sódico (abruptico), tuvo cambios importantes. La disminución drástica se encontró en las poblaciones de bacterias asimiladoras que se redujeron 654 veces. Las poblaciones de hongos fueron mayores hasta nueve veces en el Gleysol histi-eutri-sódico muy

contaminado con petróleo que en Gleysol histi-orthiéutrico no contaminado.

- La selección realizada en tres fases sucesivas en medios sólidos y líquidos permitió la selección de tres colonias de bacterias a partir de 34 colonias aisladas; y cinco hongos de 46 aislados. Los microorganismos autóctonos de regiones petroleras fueron sensibles a las tres fases de evaluación y selección en medios sólidos y líquidos enriquecidos con 1% de petróleo Maya.

- Tres colonias de bacterias y cinco de hongos (dos *Trichoderma*, un *Aspergillus*, un *Penicillium* y un *Paecilomyces*) tuvieron capacidad de adaptación y crecimiento en cultivo puro con petróleo como fuente de carbono y energía. La mayoría se aisló de la rizósfera del pasto cabezón establecido en Gleysol histi-eutri-sódico fuertemente contaminado desde 1963.

- Las tres bacterias y los cinco hongos seleccionados poseen potencial de degradación si se les integra en consorcios para pasarlos a la etapa de invernadero e introducirlos en sistemas rizosféricos y en suelo nativo de regiones petroleras de donde son originarios.

- Los ocho microorganismos seleccionados son considerados aptos para utilizarlos en pruebas de invernadero que permitan generar tecnologías de biorremediación y fitorremediación para zonas petroleras impactadas.

AGRADECIMIENTOS

El primer autor agradece al CONACYT y al IMP por las becas otorgadas para realizar los estudios de postgrado. Este trabajo formó parte del Proyecto FIES 97-09-VI del Instituto Mexicano del Petróleo.

LITERATURA CITADA

- April, T.M., J.M. Foght y R.S. Currah. 2000. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can. J. Microbiol.* 46: 38-49.
- Atlas, M.R. y R. Bartha. 1981. *Microbial ecology: Fundamentals and applications*. Addison-Wesley. Menlo Park, CA.
- Atlas, M.R., A. Horowitz, M. Krichevsky y K.A. Bej. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiol. Ecol.* 22: 249-256.
- Boulding, J.R. 1994. *Description and sampling of contaminated soils. A field guide*. 2nd ed. Lewis Publishers. Boca Raton, FL.
- Bury, J.S. y C.A. Miller. 1993. Effect of micellar solubilization on biodegradation rate of hydrocarbons. *Environ. Sci. Technol.* 27: 104-110.

- Campbell, H.D., S.G. Justine, E.C. Natalie y H.S. Peite. 1970. Methods in immunology. Benjamin. New York.
- Duncan, K., E. Levetin, P. Buck, H. Wells, E. Jennings, S. Hettenbach, S. Bailey, K. Lawlor, K. Sublette, J.B. Fisher y T. Todd. 1995. Long-term effects of crude oil contamination and bioremediation in soil ecosystem. Tulsa, OK.
- Ingraham, L.J. y A.C. Ingraham. 1998. Introducción a la microbiología. Vol. 1. Trad. al español por J.J. Nieto, E. Quesada y A. Ventosa. Reverté. Barcelona, España.
- Johnson, F.L. y A.E. Curl. 1972. Methods for research and the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess. Minneapolis, MN.
- Leahy, J.G. y R.R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. Microbiol. Rev. 54: 305-315.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 1998. Brock. Biología de los microorganismos. 8a. ed. rev. y aum. Trad. al español por M. Gacto F., I. García A., T. González V., R. Guerrero M. y M. Sánchez P. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.
- Pelczar, M.J. y R.D. Reid. 1980. Microbiología. Trad. al español por L. Hontañón y C. McGraw-Hill. México, DF.
- Posten, C.H. y C.L. Cooney. 1993. Growth of microorganisms. pp. 111-162. In: H. Sahm (ed.). Biotechnology. Vol. 1. Biological fundamentals. 2nd ed. VCH. Weinheim, Federal Republic Germany.
- Radwan, S., N. Sorkhoh e I. El-Nemr. 1995. Oil biodegradation around roots. Nature (London) 376: 302.
- Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Can. J. Microbiol. 27: 8-14.
- Rivera, C.M. del C. 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el benzo(a)pireno. Tesis de Doctorado. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México.
- Rosenberg, E., R. Legmann, A. Kushmao R. Taube, E. Adler y E.Z. Ron. 1992. Petroleum bioremediation- a multiphase problem. Biodegradation 3: 337-350.
- Rosenberg, E. y E.Z. Ron. 1998. Bioremediation of petroleum contamination. pp. 100-124. In: R.L. Crawford y D.L. Crawford (eds.). Bioremediation: Principles and applications. Cambridge University Press. Cambridge, UK.
- SAS Institute Inc. 1989. SAS/IML* Software: Usage and Reference, version 6, 1st ed. SAS Institute Inc. Cary, NC.
- Sugiura, K., M. Ishihara, T. Shimauchi y S. Harayama. 1997. Physicochemical properties and biodegradability of crude oil. Environ. Sci. Technol. 31: 45-51.
- Van Loosdrecht, M.C.M., J. Lyklema, W. Norde y A.J.B. Zehnder. 1990. Influence of interfaces on microbial activity. Microbiol. Rev. 54: 75-87.