

MICROBIOTA DE LA RIZOSFERA Y RIZOPLANO DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS

(*Mycobiota from rhizosphere and rhizoplane in hydrocarbons polluted soils*)

M. N. Cabello*, A. M. Arambarri** & J. A. Chayle**.

*Instituto de Botánica Spegazzini, 53 N° 477, 1900 La Plata.

** CONICET.

Palabras claves: Rizósfera, rizoplano, hongos saprotrofos, contaminación, hidrocarburos.

Key words: Rhizosphere, rhizoplane, saprotrophic fungi, pollution, hydrocarbons.

RESUMEN

Se estudió la micobiota saprótrofa de suelo rizosférico y de rizoplano, de plantas que crecen en áreas contaminadas con hidrocarburos y en áreas control. Se aislaron e identificaron 52 especies fúngicas, de las cuales 39 pertenecen a los *Deuteromycetes*, 3 a los *Ascomycetes*, 8 a los *Zygomycetes* (Orden *Mucorales*) y 2 son micelios estériles. Mediante el uso de métodos de ordenación, utilizándose el análisis de componentes principales, pudo diferenciarse las muestras obtenidas de áreas contaminadas de las no contaminadas. A pesar que las especies son las mismas en ambas áreas, sus frecuencias relativas permiten una discriminación de los muestreos.

INTRODUCCION

Los hongos son, probablemente, tan importantes como las bacterias para la recuperación de ambientes terrestres contaminados. Por tratarse de organismos heterótrofos, descomponen la materia orgánica compleja hasta azúcares simples. Son también capaces de degradar un amplio rango de productos contaminantes diversos, de preferencia, compuestos similares a los producidos naturalmente. Es por este motivo que actualmente se están intensificando los estudios que utilizan a estos microorganismos como descomponedores y detoxificadores de los contaminantes químicos del ambiente. Esto representa uno de los mecanismos posibles en la eliminación de hidrocarburos cuando contaminan los suelos. Sin embargo estos compuestos xenobióticos, en la mayoría de los casos, no sustentan el crecimiento miceliar, pero son transformados en presencia de un sustrato más adecuado como fuente de carbono y energía; bajo condiciones co-metabólicas, la

SUMMARY

The saprophytic microbiota isolated from rhizosphere and rhizoplane of plant which grow in hydrocarbon polluted and non polluted soils was studied.

Fifty two species were isolated and identified, 39 belong to *Deuteromycetes*, 3 to *Ascomycetes*, 8 to *Zygomycetes* (Order *Mucorales*) and 2 are sterile mycelia.

The principal components analysis was used as ordination method. With this analysis, samples from polluted areas can be distinguished from non polluted ones. Despite the fungi species are the same in both areas, the relative frequency allow discriminate between both kind of soil.

degradación fúngica es más una transformación que un proceso real de catabolismo. En el suelo estas sustancias co-metabólicas podrían provenir de los exudados de las raíces de las plantas; las cuales proveen microhabitat donde proliferan los microorganismos del suelo, los cuales son estimulados por células muertas, fragmentos de tejidos, secreciones, azúcares simples, aminoácidos u otros carbohidratos complejos liberados por las raíces, por lo cual el suelo es enriquecido por la presencia del vegetal. A esta región del suelo se la define como rizosfera (Bowen, 1980; Foster & Bowen, 1982) y el incremento en la actividad microbiana se denomina "efecto rizosfera"; siendo el rizoplano la región que está ubicada inmediatamente sobre la superficie de la raíz (Foster & Bowen, 1982), donde la actividad microbiana es más intensa que en el suelo circundante. Actualmente se está dando mucha importancia a las interacciones microorganismos-plantas en la estimulación de los procesos de degradación in situ. La vegetación posee un papel

preponderante en la biorremediación de suelos contaminados ya que: 1) mejora las propiedades físicas y químicas del suelo, 2) incrementa la actividad microbiana y el contacto entre microorganismos asociados a las raíces y los compuestos tóxicos del suelo contaminado (Aprill & Sims, 1990).

Walton & Anderson (1990), proponen que el ambiente de rizosfera-rizoplano funcionaría mejorando la degradación de compuestos tóxicos en el suelo gracias a la incrementación de la actividad de los microorganismos.

El objetivo de este trabajo es conocer la micobiota saprotrofa asociada a raíces de plantas (rizoplano) y suelo circundante (rizosfera) y comparar aquella de suelos contaminados con la de suelos no contaminados.

MATERIALES Y METODOS

El estudio se realizó en suelos contaminados con hidrocarburos en proximidades de un tanque de almacenamiento de crudo de la Destilería YPF de La Plata. La cobertura vegetal está formada básicamente por gramíneas de las cuales las muestreadas en este ensayo corresponden a la especie *Cynodon dactylon* (L.) Pers.

El contenido de crudo en el suelo puede llegar en algunos casos hasta el 50% del peso del suelo seco, con 20% de hidrocarburos alifáticos (C12 a C34) y aromáticos, entre los cuales los más abundantes son el fenantreno (857,46 mg/kg) y el criseno (517 mg/kg de suelo).

Mensualmente, durante un año (septiembre de 1993 a agosto de 1994), se tomaron muestras de plantas que crecen en este suelo, con el sistema radicular completo y el suelo adherido a él. Como área testigo (también 12 muestras), se utilizaron suelos de zonas cercanas al tanque que no presentaban contaminación.

El material se recolectó en bolsas de polietileno estériles procesándose en el mismo día del muestreo.

Para el estudio de la micobiota del suelo rizosférico, las raíces fueron cuidadosamente separadas y el suelo fue lavado utilizando la técnica descrita por Parkinson y Williams (1961). Se seleccionaron raíces vitales y se las cortó en segmentos de 5 mm. Estos segmentos fueron lavados con repetidos cambios de agua destilada esterilizada. Las partículas de suelo y los segmentos de raíces fueron secadas a temperatura ambiente durante 24 hs. en placas de Petri con papel de filtro estéril y sembradas en agar malta glucosado (Hawksworth et al., 1995), agregándose una solución de antibióticos (sulfato de estreptomycinina al 0,5% y cloranfenicol al 0,25%).

Las placas se incubaron durante 7-14 días a 25°C; dentro de este lapso fueron observadas diariamente, procediéndose al aislamiento e identificación de los hongos presentes, con lo cual se obtuvieron las frecuencias

relativas de aparición de las diferentes especies (Godeas, 1983), según la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Frecuencia} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de partículas en que aparece una especie}}{\text{N}^\circ \text{ total de partículas sembradas por muestra}} \times 100$$

Los datos fueron analizados mediante técnicas de ordenación para determinar el patrón de relaciones entre la totalidad de los muestreos. Estas relaciones están reflejadas en la posición de las muestras en el espacio (Crisci & López Armengol, 1983). Como técnica de ordenación se utilizó el Análisis de Componentes Principales.

Las especies y sus frecuencias fueron tabuladas en una matriz básica de datos la cual fue estandarizada. La matriz de similitud se obtuvo utilizando el coeficiente de correlación de Pearson. Este coeficiente fue introducido a las técnicas numéricas por Michener & Sokal (1957).

Los programas de computación utilizados han sido los del NT-SYS (NTSYS-PC Versión 1.40 (C) 1988, Applied BioStatistics Inc.)

RESULTADOS Y DISCUSION

Las partículas de suelo rizosférico y los segmentos de raíces fueron colonizados entre un 98 a un 100% en ambas áreas. Cabello & Arambarri (1993), encontraron que en suelos agrícolas sin vegetación (edafosfera), contaminados con hidrocarburos, las partículas presentaron un máximo de 43% de colonización. Esto confirma el efecto beneficioso de las plantas para la proliferación de microorganismos en el suelo, tal como fue sugerido por Walton y Anderson (1990). A su vez, los hongos saprotrofos, pueden mejorar las condiciones del área donde crece la raíz, en primer lugar por incrementar la disponibilidad de nutrientes para la planta y por detoxificación de la zona de enraizamiento.

En la tabla 1 se muestra la lista de especies y su presencia en suelo rizosférico y rizoplano en áreas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos y las especies que contribuyen a la diferenciación entre áreas en periodos estacionales. De las 52 especies aisladas e identificadas 3 corresponden a *Ascomycetes*, 39 a *Deuteromycetes*, 8 a *Zygomycetes* (Orden Mucorales) y 2 son micelios estériles, variando su aparición en suelo rizosférico y rizoplano y entre muestras de áreas contaminada y testigo.

Las especies aisladas e identificadas con sus frecuencias (%), de aparición en suelo rizosférico y rizoplano de ambas áreas se enumeraron en una tabla (no

Tabla 1. Presencia fúngica en rizósfera y rizoplano de áreas contaminadas y no contaminadas con hidrocarburos (Las especies que contribuyen a la diferenciación entre áreas se señalan con diferentes letras itálicas*)

Especies	Area testigo		Area contaminada	
	Rizósfera	Rizoplano	Rizósfera	Rizoplano
Ascomycetes				
1.- <i>Chaetomium globosum</i>			x	
2.- <i>Talaromyces helicus</i>		x		x
3.- <i>T. rotundus</i>	x		x	
Deuteromycetes				
4.- <i>Acremonium butyri</i>			x VO*	x O
5.- <i>Alternaria alternata</i>	x	x	x	x
6.- <i>Arthrinium phaeospermum</i>	x	x	x	x
7.- <i>Aspergillus flavus</i>	x VO	x PVO		
8.- <i>A. fumigatus</i>	x	x		
9.- <i>A. niger</i>	x POI	x VO	x VI	x
10.- <i>A. ochraceus</i>		x		
11.- <i>A. terreus</i>	x	x	x	x
12.- <i>Aureobasidium pullulans</i>		x	x	x
13.- <i>Bipolaris spicifera</i>	x PVI	x VI	x PI	x PVI
14.- <i>Cladosporium cladosporioides</i>	x	x	x	x
15.- <i>Cylindrocarpon didymum</i>	x	x		
16.- <i>C. obtusisporum</i>	x			
17.- <i>Doratomyces asperulus</i>				x
18.- <i>Drechslera fugax</i>				x
19.- <i>Epicoccum nigrum</i>	x	x		x
20.- <i>Exerohilum rostratum</i>				x
21.- <i>Fusarium avenaceum</i>				x
22.- <i>F. oxysporum</i>	x PVOI	x PVOI	x PVOI	x PVOI
23.- <i>F. semitectum</i>	x PVOI	x OI	x PO	x PVOI
24.- <i>F. solani</i>	x	x	x	x
25.- <i>Gliocladium roseum</i>	x	x	x	x
26.- <i>Gliomastix murorum</i>			x PVOI	x PVOI
27.- <i>Craphium putredinis</i>			x O	x PVO
28.- <i>Humicola fuscoatra</i>	x VO	x V	x PV	x V
29.- <i>Nigrospora sphaerica</i>	x	x	x	
30.- <i>Olpithrichum sp.</i>	x			
31.- <i>Paecilomyces lilacinus</i>	x		x	
32.- <i>Penicillium restrictum</i>	x V			
33.- <i>P. purpurogenum</i>				x
34.- <i>P. thomii</i>	x			x
35.- <i>Penicillium sp.</i>	x	x V	x V	x O
36.- <i>Phoma sp.</i>	x	x	x	x
37.- <i>Pithomyces chartarum</i>		x		
38.- <i>Scolecobasidium constrictum</i>			x	
39.- <i>Spegazzinia tessartha</i>			x	
40.- <i>Trichoderma harzianum</i>	x VOI	x PVOI	x I	x I
41.- <i>T. koningii</i>	x PVOI	x PVO	x PVOI	x PO
42.- <i>T. polysporum</i>	x			
Zygomycetes				
43.- <i>Absidia cylindrospora</i>	x PVOI	x PVOI	x	x P
44.- <i>Circinella lacrymispora</i>			x	
45.- <i>Cunninghamella elegans</i>	x	x		
46.- <i>Gongronella butieri</i>		x		
47.- <i>Mortierella vinacea</i>		x	x	
48.- <i>Mucor hiemalis</i>	x	x	x	x
49.- <i>M. mucedo</i>	x		x	
50.- <i>Zygorrhynchus moelleri</i>	x		x	
51.- <i>Micelio dematiáceo estéril</i>	x	x	x	x
52.- <i>Micelio hialino estéril</i>	x PV	x P	x V	x PV

*P=Primavera, V=Verano, O=Otoño, I=Invierno

Tabla 2. Análisis de los componentes principales

Componente principal	Especies caracterizantes	Valor de la contribución	% Variación	% Acumulación
I	23.- <i>Gliomastix murorum</i>	-0,64	24,42	24,42
	7.- <i>Aspergillus niger</i>	0,61		
	1.- <i>Absidia cylindrospora</i>	0,60		
	39.- <i>Trichoderma harzianum</i>	0,60		
	40.- <i>T. koningii</i>	0,56		
II	25.- <i>Humicola fuscoatra</i>	0,74	18,10	42,52
	27.- <i>Micelio hialino estéril</i>	0,65		
	32.- <i>Penicillium restrictum</i>	0,60		
	35.- <i>Penicillium sp.</i>	0,58		
	5.- <i>Aspergillus flavus</i>	0,52		
III	20.- <i>Fusarium semitectum</i>	0,72	15,70	58,23
	19.- <i>F. oxysporum</i>	-0,70		
	24.- <i>Graphium putredinis</i>	0,52		
	2.- <i>Acremonium butyri</i>	0,51		
	11.- <i>Bipolaris spicifera</i>	0,46		

incluida en el texto), donde aquellas que aparecieron en un sólo muestreo y con frecuencias menores de 1 no fueron registradas. Los cálculos de los valores fueron el promedio de 3 muestreos mensuales según el siguiente esquema: septiembre, octubre y noviembre para primavera; diciembre enero y febrero para verano; abril y mayo para otoño y Junio, julio y agosto para invierno.

Esta tabla se utilizó como matriz básica de datos, a partir de la cual se efectuó el Análisis de Componentes Principales. Los 3 primeros componentes explican el 58,23% de la variación entre muestreos con respecto a las especies que los integran y sus frecuencias. En la figura 1 y 2 se muestran los gráficos bidimensionales con la proyección de los diferentes muestreos en los tres primeros componentes (I, II) y (I, III). En la tabla 2 pueden observarse los cinco mayores valores de la contribución de las especies a cada componente, el porcentaje de la variación y el porcentaje acumulado por los diferente ejes.

El primer componente es un buen discriminante de los muestreos del área contaminada; estos muestreos se ubican en el extremo negativo del eje y están caracterizados por la presencia de *Gliomastix murorum* especie presente únicamente en los muestreos del área contaminada y *Absidia cylindrospora* presentes en muestras del área testigo a excepción de un 4% en rizoplano del área contaminada (muestreo de primavera). *Aspergillus niger*, *Trichoderma harzianum* y *T. koningii*, estuvieron presentes en ambas áreas, pero con mayores frecuencias en la testigo.

Los muestreos de suelo rizosférico contaminado de invierno y primavera están más cercanos a los muestreos del área testigo en la zona positiva del eje I; ésto se debe

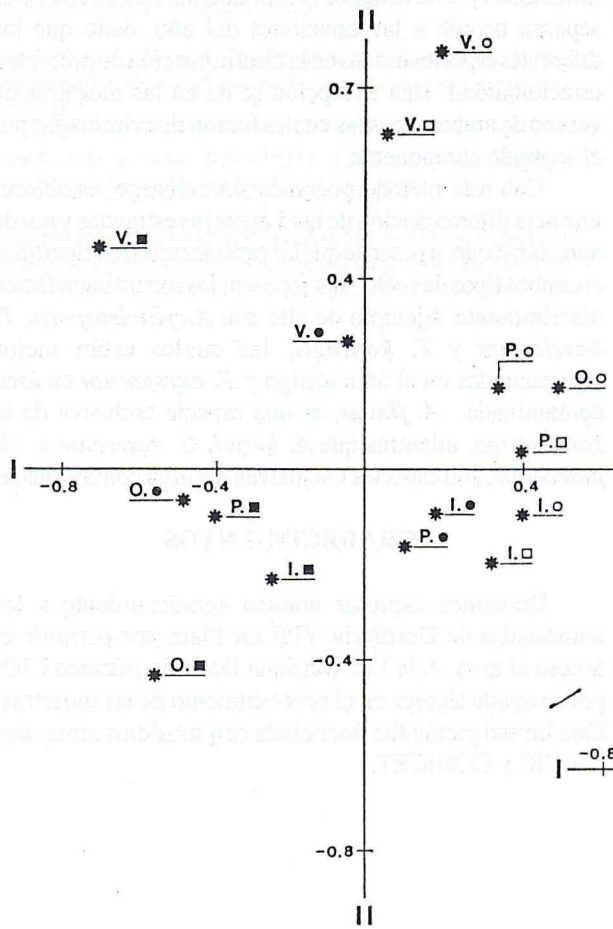
a la presencia de *Mucor hiemalis*, *T. harzianum* y *T. koningii* en suelo rizosférico contaminado, con frecuencias semejantes a las encontradas en el área testigo en otras estaciones del año. En el segundo componente los muestreos de verano de ambas áreas aparecen dispersos y junto al muestreo de primavera del área testigo y al de suelo rizosférico de otoño, se ubican en el extremo positivo del eje.

Las especies que han contribuido a la separación de los muestreos de verano son: *Humicola fuscoatra* en área testigo como contaminada y en suelo rizosférico y rizoplano en verano y suelo rizosférico en primavera-otoño del área testigo; el micelio dematiáceo estéril en primavera-verano, pero con mayores frecuencias en verano; *Penicillium restrictum* sólo en suelo rizosférico en verano; *Penicillium sp.* en primavera-verano en ambas áreas, con frecuencias mayores en el área testigo en primavera y *Aspergillus flavus* presente sólo en área testigo en rizoplano en primavera y suelo rizosférico-rizoplano en verano-otoño.

El eje III separa los muestreos de suelo rizosférico y de rizoplano del área contaminada a excepción de los muestreos del suelo rizosférico del área contaminada en primavera y agrupa a todos los muestreos del área testigo con éste último del área contaminada.

Las especies que más contribuyen a esta separación son *Fusarium oxysporum* y *F. semitectum*. La primera de las especies está presente en todos los muestreos y la segunda esta ausente en suelo rizosférico del área testigo en primavera, el rizoplano del área testigo y suelo rizosférico del área contaminada en verano y suelo rizosférico del área contaminada en invierno. *F. oxysporum* presenta sus frecuencias más altas en el área contaminada. *Graphium*

Figura 1. Análisis de los componentes principales. Gráficos bidimensionales con la proyección de las muestras en los componentes(I yII).

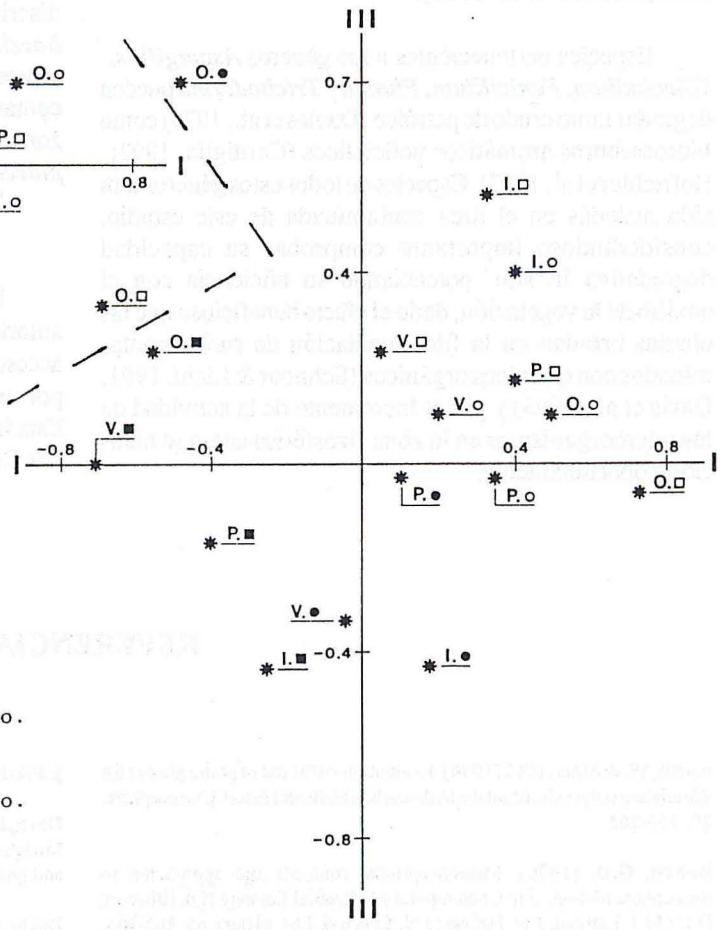


- O Suelo rizosférico testigo.
- Suelo rizosférico contaminado.
- Rizoplano de area testigo.
- Rizoplano de area contaminado.
- O Otoño
- I Invierno
- P Primavera
- V Verano

putredinis apareció exclusivamente en el área contaminada con frecuencias altas en rizoplano en el muestreo de primavera (10%) y suelo rizosférico de otoño (44%). *Acremonium butyri* en área contaminada en verano-otoño y *Bipolaris spicifera* presente en ambas áreas, pero con frecuencias más altas en los muestreos del área testigo en invierno (suelo rizosférico 22% y rizoplano 26,25%).

Especies tales como: *A.butyri*, *G.murorum* y

Figura 2. Análisis de los componentes principales. Gráficos bidimensionales con la proyección de las muestras en los componentes(I yIII).



Graphium putredinis, estuvieron presentes exclusivamente en suelos contaminados, mientras que *A.flavus* y *P.restrictum* lo estuvieron en suelo testigo. *Absidia cylindrospora*, *T.harzianum* y *T.koningii*, a pesar de encontrarse en ambas áreas, sus frecuencias son mayores en la testigo. Lo contrario sucede con *F.oxysporum* (Tabla 1.).

Especies aisladas en áreas contaminadas como son

A. terreus, *F. solani* y *T. harzianum* (Tabla 1.), demostraron ser capaces de degradar hidrocarburos alifáticos y aromáticos en condiciones de laboratorio (Colombo et al. en prensa). Oudot et al. (1993), encontraron que *G. putredinis* es capaz de degradar hidrocarburos saturados, aromáticos, resinas y además asfaltenos. Esta especie fue aislada únicamente en el área contaminada de la destilería.

Diversos miembros del Orden *Mucorales*, tales como (*Absidia* sp. *Mucor hiemalis*, aisladas en áreas contaminadas), son capaces de degradar cadenas largas de hidrocarburos n-alcanos (Hoffmann & Rehm, 1976), como también hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cerniglia, 1992; Holland et al. 1986).

Especies pertenecientes a los géneros *Aspergillus*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Phoma* y *Trichoderma* pueden degradar tanto crudo de petróleo (Davies et al., 1979) como hidrocarburos aromáticos policíclicos (Cerniglia, 1992; Hofrichter et al. 1993). Especies de todos estos géneros han sido aisladas en el área contaminada de este estudio, considerándose importante comprobar su capacidad degradativa in situ, potenciando su eficiencia con el auxilio de la vegetación, dado el efecto beneficioso que las plantas brindan en la fitoremediación de suelos contaminados con químicos orgánicos (Schnoor & Licht, 1991, Davis et al., 1993) y por el incremento de la actividad de los microorganismos en la zona rizosférica como se mencionó oportunamente.

CONCLUSIONES

El método de análisis de componentes principales, utilizados en este estudio, revela que los muestreos no se separan acorde a las estaciones del año, dado que las diferentes especies usadas en la discriminación no presentan estacionalidad. Una excepción se da en las muestras de verano de ambas áreas las cuales fueron discriminadas por el segundo componente.

Con este método podemos sin embargo, establecer una neta diferenciación de las 2 áreas investigadas y puede apreciarse que, a pesar de que las especies están compartidas en ambos tipos de suelo, sus frecuencias son un buen factor discriminante. Ejemplo de ello son *A. cylindrospora*, *T. harzianum* y *T. koningii*, las cuales están mejor representadas en el área testigo y *F. oxysporum* en área contaminada. *A. flavus*, es una especie exclusiva de la zona testigo, mientras que *A. butyri*, *G. murorum* y *G. putredinis*, son especies exclusivas del área contaminada.

AGRADECIMIENTOS

Deseamos expresar nuestro agradecimiento a las autoridades de Destilería YPF La Plata por permitir el acceso al área. A la Lic. Mariana Dabadie (técnico CIC) por su ayuda técnica en el procesamiento de las muestras. Esta investigación fue financiada con subsidios otorgados por CIC y CONICET.

REFERENCIAS

- Aprill, W. & Sims, R.C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20: 253-265
- Bowen, G.D. (1980). Misconceptions, concepts and approaches in rhizosphere biology. En: *Contemporary Microbial Ecology* (Ed. Ellwood, D.C.; M.J. Latham; J.N. Hedger; J.N. Lynch & J.M. Slater), pp. 283-304. Academic Press, London.
- Cabello, M.N. & Arambarri, A.M. (1993). Efecto de la contaminación con hidrocarburos sobre geohongos saprotrofos. *Boletín Micológico*, 8: 55-60
- Cerniglia, C.E. (1992). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biodegradation* 3: 351-368
- Colombo, J.C.; Cabello, M.N. & Arambarri, A.M.. Biodegradation of aliphatic and aromatic hydrocarbons by natural soil microflora and pure cultures of imperfect and lignolytic fungi. *Environm. Pollution*. (en prensa)
- Crisci, J.V. & Lopez Armengol, M.F. (1983). Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. Monograf. ser. biología 26. OEA.
- Davis, L.C.; Erickson, L.E.; Lee, E.; Shimp, J.F. & Tracy, J.C. (1993). Modeling the effects of plants on the bioremediation of contaminated soil and ground water. *Environ. Prog.* 12:67-75
- Davis, J.S & Westlake, D.W.S (1979). Crude oil utilization by fungi. *Can. J. Microbiol.* 25: 146-156.
- Foster, R.C. & Bowen, G.D. (1982). Plant surfaces and bacterial growth: the rhizosphere and rizoplane. En: *Phytopathogenic prokaryotes*, Vol. 1. (Ed. Mount, R. & C. Lacey), pp. 159-185. Academic Press, New York.
- Godeas, A.M. (1983). Estudios cuali-cuantitativos de los hongos del suelo de *Nothofagus dombeyi*. *Ciencia del suelo* 1: 21-31
- Hawthornth, D.L.; Kirk, P.M.; Sutton, B.C. & Pegler, D.N. (1995). *Ainsworth & Bisby's Dictionary of the fungi*. 8a edición. International Mycological Institute. CAB INTERNATIONAL.
- Hoffman, B. & Rehm, H.J. (1976). Degradation of long chain n-

Alkanes by *Mucorales* II. Extracellular oxidation products and degradation pathways. European J. Appl. Microbiol. 3: 31-41

Hofrichter, M.; Gunther, T. & Fritsche, W. (1993). Metabolism of phenol, chloro and nitrophenols by the *Penicillium* strain Bi 7/2 isolated from contaminated soil. Biodegradation 3: 415-421

Holland, H.L.; Khan, S.H.; Richards, D. & Riemland, E. (1986). Biotransformation of polycyclic aromatic compounds by fungi. Xenobiotica 16: 733-741

Michener, C.D. & Sokal, R.R. (1957). A quantitative approach to a problem in classification. Evolution. Lancaster, 11: 130

Oudot, J.; Dupont, J.; Haloui, S & Roquebert, M.F. (1993). Biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating tropical fungi. Soil Biol. Biochem. 25: 1167-1173

Parkinson, D & Williams, S.T. (1961). A method for isolating fungi from soil microhabitats. Plant and Soil 13: 347-355

Schnoor, J.L. & Licht, L.A. (1991). Vegetative buffers for agroecosystems improvement, hazardous waste remediation, and biomass production. Conference on hazardous waste research, Kansas State University Manhattan, KS.

Walton, B.T. & Anderson, T.A. (1990). Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. Appl. Environm. Microbiol. 56:1012-1016