



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN
INGENIERÍA

FACULTAD DE INGENIERÍA

FITO-REMEDIACIÓN ASISTIDA POR
BPCV DE UN SUELO CONTAMINADO
POR DIESEL Y EVALUACIÓN DE SU
TOXICIDAD POST-TRATAMIENTO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN INGENIERÍA

INGENIERÍA AMBIENTAL

P R E S E N T A :

ING. HOLDAYARA EMILIA HERNÁNDEZ REYES

TUTOR:

DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO



2010

JURADO ASIGNADO

Cargo

Presidente
Secretario
Vocal
Primer suplente
Segundo suplente

Nombre

Dr. Pedro Martínez Pereda
Dra. Rosario Iturbe Argüelles
Dr. Víctor Manuel Luna Pabello
Dra. Susana Saval Bohórquez
M. en I. Ana Elisa Silva Martínez

Lugar donde se realizó el trabajo de investigación

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, Distrito Federal, México.

Director de tesis:

Dr. Víctor Manuel Luna Pabello

Sustentante:

Ing. Holdayara Emilia Hernández Reyes

RECONOCIMENTOS

Esta tesis fue realizada con la beca recibida durante la realización de mis estudios de maestría por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

Además, se reconoce el apoyo económico otorgado por los proyectos PAPIIT IN-107209, DGAPA-UNAM-PAPIME PE-205706 y PAIP FQ-VMLP-619014-2009, 2010.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco:

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello quien siempre creyó en mí y conté con su apoyo desde el inicio de este proyecto en mi vida.

A mi comité tutorial: a la Dra. Rosario Iturbe, a la M. en I. Ana Elisa Silva y al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello (Tutor principal), por apoyarme con su guía para la realización de la Tesis.

A la M. C. Guadalupe Tzuzuki Reyes y al M.C. Luciano Hernández Gómez técnicos académicos del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM por el apoyo técnico durante la etapa experimental.

Al Dr. Felipe Vázquez del Laboratorio de Físicoquímica del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM por el apoyo en el análisis de las muestras.

A la Dra. Lucy Mora Palomino del Laboratorio de Edafología Ambiental, del Instituto de Geología de la UNAM por el apoyo en el análisis de las muestras.

Al Dr. J. Abraham Díaz Rodríguez del Laboratorio de Mecánica de Suelos, de la Facultad de Ingeniería de la UNAM por la donación de material.

Al Q. A. Víctor Hugo Ríos Baza, Responsable de GC/MS del Laboratorio de Físicoquímica Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la U.N.A.M. por su apoyo técnico.

A la Q. F. B. Elvira Ríos Leal del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV y al Ing. Cirino Rojas Chávez.

A mis amigos Alma Santibáñez, Silvana Salazar, Andrés y Paulina Aguilar quienes me motivaron y apoyaron para entrar a la maestría.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM: Paty, Lyenete, Alma, Mabel, Vianney, Jacqueline, Manuel, Antonio, Héctor, Benjamín, Rafael, Sergio, Hugo, Lili, Ale, Anita, Zoila, Jacob, Carmen, Rosalba, Don Robert y Toli.

Dedicatoria

Que la hermosa tranquilidad en la que las almas de mi Madre y
mi Padre descansan

se vanaglorien de orgullo,

que el espíritu de mis abuelos se ensoberbezcan,

y que mi hermanita, a quien quiero tanto y que no ha dejado de
apoyarme,

se alegren

al saber que esta Tesis se las dedico con todo mi amor y

es el resultado a lo largo de los años de que

USTEDES CREYERAN EN MÍ...

CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| Abreviaturas y acrónimos..... | 8 |
| Glosario..... | 10 |
| Resumen | 12 |
| 1. Introducción..... | 13 |
| 2. Marco teórico | 15 |
| 2.1. Suelo..... | 15 |
| 2.2. Suelo artificial | 17 |
| 2.3. Fito-remediación..... | 18 |
| 2.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) | 20 |
| 2.4.1. Fitohormonas y su relación con las BPCV..... | 22 |
| 2.5. Hidrocarburos | 23 |
| 2.5.1. Medición de hidrocarburos..... | 25 |
| 2.6. Contaminación por hidrocarburos y su degradación | 26 |
| 2.7. Tratamiento de fito-remediación de hidrocarburos | 28 |
| 2.8. Toxicidad en suelos post-tratamiento | 30 |
| 3. Objetivos y estrategia de trabajo..... | 32 |
| 3.1. Objetivo general | 32 |
| 3.2. Objetivos particulares | 32 |
| 3.3. Estrategia de trabajo..... | 33 |
| 4. Metodología..... | 35 |
| 4.1. Etapa preliminar | 35 |
| 4.1.1. Conformación de suelo artificial | 35 |
| 4.1.2. Determinación de la variedad de semilla de trabajo para la fito-remediación | 38 |
| 4.2. Preparación para la obtención de la cepa de trabajo. | 42 |
| 4.3. Conformación de los sistemas de fito-remediación asistida..... | 42 |
| 4.4. Monitoreo de propiedades y de los factores de respuesta..... | 43 |
| 4.4.1. Análisis de datos experimentales..... | 43 |
| 4.5. Determinación de diesel como hidrocarburos fracción media | 43 |
| 4.6. Determinación de toxicidad aguda del suelo mediante bioensayos | 44 |
| 4.6.1. Análisis de datos para toxicidad aguda | 45 |
| 5. Resultados y discusión | 46 |

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 5.1. | Caracterización de suelo natural | 46 |
| 5.2. | Conformación de suelo artificial | 46 |
| 5.3. | Caracterización de suelo artificial | 48 |
| 5.4. | Prueba de viabilidad de semillas de plantas vasculares | 50 |
| 5.5. | Bioensayos de toxicidad | 51 |
| 5.6. | Selección de la cepa de trabajo | 53 |
| 5.6.1. | Cuenta de UFC en el inóculo | 53 |
| 5.6.2. | Cuenta de UFC adsorbida por la semilla..... | 54 |
| 5.7. | Montaje de las unidades experimentales | 55 |
| 5.8. | Monitoreo de las unidades experimentales..... | 59 |
| 5.8.1. | Porcentaje de sobrevivencia | 59 |
| 5.8.2. | Longitud de la raíz y del tallo | 60 |
| 5.8.3. | Concentración de hidrocarburos..... | 62 |
| 5.8.4. | Análisis estadístico de la concentración de hidrocarburos | 65 |
| 5.9. | Determinación de las remoción, eficiencia y velocidad de degradación | 66 |
| 5.10. | Determinación de toxicidad aguda post-tratamiento con semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) | 70 |
| 6. | <i>Conclusiones y recomendaciones</i> | 73 |
| | <i>ANEXO A: Resultados</i> | 75 |
| | A.1 Resultados de la cuenta UFC..... | 75 |
| | <i>Anexo B: Experimentación preliminar.....</i> | 77 |
| | B.1. Selección de la concentración de trabajo..... | 77 |
| | B.3. Determinación de la tolerancia y degradación de diesel por AZm1 | 79 |
| | <i>Anexo C: Resultados durante el monitoreo.....</i> | 81 |
| | Porcentaje de germinación y longitud radicular de las semillas de <i>Lactuca sativa</i> para prueba de toxicidad..... | 86 |
| | <i>Anexo D: Análisis estadísticos.....</i> | 88 |
| 7. | <i>Referencias bibliográficas</i> | 94 |

Índice de tablas

| | |
|---|----|
| Tabla 2.1. Ejemplos de BPCV fijadoras de nitrógeno. | 21 |
| Tabla 2.2. Límites máximos permisibles de hidrocarburos según la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. | 25 |
| Tabla 2.3. Límites máximos permisibles de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) según la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. | 25 |
| Tabla 4.1. Métodos para la determinación de propiedades para la caracterización del suelo natural y del suelo artificial..... | 36 |
| Tabla 4.2. Distribución de las unidades experimentales..... | 42 |
| Tabla 4.3. Identificación de los sistemas. | 44 |
| Tabla 5.1. Resultados de la caracterización del suelo natural de Tierra Blanca, Veracruz. | 46 |
| Tabla 5.2. Caracterización de la materia orgánica comercial..... | 47 |
| Tabla 5.3. Resultados de la caracterización inicial del suelo artificial..... | 49 |
| Tabla 5.4. Comparativo de las características del suelo natural y el suelo artificial. | 49 |
| Tabla 5.5. Resultados del porcentaje de germinación. | 50 |
| Tabla 5.6. Nomenclatura y distribución de las unidades experimentales (S- Suelo, Se – Semilla de RPT, D-Diesel, B –AZm1). | 56 |
| Tabla 5.7. Resumen de componentes para la preparación de suelo artificial en lotes en las unidades experimentales. | 56 |
| Tabla 5.8. Remoción de HFM, HA y HAP. | 66 |
| Tabla 5.9. Eficiencia de remoción de HFM, HA y HAP. | 68 |
| Tabla 5.10. Velocidad de degradación de HFM, HA y HAP..... | 70 |
| Tabla 8.1. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm1..... | 75 |
| Tabla 8.2. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm3..... | 75 |
| Tabla 8.3. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm5..... | 75 |
| Tabla 8.4. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm1 en ryegrass perene tetraploide..... | 76 |

| | |
|--|----|
| Tabla 8.5. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm3 en ryegrass perene tetraploide..... | 76 |
| Tabla 8.6. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm5 en ryegrass perene tetraploide..... | 76 |
| Tabla 9.1. Resultados de porcentaje de germinación a tres concentraciones de diesel utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente..... | 77 |
| Tabla 9.2. Resultados de porcentaje de germinación a tres concentraciones de diesel utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente..... | 78 |
| Tabla 9.3. Resultados de prueba de tolerancia y degradación de diesel con <i>Azospirillum</i> | 79 |
| Tabla 10.1. Resultados promedio del porcentaje de sobrevivencia durante la experimentación para una N de 25 unidades. | 81 |
| Tabla 10.2. Resultados promedio de longitud de raíz durante la experimentación para una N de 25 unidades..... | 82 |
| Tabla 10.3. Resultados promedio longitud de tallo durante la experimentación para una N de 25 unidades..... | 83 |
| Tabla 10.4. Resultados promedio de concentración de HFM. | 84 |
| Tabla 10.5. Resultados promedio de concentración de HA. | 84 |
| Tabla 10.6. Resultados promedio de concentración de HAP..... | 85 |
| Tabla 10.7. Resultados de longitud de raíz de los germinados de semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) para las concentraciones de 1, 10 y 100 por ciento. | 86 |

Índice de figuras

| | |
|---|----|
| Figura 2.1. a) Elemento de suelo en estado natural, b) Tres fases del elemento de suelo. | 15 |
| Figura 2.2. Triángulo textura (citado por Siebe <i>et al.</i> , 2006 de FAO, 1977)..... | 16 |
| Figura 3.1. Estrategia de trabajo para la obtención del suelo artificial. | 33 |
| Figura 3.2. Estrategia de trabajo para la selección de la semilla, la concentración de diesel y la cepa de BPCV. | 33 |
| Figura 3.3. Estrategia de trabajo. | 34 |
| Figura 5.1. Diagrama para la conformación de suelo artificial..... | 47 |
| Figura 5.2. Conformación del suelo artificial: a) colocación de los materiales secos (arena, limo, arcilla y materia orgánica), b) mezclado de los materiales, c) adición de agua destilada al suelo artificial para igualar humedad, d) mezclado de los materiales, e) almacenamiento del suelo conformado. | 48 |
| Figura 5.3. Vista de los mejores tres resultados en la prueba de germinación: | 51 |
| Figura 5.4. Concentración de diesel en suelo expresada en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ vs. porcentaje de mortandad de semillas (%). | 52 |
| Figura 5.5. <i>Azospirillum</i> en tinción de Gram. | 53 |
| Figura 5.6. Resumen de la cuenta de UFC de <i>Azospirillum liporefum</i> por mL. | 54 |
| Figura 5.7. Resumen de la cuenta de UFC de <i>Azospirillum lipoferum</i> por semilla..... | 55 |
| Figura 5.8. a) Pesado de suelo artificial preparado, b) colocación de semillas, y c) colocación de agrolita..... | 57 |
| Figura 5.9. a) Estandarización con nefelómetro, b) suspensión estandarizada a 20 UK, c) inoculación endógena, d) sembrado de semillas inoculadas, y e) inoculación exógeno. | 58 |
| Figura 5.10. a) colocación de bolsas oscuras para impedir el paso de la luz durante el periodo de germinación, b) colocación en el cuarto de incubación, y c) germinación de las semillas de RPT en unidades experimentales a una semana del montaje. | 58 |
| Figura 5.11. Porcentaje de sobrevivencia durante el monitoreo de las unidades experimentales. | 60 |

| | |
|---|----|
| Figura 5.12. Longitud de la raíz durante el monitoreo de las unidades experimentales. | 61 |
| Figura 5.13. Longitud de la tallo durante el monitoreo de las unidades experimentales. | 62 |
| Figura 5.14. Monitoreo de la concentración de HFM vs. tiempo. | 63 |
| Figura 5.15. Monitoreo de la concentración de HA vs. tiempo. | 64 |
| Figura 5.16. Monitoreo de la concentración de HAP vs. tiempo. | 65 |
| Figura 5.17. Eficiencia de remoción para HFM..... | 67 |
| Figura 5.18. Eficiencia de remoción para HA..... | 67 |
| Figura 5.19. Eficiencia de remoción para HAP. | 68 |
| Figura 5.20. Velocidades de degradación de HFM. | 69 |
| Figura 5.21. Velocidades de degradación de HA..... | 69 |
| Figura 5.22. Velocidades de degradación de HAP..... | 70 |
| Figura 5.23. Índice de germinación de semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) en el suelo de las unidades experimentales. | 72 |
| Figura 9.1. a) Sembrado en caja Petri para prueba de tolerancia y degradación y b) medios de cultivo en gelosa nutritiva, medios mineral y Nfb..... | 80 |
| Figura 10.1: Longitud de raíz para semillas de lechuga (<i>Lactuca sativa</i>) en el suelo de las unidades experimentales. | 87 |

Índice de ecuaciones

Ecuación 2.1. Modelo de degradación de un contaminante. 27

Ecuación 4.1. Expresión para determinar la densidad aparente. 36

Ecuación 4.2. Expresión para determinar la densidad real. 37

Ecuación 4.3. Expresión para determinar la porosidad. 37

Ecuación 4.4. Índice de germinación (Hamdia *et al.*, 2007). 45

Ecuación 5.1. Modelo lineal de porcentaje de mortandad en semillas en suelo
contaminado con diesel. 51

Ecuación 5.2. Concentración letal en semillas de RPT para suelo contaminado con
diesel. 52

Abreviaturas y acrónimos

| | |
|---------------------|---|
| AE – | Alfalfa española (<i>Medicago sativa</i>). |
| AN – | Atenuación natural. |
| ACC – | Ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico. |
| AZm1 – | <i>Azospirillum lipoferum</i> . |
| B – | Cepa de AZm1. |
| BPCV – | Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. |
| BTEX – | Benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (suma de isómeros). |
| BS – | Base seca. |
| CG – | Cromatografía de gases. |
| CL ₅₀ – | Concentración letal. |
| D – | Diesel. |
| DMSO – | Dimetil sulfóxido. |
| EPA – | Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (por sus siglas en inglés <i>U.S. Environmental Protection Agency</i>). |
| FT-IR – | Método de transformación de Fourier e infrarrojo. |
| HA | Hidrocarburos alifáticos. |
| HAP – | Hidrocarburos aromáticos polinucleares. |
| HFM – | Hidrocarburos fracción media. |
| IG – | Índice de germinación. |
| <i>L. perenne</i> – | <i>Lolium perenne</i> . |
| pH – | Potencial de iones hidrógeno. |
| RPT – | Ryegrass perene tetraploide (<i>Lolium perenne tetraploide</i>).TR – Trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>). |
| S – | Suelo. |

| | |
|------------|---|
| Se – | Semilla. |
| UK – | Unidades Klett. |
| UFC – | Unidades formadoras de colonias. |
| USEPA – | Agencia de Protección al Ambiente de los EE.UU. (US <i>Environmental Protection Agency</i>). |
| σ – | Desviación estándar. |

Glosario

| | |
|--|--|
| Atenuación natural - | Degradación de un contaminante por procesos fotolíticos, microbianos y/o volatilización. |
| Bioensayo - | Proceso experimental mediante el cual se determina las características y la fuerza de sustancias potencialmente tóxicas, desechos o metabolitos, a través del estudio de sus efectos sobre organismos seleccionados y en condiciones específicas de laboratorio. (Mata y Quevedo, 1998). |
| BPCV - | Bacterias promotoras del crecimiento vegetal, (del inglés <i>Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR</i>) – son las bacterias de vida libre del suelo, la rizosfera, el rizoplano, y la filósfera que a ciertas condiciones son benéficas para el desarrollo de las plantas. |
| Fito-remediación - | Es una técnica emergente que utiliza plantas para degradar, extraer, contener, o inmovilizar contaminantes en suelos o agua (USEPA, 2000). |
| Hidrocarburos alifáticos - | También llamados de cadena abierta o acíclicos, comprenden a los alcanos (parafinas) y alquenos (olefinas) lineales de cadena abierta tales como pentano, buteno, entre otros. |
| Hidrocarburos aromáticos policíclicos - | También llamados polinucleares son contaminantes orgánicos recalcitrantes y están compuestos por dos o más anillos bencénicos. |
| Hidrocarburos - | Mezcla líquida compleja formada por gases líquidos y sólido que contiene trazas de nitrógeno, oxígeno y azufre en mayor proporción y en menor proporción están el hierro, níquel, vanadio y otros metales (citado por Bustamante, 2007 en PEMEX, 1988). |

| | |
|--|---|
| Hidrocarburos fracción ligera - | Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales entre cinco y diez átomos de carbono (C ₅ a C ₁₀). |
| Hidrocarburos fracción media - | Mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales entre diez y veintiocho átomos de carbono (C ₁₀ a C ₂₈). |
| Hidrocarburos fracción pesada - | Mezcla de hidrocarburos cuyo peso molecular sea mayor a C ₁₈ . |
| Ryegrass - | (<i>Lolium perenne</i>) también llamado raigrás, es uno de los géneros de nueve especies euroasiáticas de hierbas anuales o perenes. |
| Suelo - | Material no consolidado compuesto por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire y organismos, que comprende desde la capa superior de la superficie terrestre hasta diferentes niveles de profundidad. |
| Suelo artificial - | Un medio de crecimiento conformado artificialmente cuyas características sean conocidas. |
| Textura del suelo - | La proporción relativa por tamaños de partículas de arena, limo y arcilla las cuales al combinarse generan las clases texturales. |

Resumen

La fito-remediación es una técnica de saneamiento de suelos contaminados con diesel que se puede optimizar combinándolo con otras técnicas, como el uso de **bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)**. Este trabajo de tesis compara ambas.

Se conformó un suelo (suelo artificial) con una densidad aparente y real mayor a $1.32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$, presentó una concentración de materia orgánica media (1.6 a 3.5%), con una baja concentración carbón total, nitrógeno (NTK) y fósforo disponible, es un suelo medianamente alcalino (con un pH de 7.4 a 8.5) con una textura franco arcillosa arenosa. Se trabajó a una concentración inicial de $10\ 522 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de diesel, aproximadamente 9 veces mayor que el límite máximo permisible (LMP) para fracción media ($1\ 200 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 para uso del suelo residencial y agrícola.

Se realizaron los tratamientos de fito-remediación con ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*, RPT) como técnica convencional y de fito-remediación con RPT asistida con una cepa de AZm1 (*Azospirillum lipoferum*) de BPCV, teniendo como testigo al proceso de atenuación natural (AN). En los tratamientos, se determinó: porcentaje de sobrevivencia, longitud radicular y de tallo, concentración de hidrocarburos: fracción media (HFM), alifáticos (HA) y aromáticos policíclicos (HAP).

La presencia de la AZm1 en la fito-remediación asistida incrementó el porcentaje de sobrevivencia mas no aumentó el desarrollo radicular ni del tallo, lo cual impide alcanzar mayores profundidades dentro de un eventual tratamiento en campo.

Para HFM e HA, se observó una mayor remoción mediante la fito-remediación con RPT asistida por AZm1; teniendo la AN con la menor remoción. A diferencia de la remoción HAP, en donde la fito-remediación convencional obtuvo una mayor remoción (20%) con respecto de la fito-remediación con RPT asistida (9 %) y sin remoción alguna para la AN.

Las velocidades de degradación de HFM fueron de 0.03 d^{-1} para la fito-remediación y la fito-remediación asistida; para HA fueron de 0.01 d^{-1} en ambos tratamientos; se presentó una velocidad de casi cero para HAP en los tratamientos y la AN.

Finalmente, en cada uno de los arreglos experimentales, se realizaron bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), para obtener información de la toxicidad aguda post-tratamiento utilizando el índice de germinación (IG). Los suelos, en la presencia de la AZm1 asociados con RPT, obtuvieron un mayor IG que incluso el testigo. Sin embargo, la sola presencia de la AZm1 en el suelo resultó fito-tóxico, a menos que se mezcle con más sustrato que permita reducir la concentración de la cepa.

1. Introducción

El suelo es un material sumamente complejo que por sus características biofísicoquímicas puede hacer que los contaminantes queden atrapados, transportados o se degradados dentro de él.

La contaminación del suelo es el resultado de accidentes tales como derrames durante la transportación de sustancias químicas, lixiviación desde un sitio de disposición o almacenamiento, o bien, por descargas de instalaciones industriales (Khan *et al.*, 2004). Algunos de estos contaminantes son los productos derivados de la refinación del petróleo como lo es el diesel, el cual es un combustible hidrocarburo destilado del petróleo (Martín *et al.*, 2004).

Por varios años, se han estudiado distintas técnicas para el tratamiento de suelos contaminados por hidrocarburos. Entre ellas destacan las remediaciones biológicas por ser técnicas efectivas, económicamente factibles y ambientalmente inocuas (Volke y Velasco, 2002). Entre estas técnicas se encuentra la fito-remediación. La fito-remediación es una técnica emergente que utiliza plantas para degradar, extraer, contener, o inmovilizar contaminantes en suelos o agua (USEPA, 2000).

Las plantas extraen del suelo componentes que necesitan, pueden ser nutrientes y/o contaminantes. Los hidrocarburos pueden entrar a la planta a través de las raíces o el follaje pues estos captan las fracciones volatilizadas en el aire (Fernet, 2008). Algunas plantas tienen el potencial de acumular grandes concentraciones de contaminantes en su biomasa. También existen plantas que degradan o procesan los contaminantes durante su desarrollo fisiológico. Estos procesos, han sido aprovechados como técnicas para la remediación de suelos, se conocen como: fito-extracción, fito-transformación, fito-estimulación, y fito-estabilización, entre otros. Un sitio contaminado en particular puede requerir de la combinación de distintos procedimientos para lograr una remediación óptima, según las condiciones existentes (Khan *et al.*, 2004).

Por otro lado, existen estudios que han demostrado la existencia de microorganismos benéficos para el suelo, que pueden promover el crecimiento de las plantas y en algunos casos también evitar la infección del tejido vegetal por patógenos. Estos microorganismos están asociados a las partículas del suelo e interactúan con las raíces de las plantas en la zona de la rizosfera, donde son capaces de ejercer un conjunto de interacciones producto de la competencia por nutrientes. Una de las razones principales para esa interacción es la liberación de compuestos orgánicos solubles por exudación de la raíz de la planta. Estos microorganismos, en general son utilizados como una técnica para la producción agrícola sustentable, asegurando un crecimiento sano de las especies vegetales. Una gran parte de estos microorganismos son

bacterias, que en general, son utilizadas para aumentar la tolerancia al estrés ambiental, a estas bacterias se les denominan como bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) (Bashan y de Bashan, 2005; y Camarillo, 2006).

Un estudio publicado en el 2008 mostró una relación de inóculos de bacterias que ayudaron a seis especies de pastos del oeste de Canadá. Éstos pastos fueron elegidos por su tolerancia a la presencia de hidrocarburos en el suelo (*Leymus angustus*, *Festuca rubra*, *Puccinellia nuttalliana*, *Lolium perenne*, *Pascopyrum smithii* y *Elymus trachycaulus*). Estos sistemas (planta-bacteria) incrementaban la fito-remediación de fenantreno. Los inóculos utilizados fueron: *Sphingomonas yanoikuyae*, *Rahnella aquatilis* y *Arthrobacter globiformis*, concluyendo que los sistemas de planta-bacteria incrementan la degradación del mencionado hidrocarburo (Fernet, 2008).

Este documento se avoca al estudio de la unión de ambas técnicas, es decir, la fito-remediación para degradar los contaminantes (en especial el diesel) que pueden ser convertidos en bióxido de carbono y agua, y la aplicación de BPCV con el fin de que éstas aumenten la tolerancia al estrés inducido y faciliten la fijación de nutrientes por la especie vegetal tales como nitrógeno y fósforo; lo cual se traducirá en el incremento de la velocidad de degradación del contaminante.

Para entender el proceso de biodegradación que ocurre en un suelo contaminado con hidrocarburos, se optó por simplificar el sistema mediante el uso de un suelo antropogénico, es decir, un suelo conformado artificialmente, como medio de crecimiento. Este suelo artificial tiene como finalidad de que su composición sea controlada y reproducible de modo que los datos obtenidos sean de mayor utilidad para el estudio del fenómeno (Piña, 2004).

Asimismo, este trabajo de tesis incorpora el componente relacionado con la evaluación de la toxicidad aguda que pueden presentar los suelos tratados tanto por la adición de BPCV como la biodisponibilidad de los contaminantes semi-degradados (Lors *et al.*, 2009). De esta forma, es posible detectar la existencia de efectos negativos sobre el desarrollo y la reproducción de la especie vegetal, o la inhibición del crecimiento de otros microorganismos benéficos, tales como hongos (Ulacio *et al.*, 1997 y Castro, 2010).

2. Marco teórico

A continuación, se presenta una breve descripción de cada uno de los principales aspectos de interés para la esta tesis a efecto de tener un mejor entendimiento de los conceptos utilizados.

2.1. Suelo

Según la normatividad mexicana, se define al suelo como un material no consolidado que se compone por partículas inorgánicas, materia orgánica, agua, aire, y organismos que comprende desde la capa superior terrestre hasta diferentes niveles de profundidad (NOM-138-SEMARNAT/SS-2003).

En general, el suelo está constituido por un sistema de partículas sólidas de distintos tamaños, que pueden ser orgánicas o minerales; asociado con este sistema, se encuentra uno de vacíos que puede ser ocupado por una mezcla de gases (comúnmente aire), o líquidos (generalmente agua que contiene minerales también llamado solución del suelo) (Figura 2.1). Sin embargo, no siempre es agua la que ocupa una parte del sistema de vacíos, que puede ser un contaminante.

Además, el suelo es un medio de soporte que alberga distintas especies de microorganismos entre los cuales destacan las bacterias que se presentan en aproximadamente 1.5×10^{10} bacterias por gramo del suelo (Liebeke *et al.*, 2009).

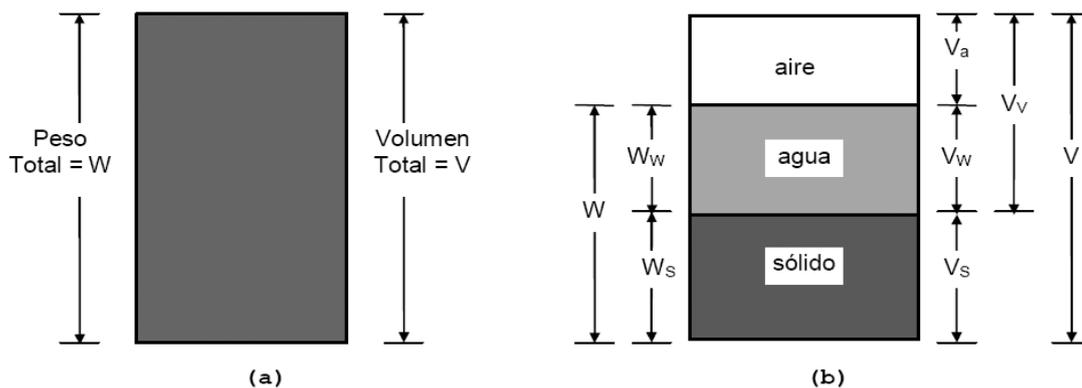


Figura 2.1. a) Elemento de suelo en estado natural, b) Tres fases del elemento de suelo.

La parte sólida inorgánica proviene de procesos de fragmentaciones de roca madre, debido a la meteorización o intemperismo. En tanto que la parte orgánica tiene como origen los restos de animales y vegetales en distintos estados de descomposición.

En general en condiciones ideales, el suelo está compuesto una proporción aproximada de 45% de material mineral, 5% materia orgánica, 25% de agua y 25% de aire, en condiciones ideales (Rivera, 2008). La parte del material mineral del suelo, en su mayoría está constituido por cuarzo, feldespatos y arcillas (Pérez, 2006).

A continuación, se describen las propiedades utilizadas para la caracterización del suelo en esta tesis.

La **textura del suelo** es una propiedad física que se refiere a la proporción relativa de los tamaños de las partículas de arena, limo y arcilla expresadas en porcentaje. Se define como la proporción relativa de arenas, limos y arcillas, en el suelo; en donde las partículas han sido divididas con base en su tamaño sin importar el color, composición o peso. Para realizar su clasificación, se utiliza el triángulo textural que se divide en 12 clases básicas, en función del porcentaje de las fracciones antes mencionadas. En la Figura 2.2 se presenta el triángulo textural que explica la relación en porcentaje de cada una de las fracciones con respecto a las demás (Pérez, 2006).

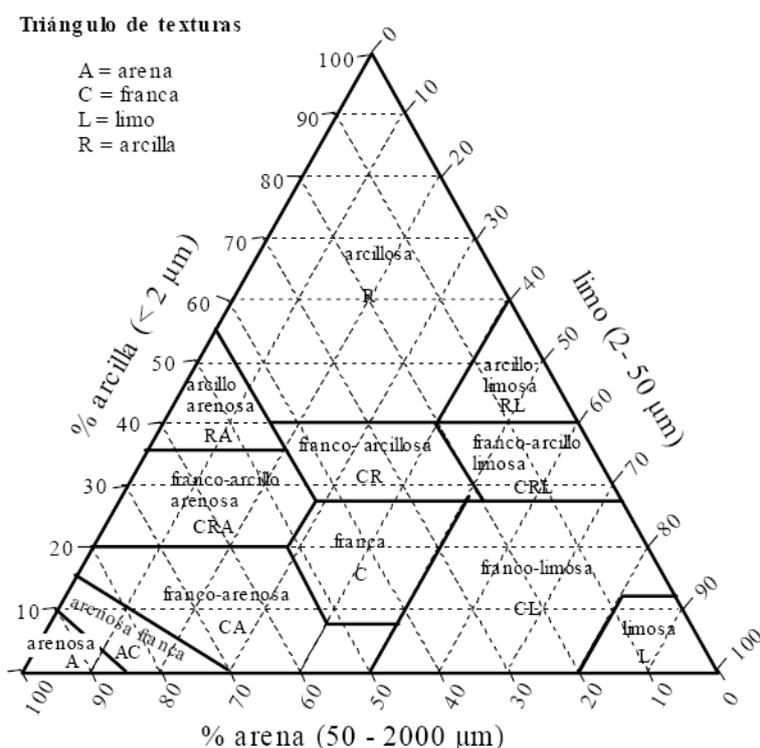


Figura 2.2. Triángulo textura (citado por Siebe *et al.*, 2006 de FAO, 1977)

Otra propiedad física importante del suelo es la densidad. Existen dos tipos que básicamente expresan una relación de masa por unidad de volumen. La primera es la **densidad aparente** que expresa la relación masa/volumen incluyendo el volumen de sólidos y de vacíos (NOM-021-SEMARNAT-2000). La segunda es la **densidad real** que expresa la relación masa/volumen pero en este caso la masa es determinada

únicamente para el suelo y el volumen es determinado mediante el cálculo de la masa y la densidad del agua desplazada por la muestra del suelo.

El **pH** es una característica química que indica el grado de acidez, alcalinidad o neutralidad del suelo (Pérez, 2006). La Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 lo define como el logaritmo negativo de la actividad de los iones hidrógeno en el suelo. En general, el pH del suelo influencia la disponibilidad de nutrientes y de los contaminantes en él.

Dentro de los constituyentes químicos del suelo se encuentra el **carbono**, que puede ser de naturaleza orgánica e inorgánica. Lo constituyen el carbono mineral y la **materia orgánica** (compuesta por humus, humatos y residuos orgánicos poco alterados) (citado por Pérez, 2006 de Jackson, 1982).

El fósforo se puede encontrar como fósforo inorgánico, orgánico, adsorbido y aprovechable. El fósforo aprovechable es absorbido por las raíces de las plantas, la forma en la que es absorbido depende de la acidez del suelo, lo que implica que si se tienen suelos ácidos el fósforo aprovechable es absorbido en forma de H_2PO_4^- (ortofosfato primario); en suelos calcáreos la forma en que lo absorben las plantas es como $\text{H}_2\text{PO}_4^{2-}$ (ortofosfato secundario) (NOM-021-SEMARNAT-2000).

La **humedad** del suelo se refiere al contenido de agua de una muestra de suelo expresada en gramos o en porcentaje.

El **nitrógeno** es considerado un nutriente primario esencial que puede estar en forma orgánica o inorgánica. En general el nitrógeno orgánico representa entre un 85 a 95% del nitrógeno total.

2.2. Suelo artificial

La interacción de los sistemas de sólidos, de vacíos y de los líquidos o gases que se encuentran en ellos crean complejos procesos físicos, químicos y biológicos en el suelo. Por tal motivo, para el presente trabajo de tesis se empleó un medio de características conocidas, al cual se le ha denominado como suelo artificial (Piña, 2004). En algunos documentos recibe el nombre de medio artificial de crecimiento o sustrato artificial.

La razón por la cual se crearon estos suelos artificiales es por la falta de suelo fértil para el crecimiento de las plantas. Estos sustratos son usados principalmente en sistemas cerrados, como los invernaderos. En estos sistemas, los nutrientes son reincorporados con el fin de evitar que contaminen por lixiviación de los mismos. Otra función importante de los sustratos es prevenir enfermedades en las raíces causadas

principalmente por la presencia de microorganismos patógenos (van der Gaag y Wever, 2005).

Algunos de los medios artificiales más comunes son: basalto, vermiculita, perlita, poliuretano, poliestireno, grava, arena, pómez, entre otros. Mientras que los medios de crecimiento orgánicos generalmente empleados son: turba, *peat moss*, composta, fibra de coco, entre otros.

Otro medio que ha cobrado importancia es el agua para los cultivos hidropónicos (Papadopoulos, 1991). Pocas veces se utiliza un solo medio. Convencionalmente se utilizan mezclas que permitan proporcionar al cultivo una buena capacidad de campo, drenaje, aireación y estabilidad física, química y biológica.

El empleo del suelo artificial resulta equivalente al uso de aguas sintéticas en estudios experimentales. La función del suelo artificial es que su composición sea controlada y reproducible de modo que los datos obtenidos sean de mayor utilidad para el estudio del fenómeno.

2.3. Fito-remediación

La facultad inherente de las plantas para extraer nutrientes del suelo para su desarrollo se utiliza con el fin de acumular contaminantes en su biomasa. Por otro lado, existen plantas que degradan o procesan los contaminantes durante su desarrollo fisiológico. Todo esto se describe en algunas de las técnicas de fito-remediación.

La definición descrita por la Agencia de Protección al Ambiente de los EE.UU. (USEPA por sus siglas en inglés) es: **“La fito-remediación es una técnica que utiliza plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar contaminantes en suelos o agua (USEPA, 2000)”**.

Estos procesos han sido aprovechados en técnicas para la remediación de distintos contaminantes en suelos tales como la:

- Fito-extracción o fito-acumulación – involucra la absorción de los contaminantes del suelo a través de las raíces, en donde el contaminante se almacena en las partes de la especie vegetal (López *et al.*, 2005);
- Fito-transformación o fito-degradación – involucra la degradación de contaminantes orgánicos utilizando el metabolismo de las plantas;

- Fito-estimulación o rizo-degradación – involucra la estimulación de la degradación por microorganismos a través de la actividad de la planta en la rizosfera (USEPA, 2000);
- Fito-estabilización –utiliza las plantas para reducir la migración o la biodisponibilidad de los contaminantes a través del suelo evitando su transporte a capas subterráneas (López *et al.*, 2005);
- Rizo-filtración – involucra la utilización de plantas crecidas en cultivos hidropónicos a través de la raíces de las plantas no sólo se absorben sino también se concentran y precipitan los contaminantes (López *et al.*, 2005);
- Fito-volatilización – involucra la volatilización de los contaminantes una vez que son absorbidos por la planta y han llegando a las hojas (López *et al.*, 2005); y
- Atenuación natural – Es una técnica que implica la degradación lenta de los contaminantes a través de los microorganismos y las plantas que se encuentran en el suelo. Esta técnica resulta ser poco efectiva debido a que requiere de tiempos elevados de tratamiento, aunque son económicamente factibles para su aplicación (Serrano *et al.*, 2007).

Ventajas de la fito-remediación:

- Es una tecnología que se puede realizar *in situ* (en el lugar de tratamiento), es decir, sin necesidad de transportar el suelo o el sustrato contaminado,
- Es económicamente factible debido a que no requiere de equipo especializado o una gran inversión en sustancias químicas,
- No requiere de grandes cantidades de energía,
- Permite su aplicación tanto a suelos como a aguas,
- Sólo requiere prácticas agronómicas convencionales,
- Actúa positivamente sobre el suelo, mejorando sus propiedades físicas y químicas, y
- Es ambientalmente aceptable pues se basa en la formación de una cubierta vegetal.

La principal ventaja de la fito-remediación es que resulta económicamente factible comparado con las técnicas convencionales fisicoquímicas, tales como tratamientos térmicos, lavados, extracciones, entre otros. Estas técnicas se han utilizado

comúnmente para la remediación de suelos contaminados con petróleo y sus derivados (Kaimi *et al.*, 2004).

Entre las desventajas de la aplicación de la fito-remediación se encuentran:

- La profundidad de penetración de las raíces para algunas especies vegetales extractoras resulta ser somera (máximo 2 m),
- La fitotoxicidad en áreas fuertemente contaminadas inhiben el desarrollo vegetal,
- Los tiempos de proceso pueden ser muy prolongados con respecto a las demás técnicas de remediación, y
- La biodisponibilidad de los compuestos siempre limita su captación (López *et al.*, 2005).

Un sitio contaminado en particular puede requerir de la combinación de distintos procedimientos para lograr la remediación óptima según las condiciones existentes (Khan *et al.*, 2004); sin embargo, muchas veces el estrés inducido debido a la presencia de contaminantes en el suelo, pueden afectar el crecimiento de la especie vegetal utilizada. Por lo que se requiere de una técnica que fortalezca a la planta durante la fito-remediación (Zhuang *et al.*, 2007) en donde además se promueva el crecimiento de microorganismos asociados a las raíces de la planta (Rivera, 2008). Una de ellas es la utilización de microorganismos en la rizósfera, dichos microorganismos son las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV).

2.4. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV)

La planta exuda distintos compuestos de bajo peso molecular a través de sus raíces, los cuales se depositan en la rizósfera y regulan las posibles interacciones biológicas que pueden existir en los sistemas.

Los sistemas de la rizósfera son: raíz-raíz, raíz-microorganismo y raíz-insecto (Bais *et al.*, 2006). En ésta se presentan distintas dinámicas entre los sistemas, los cuales pueden ser benéficos (positivos), patogénicos (negativos) o neutrales, y dependen de señales químicas entre los tres sistemas. Estas señales químicas son complejas pues una misma señal química puede obtener diferentes respuestas de los distintos destinatarios. Una relación positiva entre las plantas y los microorganismos son la asociación simbiótica entre las raíces y las BPCV.

Las BPCV se definen como las bacterias de vida libre del suelo, la rizosfera, el rizoplano [este término se refiere a la parte exterior inmediatamente adyacente al suelo, es

decir, la superficie de las raíces (Ulacio *et al.*, 1997)], y la filósfera (referido al micro ambiente que rodea a una hoja) que en ciertas condiciones son benéficas para el desarrollo de las plantas.

Las BPCV propician principalmente el crecimiento vegetal en dos formas:

- Afectando directamente al metabolismo de las plantas proporcionando sustancias que son naturalmente suministradas en poca cantidad, siendo capaces de: fijar nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo y hierro transformándolos a estados de óxido-reducción que los hacen disponibles para las plantas (Camarillo, 2006), producir fitohormonas tales como auxinas, giberelinas, citocininas y etilenos, incrementar la tolerancia al estrés ambiental provocado ya sea por sequía, salinidad, toxicidad por la presencia de metales, pesticidas, u otros contaminantes.
- De forma indirecta, son utilizadas como bio-control. Las BPCV estimulan indirectamente el crecimiento vegetal mediante la prevención de efectos degenerativos provocados por microorganismos patógenos. Las BPCV producen entonces, sustancias que resultan dañinas o inhiben a otros microorganismos, sin que éstas pongan en riesgo a la planta, limitando la disponibilidad de hierro para los microorganismos patógenos o alterando el metabolismo de los mismos (Bashan y de Bashan, 2005).

Las BPCV proporcionan una fuente muy considerable de nitrógeno asimilable siendo de importancia las bacterias que se asocian formando estructuras especializadas tales como *Rizobium* y *Frankia* (Postgate en Camarillo, 2006). Existen otras BPCV que se encuentran sobre las raíces o en el interior de las mismas, que no forman estructuras y aún así fijan nitrógeno en menor cantidad que las anteriores, como ejemplo de estas bacterias, entre otras, se enlistan en la Tabla 2.1.:

Tabla 2.1. Ejemplos de BPCV fijadoras de nitrógeno.

| Bacterias aerobias | Bacterias anaerobias | Bacterias aerobias Facultativas |
|---------------------------|-----------------------------|--|
| <i>Azotobacter</i> | <i>Clostridium</i> | <i>Bacillus</i> |
| <i>Azospirillum</i> | <i>Desulfovibrio</i> | <i>Enterobacter</i> |
| <i>Beijerinckia</i> | <i>Metanobacterium</i> | <i>Pseudomonas</i> |
| <i>Derxia</i> | | |

Las BPCV se han utilizado por siglos debido a los efectos benéficos sobre las plantaciones. En un inicio sus fundamentos eran empíricos: los agricultores sabían que si mezclaban el suelo utilizado en plantaciones de leguminosas y el suelo en donde aún no crecían éstas, les proporcionaban un incremento en la producción. En realidad se realizaba una inoculación natural (Bashan, 1998). Con el tiempo se fueron estudiando y aislando las BPCV y se comenzaron a producir comercialmente.

2.4.1. **Fitohormonas y su relación con las BPCV**

Las sustancias exudadas por la raíz son básicamente el etileno y auxinas (Glick, 2005) que son fitohormonas. Estas fitohormonas son sintetizadas en una parte de la planta y translocadas a otra parte en donde se encuentran a bajas concentraciones inducidas por una respuesta fisiológica (Camarillo, 2006).

El etileno es una de las moléculas orgánicas más simples, cuya actividad biológica y cuyo efecto se manifiestan en el desarrollo normal de las plantas afectando la germinación de semillas y el crecimiento de raíces, tallos y pétalos, así como su respuesta a condiciones adversas (Glick, 2005).

La producción de etileno en respuesta al estrés es considerada como un fenómeno característico de la acción de esta hormona. Por esto, el etileno es a veces llamado una hormona de alarma que informa a otros tejidos de las perturbaciones en la planta. El estrés hídrico causa una intensa producción del etileno.

Las auxinas también presentan una amplia variedad de efectos sobre el desarrollo y morfogénesis de las plantas, así como una respuesta al crecimiento de las mismas por estimulación unidireccional, conocida como **tropismo**. Las auxinas promueven la elongación de la raíz y promueven la división celular en tallos, aunque pueden inhibir el desarrollo de yemas laterales. La variedad de efectos que producen las auxinas depende de numerosos factores, incluyendo el estado de desarrollo de los tejidos y los órganos, la concentración de auxinas y el tipo de auxinas (naturales o sintéticas) (Esquivel-Cote, 2002).

Un precursor del etileno es el ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico (ACC) que de igual forma, se produce cuando la planta está sometida a condiciones de estrés. Algunas bacterias como: *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus circulans*, *Bacillus firmus*, *Bacillus globisporus* y *Kluyvera ascorbata* utilizan este ácido como fuente de nitrógeno al cual degradan mediante la encima ACC deaminasa, controlando así la síntesis del etileno.

En un estudio realizado por Camarillo (2006) se encontraron algunas especies de *Azospirillum*, que corresponden a las BPCV con actividad de la ACC deaminasa.

El Azospirillum ha desarrollado dos formas distintas de asociarse con la raíz:

- Unión a corto plazo - dentro de las primeras horas después del contacto (después de que la bacteria migra hacia las raíces por quimiotaxis y aerotaxis, o hasta que la raíz alcanza el sitio de aplicación del inóculo). Esto involucra interacciones hidrofóbicas y reconocimiento de lecitina entre la bacteria y la célula de la planta.
- Unión a largo plazo - Involucra la elaboración de material fibrilar proteína/polisacárido, el cual fija permanentemente a la bacteria con la superficie de la raíz. Eventualmente las bacterias se multiplican y forman pequeños agregados, que proveen una ventaja ecológica sobre las que no están asociadas con respecto a la competencia por los nutrimentos que se filtran desde la raíz.

Los estudios antes mencionados se utilizaron tres cepas de *Azospirillum lipoferum*: AZm1, AZm3, AZm5 que fueron purificadas y liofilizadas en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM.

2.5. Hidrocarburos

El grupo de hidrocarburos comprende un gran número de compuestos que por definición se encuentran en el combustible crudo, así como en otras fuentes combustibles como gas natural, carbón y turba (Martín *et al.*, 2004). En general, se refieren a una mezcla compleja formada por gases, líquidos y sólidos que contienen trazas de mezclas de nitrógeno, oxígeno y azufre en mayor proporción y en menor proporción están el hierro, níquel, vanadio y otros metales (citado por Bustamante, 2007 en PEMEX, 1988).

Existen tres grupos principales de hidrocarburos: hidrocarburos alifáticos, hidrocarburos alicíclicos e hidrocarburos aromáticos (Rivera, 2008).

Los hidrocarburos alifáticos también llamados de cadena abierta o acíclicos, comprenden a los alcanos (parafinas) y alquenos (olefinas) lineales de cadena abierta tales como pentano, buteno, entre otros.

Las parafinas son uno de los principales constituyentes del crudo y se encuentran en los diferentes productos refinados del petróleo como gasolina, queroseno, diesel, aceites combustibles, entre otros. Hay tres tipos de parafinas: alcanos lineales, alcanos ramificados y naftenos. En este último caso, los átomos de carbono están dispuestos en uno o más anillos (Bustamante, 2007).

Las olefinas se forman durante el proceso de refinación del crudo. Estas moléculas se caracterizan por tener dobles enlaces en su estructura.

Los hidrocarburos alicíclicos o simplemente cíclicos son cadenas de carbono que forman uno o varios anillos, por ejemplo: ciclo-decano, ciclo-pentano, biciclo-decano, entre otros.

Los hidrocarburos aromáticos pueden ser de un solo anillo tal como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX). Éstos tienen propiedades semivolátiles, una gran movilidad y presentan una baja solubilidad en agua, siendo la mayor parte de ellos lipofílicos, o también pueden contener varios anillos aromáticos como en el caso del naftaleno, antraceno, pireno, entre otros; estos últimos también son llamados hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos o polinucleares son contaminantes orgánicos recalcitrantes y están compuestos por dos o más anillos bencénicos y representan peligro para la salud humana por ser potencialmente carcinógenos (Hamdia, 2007), tienen la característica de tener una gran hidrofobicidad y una alta relación de distribución sólido-agua por lo que en el suelo tienden a tener actividad en la parte no acuosa.

Los diferentes productos obtenidos por refinación y destilación del crudo son combinaciones de múltiples hidrocarburos individuales, cada uno de los cuales tienen diferentes temperaturas de ebullición. Por ejemplo, la gasolina es la combinación de muchos componentes de bajo punto de ebullición, incluyendo alcanos de C_4 a C_{12} , alquenos de C_4 a C_7 y aromáticos tipo BTEX. Los compuestos con puntos de ebullición intermedios se utilizan en diferentes proporciones para conseguir productos como queroseno, diesel y aceites combustibles. Estos productos contienen preferentemente alcanos de C_{10} al C_{28} y policíclicos aromáticos con bajo o ningún contenido en olefinas (Martín *et al.*, 2004).

Una forma de obtener la concentración de hidrocarburos fracción media en el suelo está especificada en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003¹ la cual define a los hidrocarburos que se encuentran entre las cadenas de carbono del C_{10} a C_{28} .

¹ Nota: Para este trabajo de tesis no se tomó en cuenta la Norma Oficial Mexicana Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SA1-2008, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación publicada el 23 de agosto del 2010.

Esta norma divide al suelo según su uso predominante como agrícola, residencial o industrial, y para cada uno de ellos existe un límite máximo permisible según la fracción de hidrocarburo a la que pertenezca el contaminante, como se muestra en la Tabla 2.2. Las fracciones dependen del tipo de hidrocarburo como contaminante, para este caso se describe al diesel como fracción media.

Tabla 2.2. Límites máximos permisibles de hidrocarburos según la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

| Fracción de hidrocarburos | Uso de suelo predominante (mg·Kg ⁻¹ base seca) | | |
|---------------------------|---|-------------|------------|
| | Agrícola | Residencial | Industrial |
| Ligera | 200 | 200 | 500 |
| Media | 1 200 | 1 200 | 5 000 |
| Pesada | 3 000 | 3 000 | 6 000 |

Por otro lado, la misma norma establece a seis de los HAP como los más persistentes y perjudiciales para la salud humana; éstos son: benzo[a,h]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluranteno, benzo[k]fluoranteno, e indeno (1,2,3-cd) pireno. Sus límites máximos permisibles se muestran en la Tabla 2.3:

Tabla 2.3. Límites máximos permisibles de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) según la norma NOM-138-SEMARNAT/SS-2003.

| Hidrocarburos específicos | Uso de suelo predominante (mg·Kg ⁻¹ base seca) | | |
|---------------------------|---|-------------|------------|
| | Agrícola | Residencial | Industrial |
| Benzo[a,h]pireno | 2 | 2 | 10 |
| Dibenzo[a,h]antraceno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo[a]antraceno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo[b]fluoranteno | 2 | 2 | 10 |
| Benzo[k]fluoranteno | 8 | 8 | 80 |
| Indeno (1,2,3-cd)pireno | 2 | 2 | 10 |

2.5.1. Medición de hidrocarburos

En un estudio experimental realizado por Kaimi *et al.* (2004) se realizó la medición de los hidrocarburos fracción media y pesada utilizando el método de espectrometría de infrarrojo (FT-IR). Además utilizó una técnica de determinación de hidrocarburos fracción pesada por gravimetría; sin embargo, esta técnica es muy poco eficiente para la medición de HFM o fracción ligera.

La medición de los hidrocarburos en sus tres fracciones se describen en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación, la determinación se realiza por cromatografía de gases (CG) para la. En dicha norma se especifica que para el diesel es necesario medir HFM e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Como se realizó en el experimento de Fernet (2008) quien además utilizó la cuenta de bacterias degradadoras de hidrocarburos (fenantreno) como medición indirecta de la concentración del hidrocarburo en las fracciones media y pesada.

2.6. Contaminación por hidrocarburos y su degradación

La intensa actividad desarrollada por la industria del petróleo y sus derivados, y las actividades extractivas en yacimientos subterráneos, generan grandes impactos al ambiente. La mayor parte se utiliza como combustible en forma de gasolina, diesel, turbosina, entre otros; junto con algunas fracciones volátiles (metano, propano y butano) que son la principal fuente de energía, tanto industrial como doméstica (Valderrama y Téllez-Sosa, 2000).

Debido a situaciones tales como los derrames durante la transportación de sustancias químicas, lixiviación desde un sitio de disposición o almacenamiento, las descargas de instalaciones industriales (Khan *et al.*, 2004), o las actividades extractivas, el suelo se ha contaminado con productos derivados del petróleo.

Las descargas de hidrocarburos en el suelo crean condiciones desfavorables para el crecimiento microbiológico y de la vegetación, limitando la disponibilidad de nutrientes y oxígeno. La infiltración de los hidrocarburos al suelo puede prevenir la volatilización de los mismos evitando su transferencia a la atmósfera; sin embargo, este proceso puede incrementar la toxicidad en el suelo. Por otro lado, la actividad microbiana temporalmente afectada tenderá a atenuar de forma natural a estos compuestos.

En el suelo, existe la transformación o degradación abiótica y la biótica. La abiótica se realiza por hidrólisis, reacciones redox (Rivera, 2008) y fotólisis. En tanto que la biótica también llamada biodegradación, ocurre a través de la acción de los microorganismos presentes en el suelo. Éste es el principio en el que se basa la biorremediación para degradar los contaminantes orgánicos del suelo.

La cinética de degradación en ambientes naturales es prácticamente empírica; sin embargo, una expresión que aproxima el fenómeno es la siguiente:

$$-\frac{dC}{dt} = k_d C^n$$

Ecuación 2.1. Modelo de degradación de un contaminante.

Donde:

- C es la concentración de sustrato;
t es el tiempo;
 k_d es la constante de degradación; y
n es el coeficiente de ajuste.

Las constantes o velocidades de degradación de HFM consideradas como rápidas (por tratamientos fisicoquímicos) van de 0.02 a 0.2 d^{-1} (citado por Vermeulen, 2007 de Cornelissen *et al.*, 1998). Para las velocidades de degradación lentas, la k_d varía de 0.021 a 0.11 d^{-1} , lo cual coincide con aquellas de la biodegradación de HFM de 0.01 a 0.04 d^{-1} (citado por Vermeulen, 2007 de Nocentini *et al.*, 2000, Salanitro *et al.* 1997). Mientras que las velocidades de degradación reportadas para HAP van del 0.061 al 0.26 d^{-1} .

Los intervalos de degradación de los hidrocarburos han mostrado que los saturados se encuentran abiertos a la degradación microbiana, y que por el alto peso de los compuestos aromáticos, éstos tienden a ser menos susceptibles a la degradación microbiana; es decir, entre más compleja es la estructura del hidrocarburo, mayor es su persistencia en el ecosistema.

La vegetación presente en un suelo contaminado por hidrocarburos juega un gran papel en su degradación. Los hidrocarburos pueden entrar a la planta por distintas vías: pueden ser tomados a través de las raíces, o del follaje captando las fracciones volatilizadas en el aire (Fernet, 2008).

Las plantas y las semillas se asocian con diversos microorganismos; los hidrocarburos (en sus fracciones ligera, media o pesada) y los microorganismos, en contacto directo con la semilla, influyen la calidad del desarrollo de la planta y su supervivencia, lo que provoca que la semilla exude sustancias dentro del suelo durante ese contacto.

Una vez desarrollada la planta, las hojas a través de sus estomas son capaces de absorber los gases, producto de la volatilización. La cutícula cerosa de la hoja logra proteger de la deshidratación y enfermedades en la planta en su parte aérea, las hojas son por lo tanto lipofílicas y pueden fácilmente adsorber los hidrocarburos.

Los hidrocarburos deben presentar una alta solubilidad en agua, un coeficiente de partición octanol-agua bajo, bajo peso molecular, con hidroxilaciones para que sean extraídos fácilmente a través de las raíces. Otro factor importante es la edad de la planta, ya que entre más madura sea, mayor será la extracción que tenga.

El contaminante puede seguir dos caminos una vez que ha entrado a la planta: la degradación u oxidación, o la conjugación y la oclusión de éste. En ambos casos, las monooxigenasas o peroxidasas de la planta hidroxilan al contaminante transformándolo a una sustancia orgánica polar que es fácilmente transportada en el tejido de la planta.

Las enzimas hacen que el compuesto sufra una oxidación para quedar como bióxido de carbono y agua. Los contaminantes también pueden segregar azúcares, aminoácidos, o pequeños péptidos, y así ser transportados al tejido vegetal en las vacuolas o el material celular de la planta.

2.7. Tratamiento de fito-remediación de hidrocarburos

En el 2004, Kaimi *et al.* se realizaron un experimento con ryegrass (*Lolium perenne*) en un suelo contaminado con diesel. La relación entre las variables de crecimiento, la actividad microbiana y la tasa de disipación del diesel fueron monitoreadas.

Los resultados indicaron que el crecimiento del ryegrass puede disminuir los umbrales de disipación del diesel en el suelo. La tasa residual de diesel en la rizósfera fue 55% menor que la correspondiente al suelo libre de contaminantes, y la reducción ocurrió posteriormente al crecimiento de las raíces. En la rizósfera, el número de bacterias aerobias y la cantidad de actividad de la deshidrogenasa fueron mayores que en la zona libre de raíces, lo que además mostró una correlación con el crecimiento de las mismas. Además, la tasa de disipación por la actividad de la deshidrogenasa fue mayor en la rizósfera que en la zona libre de raíces. En conclusión, las raíces del ryegrass se determinaron como eficaces para la biodegradación del suelo contaminado con diesel (Kaimi *et al.*, 2004).

Asimismo, Kaimi *et al.* (2004) citaron un trabajo experimental realizado por Hou *et al.* (2001) quienes encontraron un incremento en la biodegradación posterior a la formación del desarrollo radicular del ryegrass, no obstante, el estudio no consideró la determinación de la concentración del diesel en el suelo.

Se han realizado otros estudios con otras especies vegetales mayores como los álamos, en donde se observó la relación de la presencia de diesel con la microbiota nativa del suelo. Este estudio aportó una caracterización genética de la microbiota de la rizósfera de un suelo contaminado con diesel (Tesar *et al.*, 2002). También se ha utilizado alfalfa (Shahriari *et al.*, 2007) y maíz (Egamberdiyeva, 2007), entre otros, en donde se observó el crecimiento de la especie vegetal junto con los microorganismos existentes en el sistema.

Johnsona *et al.* (2005) utilizaron distintas especies de *Lolium* midiendo la respuesta de los microorganismos nativos y la inoculación de BPCV en un suelo contaminado con HAP, en donde no se observaron diferencias en los tratamientos pero se notó un incremento en la comunidad microbiana y su actividad.

En el 2006, se realizó un estudio experimental para observar la contaminación por diesel en estratos bien definidos del suelo y ver la distribución y desarrollo de las raíces, utilizando *Lolium perenne*. La distribución y brotes de la raíces fueron monitoreados con respecto del tiempo y se determinaron la densidad radicular, la biomasa en la parte aérea del pasto y la concentración final de hidrocarburos en sus tres fracciones. Se observó un cambio en la distribución de los estratos debido principalmente a la irrigación. La planta presentó un desarrollo radicular mayor en las zonas libres de hidrocarburo, una vez ocupado este espacio, las raíces comenzaron a crecer en la zona contaminada. (Kechavarzi *et al.*, 2006.)

En el 2006, se realizó un estudio de multi-proceso de fito-remediación acelerando la cinética de remediación para la remoción de HAP, HFM e hidrocarburos clorados en el suelo utilizando como potenciador a las BPCV. La presencia de estas, como ya se ha discutido anteriormente, mitigan el estrés por etileno permitiendo un incremento en microbiota de la rizósfera. Se utilizó una prueba piloto en invernadero en un periodo de tres años y lograron el 70% de remediación del 15% de HFM, y en otro sitio se logró remediar más del 50% del 1% HAP (Greenberg, 2006).

Un estudio más reciente publicado en el 2008, mostró la relación de los inóculos de bacterias que ayudan a seis especies de pastos del oeste de Canadá, éstos fueron elegidos debido a la tolerancia que presentan a los hidrocarburos en el suelo (*Leymus angustus*, *Festuca rubra*, *Puccinellia nuttalliana*, *Lolium perenne*, *Pascopyrum smithii* y *Elymus trachycaulus*). Estos sistemas incrementaron la fito-remediación de fenantreno. Los inóculos utilizados fueron: *Sphingomonas yanoikuyae*, *Rahnella aquatilis*, y *Arthrobacter globiformis*. Los nutrientes fueron proporcionados por el uso de estiércol de vaca. En los sistemas bacteria-pasto se redujo la concentración de hidrocarburos de fracción media y pesada en un 45%, mientras que en los sistemas control presentaron una reducción del 20%. Los resultados en el sistema de *Lolium perenne* con *S. yanoikuyae* incrementaron el porcentaje de remoción en un 10% más que el obtenido por el control (sólo el *Lolium perenne*). La conclusión del artículo fue que los sistemas planta-bacteria incrementan la degradación de fenantreno (Fernet, 2008).

Debido a sus capacidades para crecer en suelos contaminados con diesel y de degradar este contaminante, se ha seleccionado al ryegrass como una de las plantas gramíneas a emplear para la fase experimental de la presente tesis entre otras gramíneas disponibles en la localidad.

Ryegrass

El ryegrass (*Lolium*) o raigrás, es uno de los géneros de nueve especies euroasiáticas de hierbas anuales o perenes, mesotérmicas, con hojas planas y tiernas. Poseen una espiga terminal, dística, comprimida, con el raquis articulado. Las espiguillas son plurifloras, alternas y solitarias en cada nudo, las laterales con una sola gluma y la terminal con dos, dispuestas en el mismo plano que el raquis. La flor es hermafrodita con tres estambres. Dentro del género se encuentran especies de gran importancia forrajera en regiones de clima templado como el "ryegrass anual" (*L. multiflorum*) y el "ryegrass perene" (*Lolium perenne*). Además, es un cultivo importante en la explotación agropecuaria debido a sus posibilidades de producción de forraje de calidad en las épocas más deficitarias e inclusión en rotaciones como cultivo intercalar. Además presenta un ciclo anual y tiene una buena adaptación a la climatología y es idóneo para desarrollarse a bajas temperaturas y con una coincidencia habitual con los meses de mayor precipitación.

2.8. Toxicidad en suelos post-tratamiento

Cuando se agregan microorganismos al suelo, en algunos casos como parte de un tratamiento, con el tiempo su naturaleza se vuelve una preocupación. Hasta ahora se han presentado algunas fallas que la biotecnología no ha podido solucionar como las implicaciones ecológicas a las que pueden llevar una vez que se ha inoculado suelo con microorganismos no nativos. La principal inquietud es que la introducción de otros organismos pueden crear un desbalance ambiental (Castro *et al.*, 2010).

En el suelo, la inoculación con microorganismos puede inhibir el desarrollo de las poblaciones microbianas nativas. Estos microorganismos requieren para sobrevivir condiciones ambientales específicas (humedad, nutrientes, pH, factores osmóticos, entre otros) y compiten con las poblaciones nativas (Thompson *et al.*, 2005) durante algunos tratamientos, como son la bio-aumentación, fito-estimulación o, en este caso, fito-remediación asistida para la degradación de contaminantes.

Por otro lado, no solo el aumento de microorganismos en el suelo puede causar problemas de toxicidad, por ejemplo, en el caso de contaminación por diesel, que conlleva una fracción recalcitrante, puede ocurrir una degradación incompleta de los HAP haciéndolos biodisponibles.

La forma de medir el efecto de la adición de los microorganismos y la biodisponibilidad de los contaminantes semi-degradados es a través de pruebas de toxicidad aguda con organismos vivos que se encuentren en diferentes niveles de la cadena trófica (Lors *et al.*, 2009).

La definición de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia para producir un efecto dañino sobre un organismo (Rivera, 2008). Las propiedades tóxicas de un compuesto pueden ser evaluadas mediante el uso de plantas, bacterias, animales, y en el ecosistema.

Ahora bien, el uso de plantas es frecuente en este tipo de pruebas. Con esto se busca evaluar el daño que puede provocar un contaminante y la compatibilidad de los suelos contaminados, o ya remediados, a través de la reacción que presenta la planta a los metabolitos tóxicos finales de la remediación.

Los factores de respuesta en estas pruebas o bioensayos son, en general, los siguientes: germinaciones, crecimiento vegetal y desarrollo de biomasa (en raíz y tallo) y efectos fito-tóxicos.

Estas pruebas se encuentran en guías y procedimientos de referencia de diferentes organizaciones tales como la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), y la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) (Rivera, 2008).

La guía de la OECD básicamente evalúa los efectos en la germinación de semillas y en las plántulas durante la exposición de la sustancia de prueba en el suelo (o en otra matriz) por un periodo mayor al requerido para que el 50% de las semillas hayan germinado en el control (preparado con la matriz libre de la sustancia), se miden los factores de respuesta de las semillas germinadas, tales como biomasa (húmeda y seca), efectos visuales deterioradores (mortalidad o clorosis), anormalidades de la plántula y longitudes, entre otros (OECD, 2003).

Los artículos referentes al uso de BPCV no describen las condiciones en el suelo después de los tratamientos de descontaminación efectuados en él para el crecimiento de especies vegetales vulnerables subsecuentes, como pruebas de toxicidad. Sin embargo; se ha reportado resultados de toxicidad para HAP con organismos acuáticos como microcrustáceos e incluso con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*). En los bioensayos con *Lactuca sativa* determinaron la elongación de raíces ante la presencia de diesel durante un estudio de bioaumentación y bioestimulación midiendo además HFM y HAP (Hamdia *et al.*, 2007).

2. Objetivos y estrategia de trabajo

2.1. Objetivo general

Evaluar la fito-remediación convencional y asistida con bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) de un suelo contaminado con diesel y su toxicidad aguda remanente post-tratamiento.

2.2. Objetivos particulares

- a) Evaluar la fito-remediación de un suelo artificial contaminado con diesel, empelando ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) asistida con la cepa AZm1 de *Azospirillum lipoferum* como bacterias promotoras del crecimiento vegetal a través del desarrollo de la especie vegetal.
- b) Evaluar la remoción, eficiencia y velocidad de degradación entre los arreglos experimentales establecidos mediante la cuantificación de la concentración de hidrocarburos fracción media, hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos.
- c) Determinar la toxicidad aguda de los suelos tratados mediante la aplicación de bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*).

2.3. Estrategia de trabajo

En las Figuras 3.1, 3.2 y 3.3 se muestra la estrategia de trabajo que se siguió durante la etapa de experimentación. Existen dos etapas preliminares para la obtención de suelo artificial y la selección de la semilla, la concentración de diesel y la cepa de trabajo que una vez obtenidos se montaron las unidades experimentales y se les dio seguimiento.



Figura 3.1. Estrategia de trabajo para la obtención del suelo artificial.

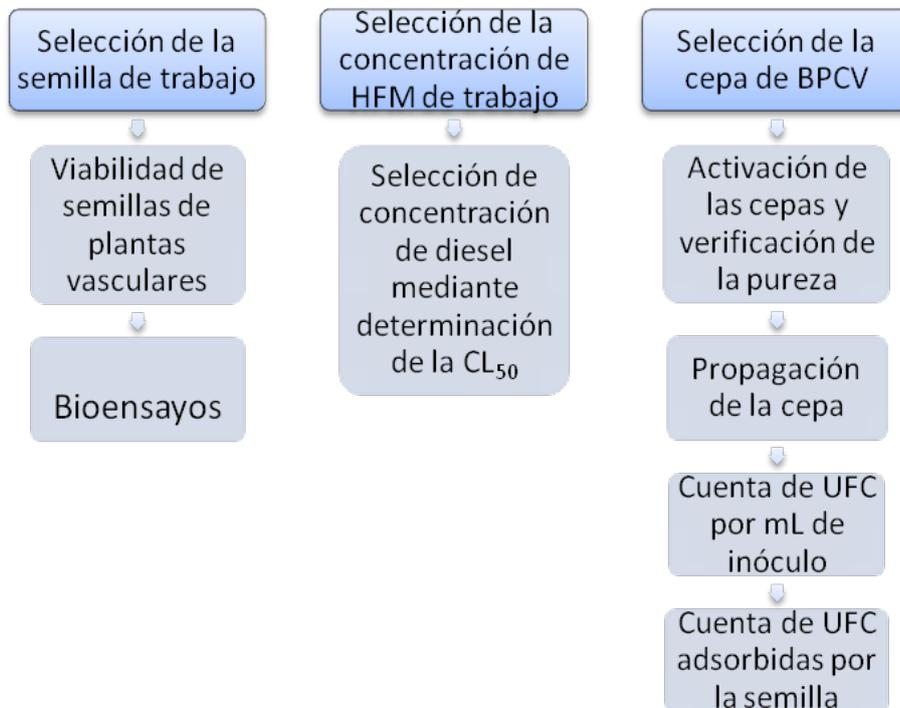


Figura 3.2. Estrategia de trabajo para la selección de la semilla, la concentración de diesel y la cepa de BPCV.

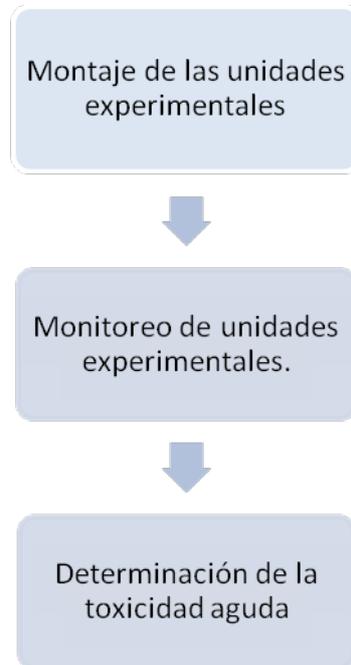


Figura 3.3. Estrategia de trabajo.

4. Metodología

4.1. Etapa preliminar

4.1.1. Conformación de suelo artificial

Para la conformación del suelo artificial, el cual fue utilizado como sustrato para la realización de la experimentación, se requirió de tres pasos previos:

- a. Caracterización inicial de un suelo natural: determinación de propiedades físicas y químicas,
- b. Conformación del suelo artificial: reproducción de las propiedades físicas y químicas del suelo natural, y
- c. Caracterización del suelo artificial: determinación de propiedades físicas y químicas.

4.1.1.1. Caracterización de suelo natural

Se seleccionó un suelo perteneciente a una región cuya probabilidad de incidencia a derrames fuera frecuente. No se utilizó este suelo natural durante el tratamiento por presentar incidencias de uso de plaguicidas al tener un uso agrícola y con la finalidad de que su composición sea controlada y reproducible de modo que los datos obtenidos sean de mayor utilidad para el estudio del fenómeno.

De este suelo se realizaron las siguientes determinaciones: carbono, fósforo aprovechable, densidad aparente y real, porosidad, humedad, materia orgánica, nitrógeno total, pH y textura.

Los métodos utilizados para la caracterización se enlistan en la Tabla 4.1. Para la determinación de fósforo aprovechable, humedad, materia orgánica, nitrógeno, pH y textura se utilizaron los métodos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

Para la determinación de carbono y nitrógeno se utilizó un analizador elemental de carbono, nitrógeno, hidrógeno y azufre, Perkin Elmer 2400 series II. El analizador utilizó como gas acarreador helio, con una temperatura de combustión: 980 °C, y a una temperatura de reducción 640 °C, teniendo un detector de conductividad térmica y utilizando acetanilida como compuesto de calibración.

Tabla 4.1. Métodos para la determinación de propiedades para la caracterización del suelo natural y del suelo artificial.

| Variables | Método | Descripción |
|----------------------|--------|-------------------------------|
| Carbono | - | Analizador elemental |
| Densidad aparente | - | Método de la probeta |
| Densidad real | - | Picnómetro |
| Fósforo aprovechable | AS-10 | Procedimiento de Olsen |
| Humedad | AS-05 | Gravimétrico |
| Materia orgánica | AS-07 | Walkley y Black |
| Nitrógeno | AS-08 | Extracción por Micro-Kjeldahl |
| pH | AS-02 | Electrométrico |
| Porosidad | - | Densidades |
| Textura | AS-09 | Bouyoucos |

Para determinar la porosidad, densidades aparente y real se utilizaron los siguientes procedimientos:

Densidad aparente

1. Se pesó una probeta de 10 mL vacía (B), se le agregó la muestra de suelo hasta los 10 mL, y golpeando ligeramente 10 veces sobre la mesa, se agregó lo necesario para llegar a los 10 mL;
2. Se pesó la probeta con el suelo (A);
3. La densidad aparente se calculó con la siguiente expresión:

$$\rho_a = \frac{A - B}{V}$$

Ecuación 4.1. Expresión para determinar la densidad aparente.

Donde:

- ρ_a Es la densidad aparente del suelo en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$;
A es la masa de la probeta con el suelo en g;
B es la masa de la probeta vacía en g; y
V es el volumen de la probeta en cm^3 .

Densidad real

1. A la muestra de suelo se le adicionaron 20 mL de peróxido de hidrógeno para eliminar la materia orgánica y se puso en calentamiento hasta llegar a sequedad, nuevamente se le agregaron otros 20 mL del peróxido de hidrógeno

- y se repitió este paso hasta no observar reacción al agregar el peróxido de hidrógeno;
2. Se pesó un picnómetro seco (B) se le agregaron 5 g de muestra de suelo que fueron pesados junto con el picnómetro (S), y se agregó agua destilada fría recientemente hervida a la mitad del picnómetro;
 3. Se dejó reposar por aproximadamente 5 minutos;
 4. Se aforó con el agua destilada;
 5. Se pesó el picnómetro aforado y con la muestra de suelo (C); y
 6. Finalmente, se pesó el picnómetro con el agua destilada fría (A).
 7. La densidad real se calculó con la siguiente expresión:

$$\rho_r = \frac{S - B}{\frac{A - B}{\rho_w} - \frac{C - S}{\rho_w}}$$

Ecuación 4.2. Expresión para determinar la densidad real.

Donde:

- ρ_r Es la densidad real del suelo en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$;
S es la masa del picnómetro con el suelo en g;
B es la masa del picnómetro con vacío en g;
A es la masa del picnómetro con agua en g;
C es la masa del picnómetro con el agua y el suelo g; y
 ρ_w es la densidad del agua en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

Determinación de la porosidad

Con los datos obtenidos de la densidad aparente y la densidad real, el porcentaje de espacio poroso o porosidad de la muestra se calcula empleando la siguiente expresión:

$$P = 100 \times \left(1 - \frac{\rho_a}{\rho_r}\right)$$

Ecuación 4.3. Expresión para determinar la porosidad.

Donde:

- P es la porosidad en porcentaje;
 ρ_a es la densidad aparente del suelo en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$; y
 ρ_r es la densidad real del suelo en $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$.

4.1.1.2. Conformación de suelo artificial

El suelo conformado artificialmente se obtuvo utilizando las proporciones según las propiedades de la sección anterior del suelo. La experimentación se realizó con un solo lote conteniendo la mezcla de arena, feldespato como limo y arcilla de tipo caolinita. Las tres fracciones fueron obtenidas comercialmente. La materia orgánica se adicionó en forma de materia orgánica de tipo comercial (Piña, 2004).

4.1.1.3. Caracterización del suelo artificial

Para la caracterización de suelo artificial, se determinaron las propiedades según los métodos descritos en la Tabla 4.1.

4.1.2. Determinación de la variedad de semilla de trabajo para la fito-remediación

Con el fin de reducir la matriz experimental se implementaron bioensayos. Estos bioensayos realizados *in vitro*, se exponen a continuación.

4.1.2.1. Viabilidad de las semillas por bioensayos

Se realizaron pruebas de viabilidad para semillas de plantas vasculares seleccionadas a partir de la bibliografía y de la disponibilidad en la localidad, las cuales se enlistan a continuación. Las dos primeras fueron de dos lotes distintos y se distinguen como de *lote 1* y *lote 2*:

- a. Ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) (lote 1),
- b. Ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) (lote 2),
- c. Ryegrass perene (*Lolium perenne*)
- d. Ryegrass guf hoja delgada (*Lolium multiflorum*),
- e. Ryegrass perene linn (*Lolium perenne*),
- f. Ryegrass anual gulf (*Lolium multiflorum*),
- g. Pasto festuca (*Festuca pratensis*),
- h. Pasto orchad (*Orchad Potomac*),
- i. Alfalfa española (*Medicago sativa*), y
- j. Trébol rojo (*Trifolium pratense*).

4.1.2.2. Bionensayos

Para la siguiente etapa, se seleccionaron las variedades de semillas que tuviesen porcentajes de germinación por arriba del 85%. Dichas semillas se utilizaron en una

prueba de toxicidad para determinar su comportamiento con el diesel. La activación de las semillas se inhibe ante la presencia de sustancias tóxicas, en este caso el diesel, el cual afecta su germinación (Rivera, 2008). Este método, es aplicable para evaluar la fitotoxicidad de hidrocarburos por la prueba de germinación de las semillas seleccionadas en el punto anterior. El método de referencia utilizado para este bioensayo de toxicidad es el de la USEPA para medir efectos de ecotoxicidad de la germinación de semillas/elongación de raíces (*Ecological Effects Test Guidelines. OPPTS 850.4200 (1996), Seed Germination / Root Elongation Toxicity Test*). El método anterior se modificó de la siguiente forma: el solvente utilizado para el extracto de hidrocarburos fue dimetil sulfóxido (DMSO) y diclorometano para una segunda prueba, en lugar de realizar diluciones con agua o arena.

En las pruebas de germinación se observó el efecto que causa el diesel en la promoción o inhibición del surgimiento radicular en la semilla a diferentes concentraciones, se registró el número de semillas germinadas y cuando se obtuvo al menos 50% de la germinación del control negativo, entonces se consideró el tiempo final de la prueba; se compararon los tratamientos. Estas pruebas tuvieron una duración de ocho días.

El procedimiento empleado fue el siguiente:

1. Se colocaron las semillas en cajas Petri con discos de papel filtro Whatman No. 40 de celulosa de aproximadamente 9 cm.
2. Se adicionaron 2 mL del solvente, en un intervalo de tres concentraciones (5 000, 25 000 y 50 000 mL·L⁻¹) distribuyendo de forma homogénea sobre el papel filtro.
3. Como testigo positivo se utilizó una caja Petri agregando 2 mL del solvente. Y como testigo negativo se colocó únicamente agua destilada.
4. Se dejó evaporar el solvente durante 10 minutos dentro de la campana de extracción.
5. Se colocaron 10 semillas en cada caja de Petri distribuidas uniformemente. Se realizaron tres réplicas por tratamiento.
6. Se incubaron las semillas dentro de un cuarto oscuro con temperatura controlada a 30 °C hasta que el testigo negativo germinó en un 50%.
7. Se agregaron 3 mL de agua destilada por caja Petri cada 24 o 72 horas según se requirió en función de la humedad del papel filtro.
8. Se registró el número de semillas germinadas siguiendo el criterio de germinación con radícula mayor que 5 mm y se analizaron los resultados.

4.1.2.3. Determinación de la concentración letal de diesel en la semilla seleccionada

Con las pruebas de germinación se identificó aquella semilla que tuviera una mayor tolerancia a la presencia del diesel, con el fin de mejorarla con la adición de las

bacterias. Sin embargo, es importante aclarar que al agregar el suelo como sustrato, se obtuvieron resultados que no corresponden con los obtenidos en la prueba de germinación. Por lo que se realizó otro bioensayo para determinar la concentración letal con la semilla seleccionada teniendo como sustrato el suelo artificial.

El procedimiento fue el siguiente:

1. Se utilizó la semilla seleccionada previamente, y se colocó en 150 gramos de suelo artificial.
2. Se contaminó con diferentes concentraciones de diesel comenzando por 5,000 mg·kg⁻¹ que fue donde se observaron efectos en la germinación de la semilla (5 000, 6 500, 8 000, 9 500, 12 000, 16 000, 19 000, 22 000, 25 000 y 50 000 mg·Kg⁻¹ en base seca) obteniéndose tres réplicas para cada concentración. Posteriormente, se redujeron las concentraciones.
3. Para la contaminación del suelo artificial con el diesel se mezcló en un mortero, por aproximadamente 1 hora para asegurar una homogeneidad en su distribución, y se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 días.
4. En cada uno de los vasos se colocaron 10 semillas las y fueron regados cada 72 horas.
5. Los vasos se colocaron en un cuarto de incubación que aseguraba la obscuridad total a 32°C por 6 días y después se colocaron a temperatura ambiente. Determinado por el crecimiento de al menos el 50 % de germinación en el control (concentración 0 mg·Kg⁻¹) y se registraron los resultados de porcentaje de germinación.

A partir de esta prueba se encontró la concentración de trabajo durante el tratamiento de los datos por regresión lineal.

4.1.2.4. Determinación de la cepa de BPCV de trabajo

Para determinar la cepa con la cual se trabajó, denominada como cepa de trabajo, se obtuvo del Laboratorio de Microbiología Experimental, tres cepas específicas de *Azospirillum lipoferum*, identificadas como: AZm1, AZm3 y AZm5.

4.1.2.5. Activación de la cepa y verificación de la pureza

Las cepas liofilizadas tienen una presentación de ampollitas, éstas se desinfectaron en su superficie sumergiéndolas por 10 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (5% v/v) y se hidrataron por 2 minutos con unas gotas de caldo nutritivo.

La suspensión obtenida se colocó en un matraz con caldo nutritivo y se incubó en agitación (150 rpm) a 34 °C, durante 72 hrs. A partir de este cultivo, se colocó una gota

sobre una caja Petri con gelosa nutritiva y se estirió para separar las colonias. La incubación se hizo a 35 °C durante 3-7 días.

4.1.2.6. Propagación de la cepa

Las cepas (AZm1, AZm3 y AZm5) se propagaron en tubos inclinados con gelosa nutritiva a tubos de ensaye con caldo nutritivo, y se incubaron por un periodo de 24 horas a 35° C.

Transcurrido el tiempo de incubación, en condiciones estériles, se tomó una alícuota de 1 mL, se transfirió a un matraz de 50 mL de caldo nutritivo estéril, y se incubó por 24 horas a 35° C en agitación a 180 rpm.

Posteriormente, se agregó 1 mL de la suspensión de microorganismos a un matraz nefelométrico, y se fue agregando paulatinamente 1 µL de esta suspensión hasta verificar por turbidimetría que se obtuvieran 20 unidades Klett (UK).

Una vez ajustadas las suspensiones, se procedió a realizar la cuenta de unidades formadoras de colonias (UFC) por mL del inóculo y las adsorbidas por la semilla.

4.1.2.7. Cuenta de UFC por mL

Para la cuenta de UFC se utilizó el método de la gota o de Miles y Misra utilizando asas calibradas y diluciones a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . El método es el siguiente:

1. De las suspensiones con 20 UK se tomaron alícuotas para hacer diluciones anteriores para cada una de las cepas.
2. De las últimas tres diluciones se tomó una asada, se estirió en gelosa nutritiva en tres sectores de las cajas Petri, de esta forma se obtuvieron triplicados.
3. Se colocaron las cajas Petri invertidas en incubadora por un periodo de 24 horas a 35°C; Se registró el recuento como unidades formadoras de colonias.

4.1.2.8. Cuenta de UFC adsorbidas por semilla

La propagación de las semillas se realizó con previa inoculación con las tres cepas de *Azospirillum lipoferum* a través de una suspensión (a una densidad óptica de 20 Unidades Klett) como se describió anteriormente:

1. Las semillas se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio (5% v/v) por 10 minutos y se enjuagaron con agua estéril.

2. Las semillas desinfectadas se colocaron en cajas Petri estériles a las cuales se agregó la suspensión de cada una de las cepas y se dejaron a temperatura ambiente por un periodo de 2 horas.
3. Una vez transcurrido el tiempo, se colocaron 10 semillas en un tubo de ensayo con agua estéril, del cual se tomó una alícuota de 1 mL, y se transfirieron a tubos con agua estéril para tener diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} .
4. De la misma forma que en la sección anterior, se tomó una asada, colocada en gelosa nutritiva en tres sectores en la caja Petri, de esta forma se obtuvieron triplicados y se colocaron las cajas Petri invertidas en incubadora por un periodo de 24 horas a 35°C.
5. Finalmente, se registró la cuenta como unidades formadoras de colonias que se encuentran en las semillas.

4.2. Preparación para la obtención de la cepa de trabajo.

Las semillas fueron desinfectadas y posteriormente inoculadas, y se colocaron en cajas Petri con la concentración seleccionada en la sección 4.1.2.3 en el suelo artificial.

De esta forma se esperó que una de las cepas bacterianas lograra un desarrollo mayor en las raíces y se compararon los resultados de las cuentas con respecto del control.

4.3. Conformación de los sistemas de fito-remediación asistida

Con los bioensayos anteriores se obtuvieron la concentración y la variedad de semilla a utilizar. Las unidades experimentales se presentan en la Tabla 4.2. Durante la experimentación preliminar se efectuó una prueba para determinar la tolerancia y capacidad de degradación del *Azospirillum*. Los resultados negativos se describen en la Sección B.3. Por estos resultados negativos se eliminó la serie de unidades experimentales denominadas como bio-aumentación en la Tabla 4.2:

Tabla 4.2. Distribución de las unidades experimentales.

| Descripción | Suelo | Semilla | Diesel | BPCV |
|---|-------|---------|--------|------|
| Testigo | X | X | | |
| Control 1: Evaporación de diesel | X | | X | |
| Control 2: Presencia de las BPCV | X | | | X |
| Control 3: Presencia de la BPCV en la semilla | X | X | | X |
| Tratamiento: Bio-aumentación | X | | X | X |
| Tratamiento: Fito-remediación | X | X | X | |
| Tratamiento: Fito-remediación asistida | X | X | X | X |

Mediante la utilización del control 1 se determinó la degradación por atenuación natural (degradación por procesos fotolíticos, microbianos y volatilización).

4.4. Monitoreo de propiedades y de los factores de respuesta

Cada uno de los sistemas fue monitoreado para HFM, HA y HAP: al día 0, 10, 22, 37, 52 y 62. Se consideraron tres repeticiones por sistema.

Como variables de respuesta se dio seguimiento al porcentaje de sobrevivencia de las semillas, longitud de raíz y longitud de tallo de la planta, en los días mencionados anteriormente. El porcentaje de sobrevivencia fue medido mediante conteos de aquellos individuos que lograron desarrollar una raíz mayor a 5 mm (donde ya no se consideran plántulas). Las longitudes de raíz y tallo fueron medidas con un vernier.

4.4.1. Análisis de datos experimentales

Se analizaron los datos con el software de SPSS 15.0, mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple de Duncan a $P \leq 0.05$, para comparar las medias.

4.5. Determinación de diesel como hidrocarburos fracción media

La preparación de las muestras de suelo para el análisis del contenido de diesel se realizó secando las muestras al aire por un periodo de 3 a 5 días a temperatura ambiente; una vez secas, se molieron en un mortero de porcelana y se colocaron en frascos de vidrio cerrados con tapa de teflón y colocados en refrigeración a 4°C.

Una vez preparadas las muestras se procedió a la extracción con un equipo Soxhlet por un periodo de 18 horas en una solución de extracción consistente en una mezcla de hexano con diclorometano (1:1). Posteriormente, se concentraron con un equipo rotavapor y se pasaron por una columna cromatográfica empacada con sulfato, sílice, alumina, sulfato de cobre granulado. Después, las muestras fueron evaporadas nuevamente con la ayuda del rotavapor hasta un volumen aproximado de 5 mL transvasándose a viales.

Finalmente, se inyectó a un cromatógrafo de gases para la medición de HFM. Con respecto a los HAP se reconstituyeron con estándares internos de (naftaleno, pireno, criseno y diclorometano) y se inyectaron en el cromatógrafo de gases acoplado a masas (CG-EM).

4.6. Determinación de toxicidad aguda del suelo mediante bioensayos

La evaluación de la toxicidad aguda después del tratamiento del suelo se realizó mediante el uso de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) acorde con lo indicado en la guía 208 de la Organización de Cooperación Económica y Desarrollo (*OECD Guidelines for testing of chemicals*) relativa a la prueba del crecimiento de plantas terrestres (*OECD*; 2003).

La variación a la guía fue la siguiente: se sustituyó el empleo del diesel como sustancia de prueba por el suelo restante de las unidades experimentales. Se tomó el suelo de las unidades experimentales y se dejó secar por un periodo de 3 a 5 días a temperatura ambiente; de igual forma se molieron en un mortero. Se tuvieron un total de 6 sistemas como se muestra en la Tabla 4.3:

Tabla 4.3. Identificación de los sistemas.

| Identificación | Contenido | Nombre |
|----------------|-----------------------------------|---|
| S-Se | Suelo-Semilla | Testigo |
| S-D | Suelo-Diesel | Control 1: Evaporación de diesel |
| S-B | Suelo- BPCV | Control 2: Presencia de la cepa seleccionada de BPCV |
| S-Se-B | Suelo-Semilla- BPCV | Control 3: Presencia de la cepa AZm1 de BPCV en la semilla |
| S-Se-D | Suelo-Semilla- Diesel | Tratamiento 1: Fito-remediación |
| S-Se-D-B | Suelo-Semilla- Diesel- BPCV | Tratamiento 2: Fito-remediación asistida con la cepa seleccionada de BPCV |

Para cada uno de los sistemas se prepararon tres concentraciones distintas: al 1%, al 10%, y 100%, diluyendo con arena lavada con agua destilada y secada al aire por 3 días. Con un control del tratamiento preparado con arena lavada.

Las diferentes concentraciones para cada sistema se colocaron en envases plásticos de 25 mL, en donde se colocaron 5 semillas. La prueba fue realizada por cuadruplicado. Las mediciones se realizaron 5 días después de que el control germinó el 50% de las semillas.

Como variables de respuesta se tomaron los porcentajes de germinación y la elongación radicular. Ambos resultados se resumieron en el índice de germinación (IG), propuesto por Hamdia *et al.* (2007), que se obtiene según la siguiente expresión:

$$IG = \frac{Sg \times Lg}{Sc \times Lc}$$

Ecuación 4.4. Índice de germinación (Hamdia *et al.*, 2007).

Donde:

- Sg Es el número de semillas germinadas;
Lg es la longitud de raíz de las semillas germinadas en mm;
Sc es el número de semillas germinadas en arena lavada con agua destilada como control; y
Lc: es la longitud de raíz de las semillas germinadas en arena lavada control en mm.

4.6.1. Análisis de datos para toxicidad aguda

Se analizaron los datos con el software de SPSS 15.0, mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de rango múltiple de Duncan a $P \leq 0.05$, para comparar las medias.

5. Resultados y discusión

5.1. Caracterización de suelo natural

Se realizó la caracterización de un suelo proveniente de Tierra Blanca, Veracruz, México. Las determinaciones de carbono, fósforo, humedad, materia orgánica, nitrógeno total, pH y textura fueron realizadas con base a los métodos indicados en la metodología. Para la textura se obtuvieron de las fracciones de arena, arcilla y limo. De acuerdo con el triángulo textural el suelo corresponde al tipo franco arcilloso arenoso. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.1.

Tabla 5.1. Resultados de la caracterización del suelo natural de Tierra Blanca, Veracruz.

| Determinación | Resultado suelo Natural | Unidad | Desviación estándar |
|-------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------|
| Carbono total | 1.91 | % | 0.50 |
| Densidad aparente | 1.46 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | 0.45 |
| Densidad real | 2.60 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | 0.26 |
| Porosidad | 51.53 | % | 0.20 |
| Fósforo | 2.0 | $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | 1.20 |
| Humedad | 18.63 | % | 0.16 |
| Materia orgánica | 2.51 | % | 2.51 |
| Nitrógeno (NTK) | 0.17 | % | 0.20 |
| pH | 7.75 | | 0.01 |
| Arena | 44.09 | % | 1.15 |
| Arcilla | 27.91 | % | 1.15 |
| Limo | 28.00 | % | 0 |
| Textura | Franco arcillosa arenosa | | |

5.2. Conformación de suelo artificial

De los resultados de la Tablas 5.1 se obtuvieron las proporciones para armar el suelo o medio artificial que servirá de sustrato para las pruebas posteriores. En la Figura 5.1 se muestran las proporciones utilizadas para armar 100 Kg de suelo:

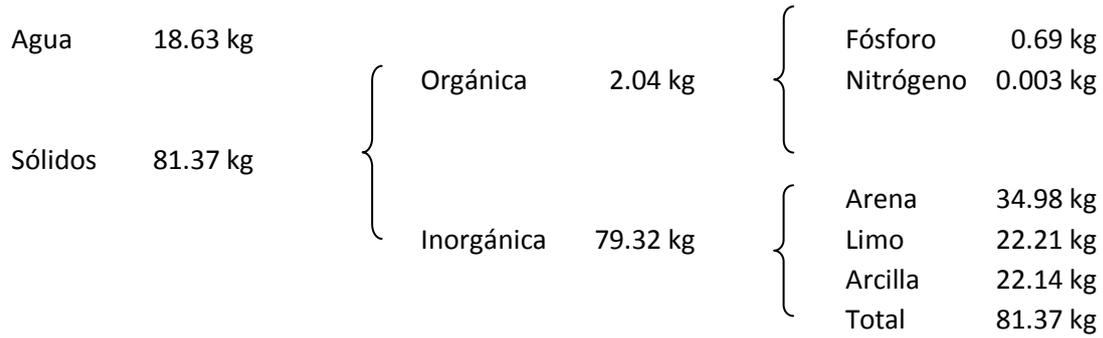


Figura 5.1. Diagrama para la conformación de suelo artificial.

Para la elaboración del suelo artificial se empleó agua destilada, y se utilizó materia orgánica comercial cuyas características están en la Tabla 5.2:

Tabla 5.2. Caracterización de la materia orgánica comercial.

| Determinación | Resultado | Unidades |
|-------------------------------|-----------|---------------------|
| Peso del bulto | 30.00 | kg |
| P ₂ O ₅ | 85.00 | % |
| Fósforo | 22.44 | kg |
| Nitrógeno total | 39.00 | mg·Kg ⁻¹ |
| Ác. Húmicos | 10.70 | % |
| Humus | 60.00 | % |
| K ₂ O | 29.00 | mg·Kg ⁻¹ |
| Azufre | 18.40 | mg·Kg ⁻¹ |
| Magnesio | 13.60 | mg·Kg ⁻¹ |
| Calcio | 74.00 | mg·Kg ⁻¹ |

Con respecto a la parte inorgánica del suelo, se incorporó arena sílica tamizada a malla 110-100. El limo fue feldespato sódico en malla 200-400 y finalmente, la arcilla fue caolinita con tamaño de malla mayor a 400. Los dos primeros materiales fueron conseguidos comercialmente, en tanto el tercero fue donado por el laboratorio de Mecánica de Suelos de la Facultad de Ingeniería de la UNAM.

Para impedir contaminación externa, los materiales se mezclaron sobre una lona con palas previamente lavadas. La Figura 5.2 ilustra el proceso de conformación del suelo artificial.



Figura 5.2. Conformación del suelo artificial: a) colocación de los materiales secos (arena, limo, arcilla y materia orgánica), b) mezclado de los materiales, c) adición de agua destilada al suelo artificial para igualar humedad, d) mezclado de los materiales, e) almacenamiento del suelo conformado.

5.3. Caracterización de suelo artificial

Se realizó la caracterización del suelo artificial. Las determinaciones de carbono, fósforo, humedad, materia orgánica, nitrógeno total, pH y textura fueron realizadas con base a los métodos indicados en la sección de metodología. Los resultados se encuentran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Resultados de la caracterización inicial del suelo artificial.

| Determinación | Resultado | Unidad | Desviación Estándar |
|-------------------|---------------------------------|-------------------------------|---------------------|
| Carbono | 1.96 | % | |
| Densidad aparente | 1.26 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | 0.45 |
| Densidad real | 1.81 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ | 0.26 |
| Porosidad | 30.38 | % | 0.58 |
| Fósforo | 1.16 | % | 0.096 |
| Humedad | 23.12 | % | 0.43 |
| Materia orgánica | 2.54 | % | 2.51 |
| Nitrógeno | 0.12 | % | 0.30 |
| pH | 7.60 | | 0.01 |
| Arena | 45.09 | % | 1.15 |
| Arcilla | 27.91 | % | 1.15 |
| Limo | 28.00 | % | 1.15 |
| Textura | Franco arcillosa arenosa | | |

De acuerdo con el triángulo textural el suelo artificial corresponde al tipo franco arcilloso arenoso. Es decir, se obtuvo un suelo artificial con características similares al suelo natural con excepción de las propiedades físicas de densidad aparente y densidad real. En la Tabla 5.4 se realiza la comparación de ambos resultados.

Tabla 5.4. Comparativo de las características del suelo natural y el suelo artificial.

| Determinación | Resultado suelo natural | Resultado suelo artificial | Unidad |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Carbono total | 1.91 | 1.96 | % |
| Densidad aparente | 1.46 | 1.26 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ |
| Densidad real | 2.60 | 1.81 | $\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ |
| Fósforo | 2.00 | 1.16 | % |
| Humedad | 18.63 | 23.12 | % |
| Materia orgánica | 2.51 | 2.54 | % |
| Nitrógeno (NTK) | 0.17 | 0.12 | % |
| Porosidad | 51.53 | 30.38 | % |
| pH | 7.75 | 7.60 | |
| Textura | Franco arcillosa arenosa | Franco arcillosa arenosa | |

El suelo artificial resultó tener las siguientes características según la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000:

Es un suelo artificial que obtuvo una densidad aparente y real semejantes a las de un suelo arenoso ($> 1.32 \text{ g}\cdot\text{cm}^{-3}$), por ser suelo no volcánico presentó una concentración de materia orgánica media (1.6 a 3.5 %), con una baja concentración de carbono, nitrógeno (NTK) y fósforo disponible ($<5.5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ de P), es un suelo medianamente alcalino (con un pH de 7.4 a 8.5) para una textura franco arcillosa arenosa (Cra).

5.4. Prueba de viabilidad de semillas de plantas vasculares

En la Tabla 5.5 se presentan los resultados de la prueba de viabilidad de semillas. Las semillas que mostraron mayor viabilidad fueron: ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) (en adelante RPT) (obtenida de un primer lote), alfalfa española (AE) y trébol rojo (TR). En la Figura 5.5 se observan dichos resultados.

Tabla 5.5. Resultados del porcentaje de germinación.

| No. | Semilla | Porcentaje de germinación (%) | Desviación estándar |
|-----|---------------------------|-------------------------------|---------------------|
| 1. | RPT (lote 1) | 96.67 | 5.77 |
| 2. | Alfalfa española | 90.00 | 10.00 |
| 3. | Trébol rojo | 86.67 | 15.27 |
| 4. | Ryegrass guf hoja delgada | 83.33 | 20.82 |
| 5. | Ryegrass anual guf | 80.00 | 20.00 |
| 6. | Ryegrass perene linn | 73.33 | 11.55 |
| 7. | RPT (lote 2) | 72.5 | 15.28 |
| 8. | Ryegrass perene | 66.67 | 11.55 |
| 9. | Pasto Festuca | 30.00 | 20.00 |
| 10. | Pasto Orchard | 20.00 | 10.00 |

Para que una semilla obtenga una germinación óptima, ésta tiene que tener un porcentaje de germinación igual o mayor a 95%. De la prueba de germinación, el RPT presentó la más alta germinación con respecto a las demás gramíneas utilizadas con un 96.67 % de respuesta germinativa.

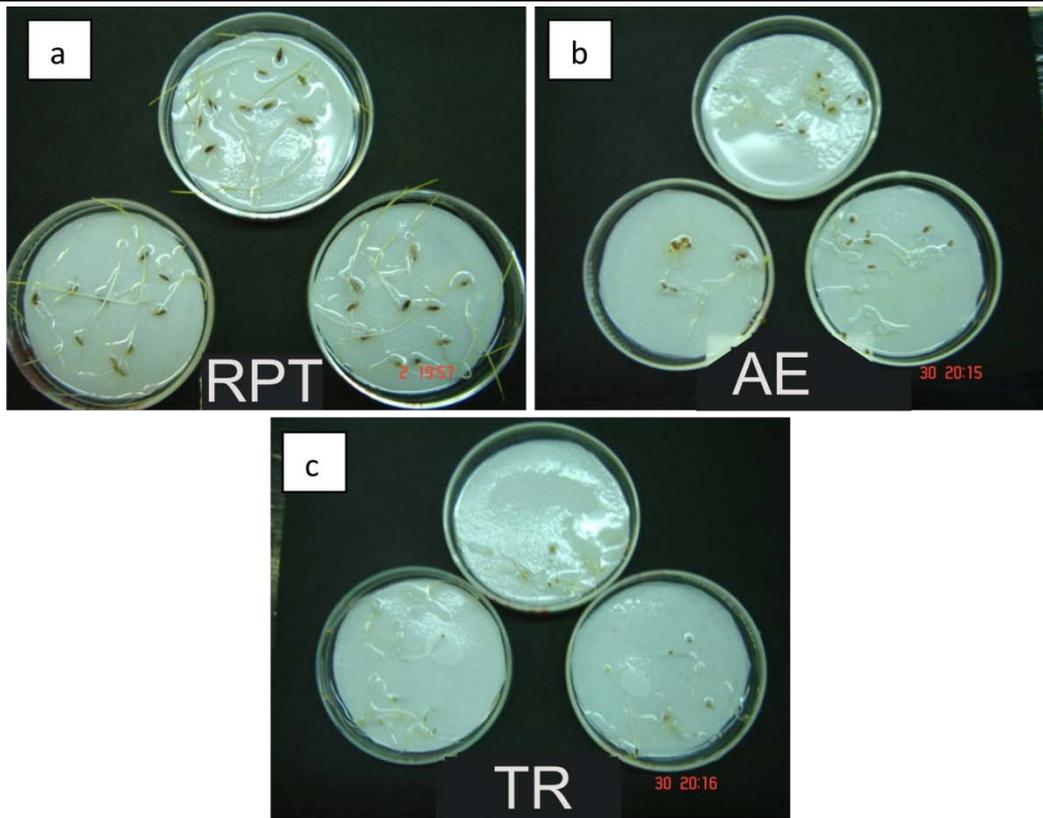


Figura 5.3. Vista de los mejores tres resultados en la prueba de germinación:
a) RPT del lote 1, b) alfalfa española, c) trébol rojo.

5.5. Bioensayos de toxicidad

Para obtener la concentración de trabajo se realizaron pruebas preliminares cuyos resultados se encuentran en el Anexo B. En la Figura 5.4 se muestra el promedio de los resultados finales, teniendo en general desviaciones estándares de 1.

Con los resultados se realizó regresión lineal, obteniéndose la siguiente expresión:

$$M(\%) = 0.004C - 10.03$$

Ecuación 5.1. Modelo lineal de porcentaje de mortandad en semillas en suelo contaminado con diesel.

Donde:

M(%) es el porcentaje de mortalidad en por ciento, y

C es la concentración del diesel en el suelo en $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$.

La ecuación anterior hace posible obtener la concentración letal (CL_{50}) de la siguiente forma:

$$CL_{50} = \frac{[M(50)] + 10.03}{0.004}$$

Ecuación 5.2. Concentración letal en semillas de RPT para suelo contaminado con diesel.

Donde:

M(50) es el porcentaje de mortalidad al 50 por ciento, y

CL₅₀ es la concentración letal del diesel en el suelo en mg·kg⁻¹.

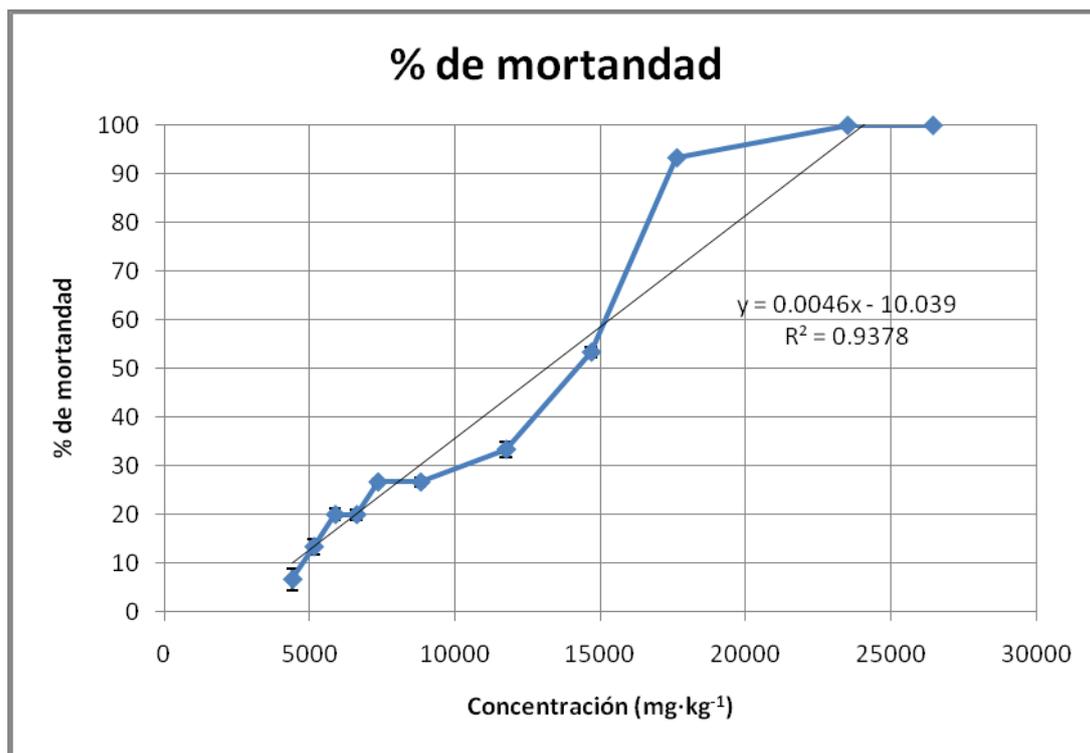


Figura 5.4. Concentración de diesel en suelo expresada en mg·kg⁻¹ vs. porcentaje de mortandad de semillas (%).

Con esto fue posible obtener la dosis de trabajo a 15 007.50 mg·kg⁻¹, que para fines prácticos se ajustó a una concentración teórica de 15 000 mg·kg⁻¹. Posteriormente, se determinó la concentración de HFM real mediante el análisis por cromatografía de gases, obteniéndose una concentración real de trabajo de 10 522 mg·kg⁻¹.

De acuerdo con las pruebas de concentración letal, se utilizó una concentración teórica de 15 000 mg·kg⁻¹ que resulta ser 12.5 veces más alta que lo reglamentado para fracción media por la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, de 1 200 mg·kg⁻¹ para uso de suelo residencial y agrícola, en tanto la concentración real inicial (al día cero) resultó ser 10 522 mg·kg⁻¹ que es 8.77 veces más alto que el límite máximo permisible.

5.6. Selección de la cepa de trabajo

Sabiendo que las cepas de trabajo eran puras, se confirmaron los resultados para cada una de las tres cepas específicas de *Azospirillum* (AZm1, AZm3 y AZm5) a través de tinciones de Gram para su identificación morfológica y observaciones en fresco.

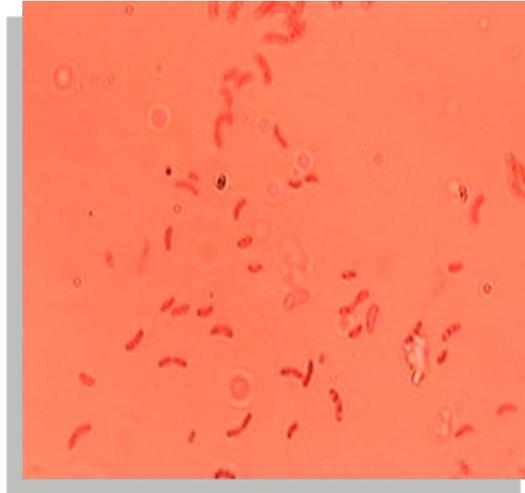


Figura 5.5. *Azospirillum* en tinción de Gram.

En las tinciones de Gram y las observaciones al microscopio en fresco se confirmó el tener cepas puras para realizar las cuentas. Además en antes de realizar las inoculaciones se realizaron las confirmaciones de pureza de las mismas.

5.6.1. Cuenta de UFC en el inóculo

Se utilizaron asas calibradas y diluciones a 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} . Se obtuvieron los resultados que se muestran en las tablas del Anexo A: Tabla A.1 a la A.3. En la Figura 5.6 se presenta un resumen de dichos resultados, para cada una de las cepas de las BPCV.

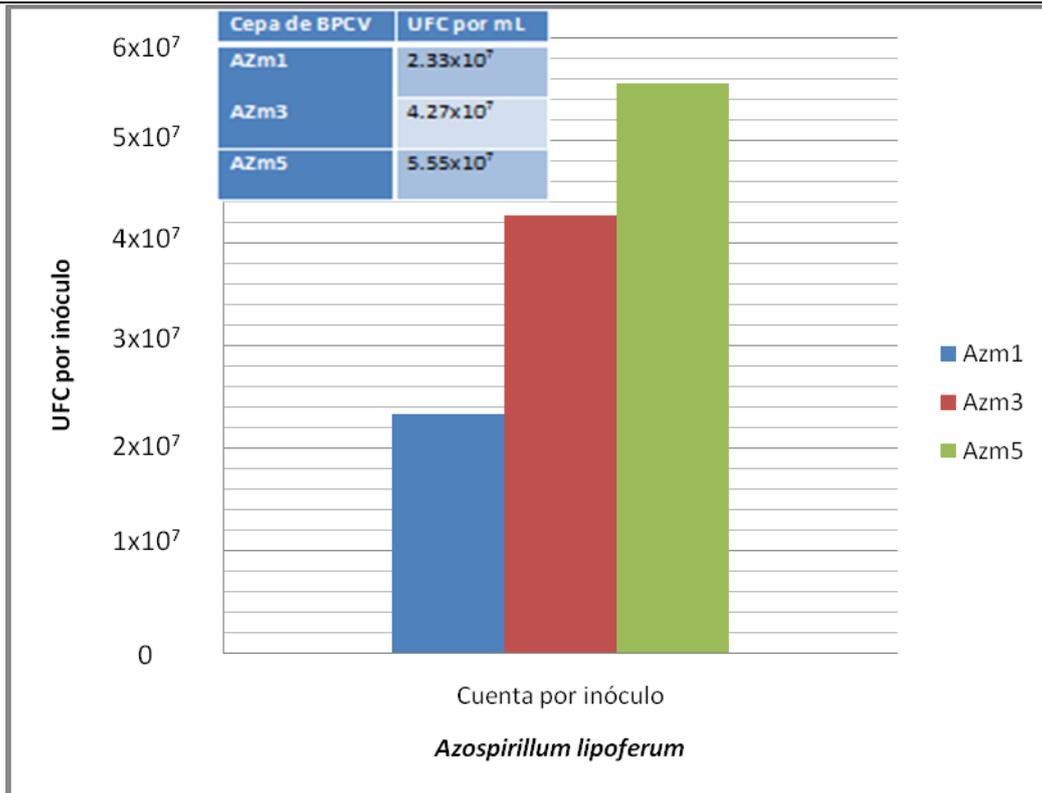


Figura 5.6. Resumen de la cuenta de UFC de *Azospirillum lipoferum* por mL.

La cepa que presentó una mayor densidad bacteriana por mililitro fue AZm5.

5.6.2. Cuenta de UFC adsorbida por la semilla

Una vez obtenida la cuenta de bacterias por mL, se obtuvo la cuenta de UFC adsorbidas al endosperma de la semilla (los resultados se encuentran en el Anexo A, tablas de la A.4 a la A.6). El resumen de los resultados se encuentra en la Figura 5.7:

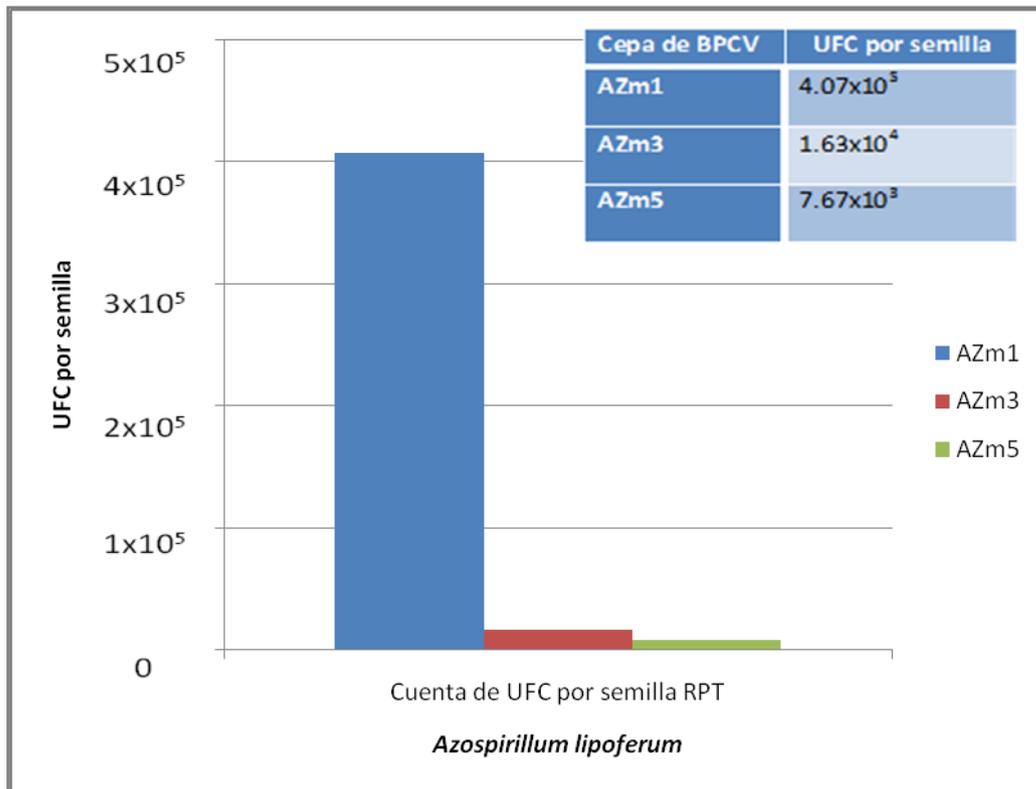


Figura 5.7. Resumen de la cuenta de UFC de *Azospirillum lipoferum* por semilla.

La cepa de *Azospirillum* que presentó una mayor fijación al endosperma de la semilla fue AZm1, por tal motivo fue seleccionada como la cepa de trabajo.

La cepa de BPCV con una mayor densidad bacteriana por mL con respecto a las otras fue la AZm5 (5.5×10^7 UFC). Además de esta prueba de cuentas bacterianas se utilizó la prueba de adsorción de la cepa al endosperma de la semilla en donde AZm1 obtuvo una mayor adsorción (2.33×10^7 UFC), adsorbiendo un 57.63% más que la AZm5. Por tal motivo se utilizó AZm1 como cepa de trabajo.

5.7. Montaje de las unidades experimentales

Las unidades experimentales se colocaron en vasos de vidrio de tipo comercial de 125 mL lavados previamente con agua acidulada y enjuagados con agua destilada. Posteriormente, se cubrieron con papel antiadherente para evitar interferencia por contaminación. Teniendo un total de 90 vasos distribuidos para los 62 días de tratamiento. En la Tabla 5.8 se muestra la nomenclatura y la distribución de las unidades experimentales.

El suelo artificial se contaminó en dos lotes de 14 kg, a con un contenido de agua de $17.32 \pm 3\%$ y se mezcló con agrolita (material inerte) para mejorar la estructura del suelo. Un lote fue adicionado con diesel. El suelo contaminado se dejó reposar por 20

días para estabilizar el suelo artificial contaminado. En las Tablas 5.6 y 5.6 se resumen la cantidad de componentes para la integración de cada uno de los lotes:

Tabla 5.6. Nomenclatura y distribución de las unidades experimentales (S- Suelo, Se – Semilla de RPT, D-Diesel, B –AZm1).

| Descripción | Bloque a Al día 10 | Bloque b Al día 22 | Bloque c Al día 37 | Bloque d Al día 52 | Bloque d Al día 62 |
|--|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Testigo | S-Se- a- | S-Se-b | S-Se-c | S-Se-d | S-Se-e |
| Testigo 2: Atenuación natural | S-D-a | S-D-b | S-D-c | S-D-d | S-D-e |
| Control 2: Presencia de las BPCV | S-B-a | S-B-b | S-B-c | S-B-d | S-B-e |
| Control 3: Presencia de la BPCV en la semilla | S-Se-B-a | S-Se-B-b | S-Se-B-c | S-Se-B-d | S-Se-B-e |
| Tratamiento: Fito- remediación | S-Se-D-a | S-Se-D-b | S-Se-D-c | S-Se-D-d | S-Se-D-e |
| Tratamiento: Fito- remediación asistida | S-Se-D-B-a | S-Se-D-B-b | S-Se-D-B-c | S-Se-D-B-d | S-Se-D-B-e |

Tabla 5.7. Resumen de componentes para la preparación de suelo artificial en lotes en las unidades experimentales.

| Componente | Lote 1 | Lote 2 |
|---|-----------|-----------|
| Masa total (g) | 14 000.00 | 14 000.00 |
| Concentración teórica de diesel en suelo ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) | 15 000.00 | 0 |
| Volumen de diesel calculado (mL) | 215.38 | 0 |
| Masa de agrolita (g) | 606.00 | 606.00 |

En cada unidad experimental se colocaron 150 g de suelo artificial contaminado y 25 semillas de RPT. Una vez colocadas las semillas se esparció ligeramente y en poca cantidad, agrolita, con el fin de evitar compactación por riego (Figura 5.8).

El montaje de las unidades experimentales se separaron en dos grupos aquellas que se inocularían con la cepa de trabajo (AZm1) y las que no. Para la inoculación se siguió la primera parte del método de propagación de la cepa que se encuentra descrito en la sección 4.1.2.6. Una vez que las semillas fueron inoculadas de forma endógena (refiriéndose a la localización de la colonización de las bacterias adsorbidas en la

semilla; Bashan, 2005) se sembraron en la superficie del suelo artificial preparado, y para asegurar la presencia de las bacterias re-inoculó el suelo, es decir, añadiendo un mL del inóculo al suelo con las semillas. Posteriormente, se siguió el mismo procedimiento de esparcir la agrolita y regar con agua de la llave. En la Figura 5.9 se muestra la secuencia en general.

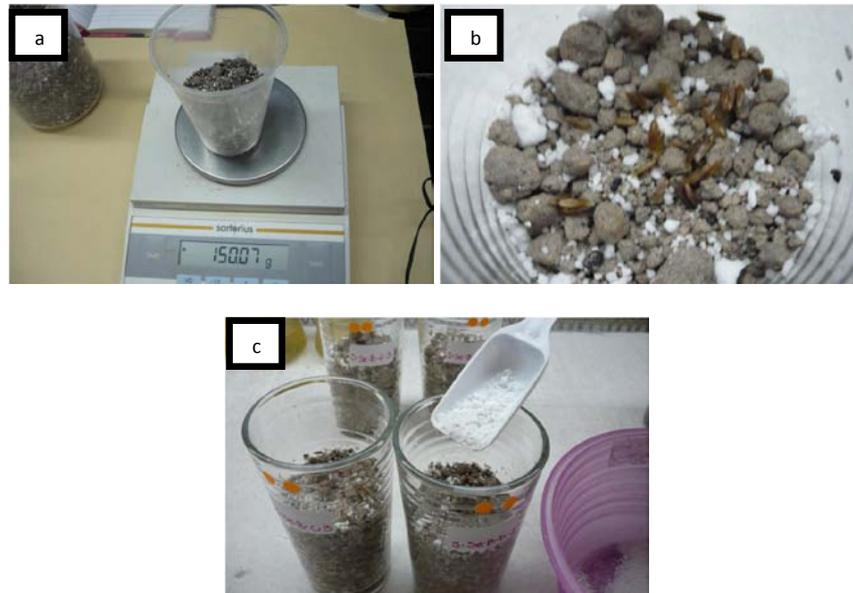


Figura 5.8. a) Pesado de suelo artificial preparado, b) colocación de semillas, y c) colocación de agrolita.

Una vez montadas las 90 unidades experimentales se colocaron bolsas oscuras con ligas para evitar el paso de la luz. Las unidades listas se colocaron en un cuarto incubación a $30\pm 5^{\circ}\text{C}$. La revisión de cada unidad experimental se realizó diariamente y se regó cada dos días. Una vez que las semillas germinaron se colocaron a una temperatura de $20\pm 5^{\circ}\text{C}$ (Figura 5.10).

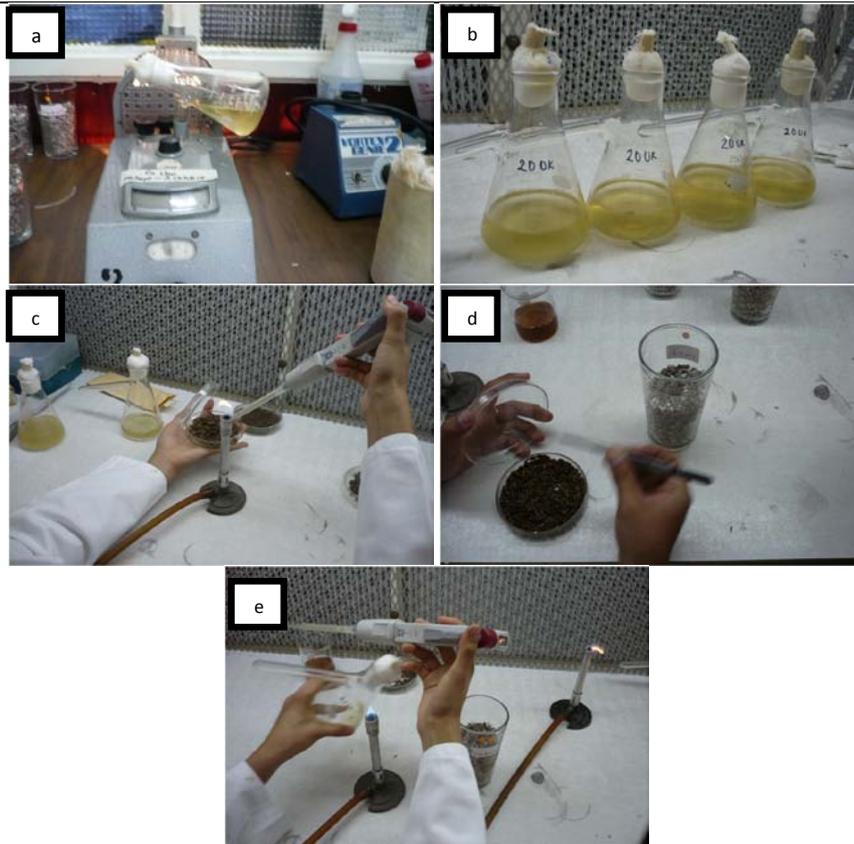


Figura 5.9. a) Estandarización con nefelómetro, b) suspensión estandarizada a 20 UK, c) inoculación endógena, d) sembrado de semillas inoculadas, y e) inoculación exógena.



Figura 5.10. a) colocación de bolsas oscuras para impedir el paso de la luz durante el periodo de germinación, b) colocación en el cuarto de incubación, y c) germinación de las semillas de RPT en unidades experimentales a una semana del montaje.

5.8. Monitoreo de las unidades experimentales

Una vez que se montaron las unidades experimentales en el laboratorio, se dio seguimiento al porcentaje de sobrevivencia, longitud de raíz y longitud de tallo como variables de respuesta, por un tiempo total de 62 días con los siguientes tiempos: 10, 22, 37, 52 y 62 días. Durante el tratamiento no se agregó ningún tipo de fertilizante para no afectar el tratamiento.

5.8.1. Porcentaje de sobrevivencia

En la Figura 5.11 se muestran los resultados graficados para el porcentaje de sobrevivencia.

La sobrevivencia de las plántulas durante los primeros diez días del testigo (constituida por la planta germinada en el suelo artificial) está por arriba del control 3 (aquel que contiene la presencia de la cepa de AZm1) e incluso de ambos tratamientos (fito-remediación convencional y la fito-remediación asistida. Conforme pasa el tiempo el control y la fito-remediación asistida describen curvas similares; empero, éste tratamiento se encuentra por debajo del control. Finalmente todas, las curvas tienden a una estabilidad en aproximadamente el 70 por ciento de sobrevivencia quedando 10% por arriba del testigo.

Aparentemente la fito-remediación asistida comparada con la fito-remediación convencional presentó una menor germinación que las demás. Para poder determinar esto, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los tratamientos con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre ambos tratamientos realizando pruebas del rango múltiple de Duncan con el programa SPSS versión 15.0. El análisis estadístico mostró que no existen diferencias significativas entre los tratamientos (convencional y la fito-remediación asistida con AZm1) y de la misma forma son estadísticamente iguales el control con la presencia de AZm1 y la atenuación natural. Además la fito-remediación fue estadísticamente diferente del control y el testigo. Esto quiere decir, que la presencia de AZm1 en la planta incrementó el porcentaje de sobrevivencia, pero aquellas contaminadas con diesel disminuyeron la sobrevivencia haciéndolo estadísticamente igual a la fito-remediación convencional.

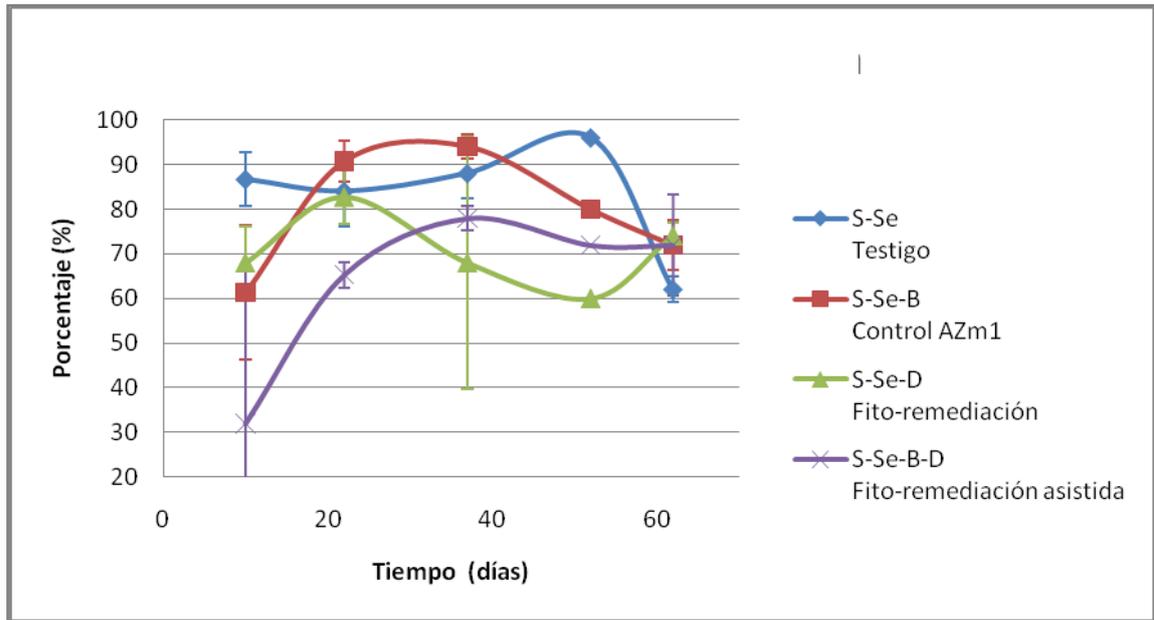


Figura 5.11. Porcentaje de supervivencia durante el monitoreo de las unidades experimentales.

5.8.2. Longitud de la raíz y del tallo

En las Figuras 5.12 y 5.13 se muestran los resultados graficados para la longitud de raíz y del tallo, respectivamente.

En la longitud radicular, durante los primeros diez días, el testigo, la fito-remediación convencional con RPT y fito-remediación asistida con AZm1 se encuentran arriba de los 40 mm de longitud en la raíz y por debajo de éstas, con una longitud radicular de aproximadamente 30 mm, se encuentra el control. Conforme pasa el tiempo, hasta el día 37, se encuentran divididos los tratamientos, con una menor supervivencia en aquellos donde se tiene la presencia de las bacterias (la longitud de la raíz se encuentra alrededor los 40 mm de longitud). Al día 52 hasta el final del tratamiento hay un crecimiento en la raíz; sin embargo, la presencia de las bacterias hace que la longitud radicular se vea ligeramente disminuida.

Con respecto a la longitud radicular, el análisis estadístico muestra que no existen diferencias significativas entre testigo y la fito-remediación convencional, de igual forma, no existen diferencias significativas entre el control con la presencia de AZm1 y la fito-remediación con RPT asistida con AZm1.

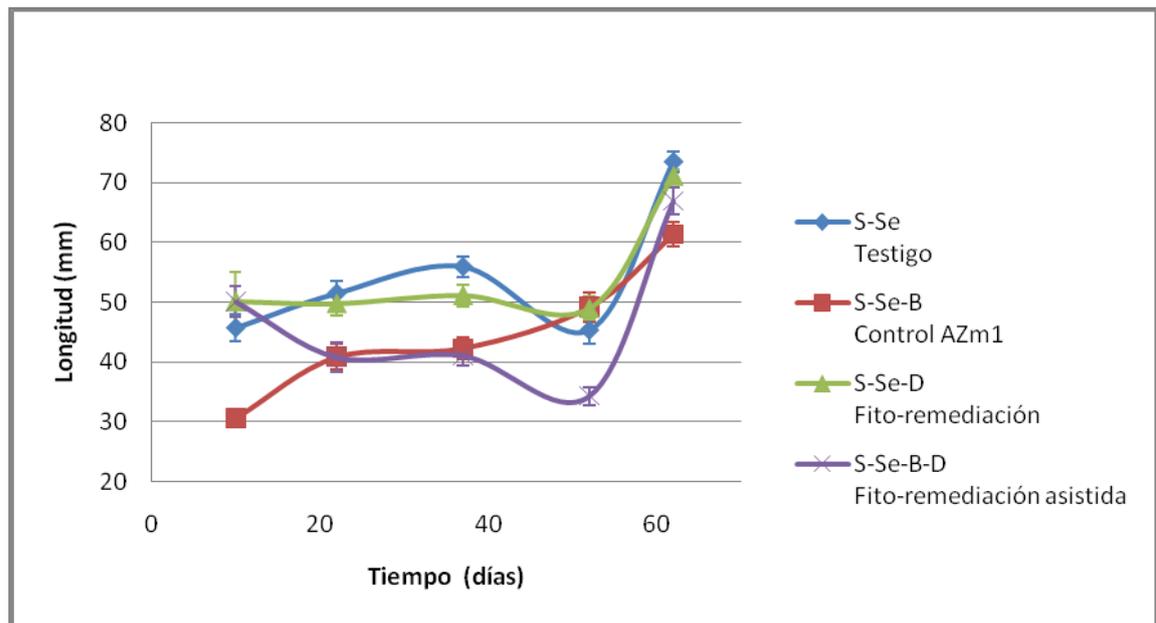


Figura 5.12. Longitud de la raíz durante el monitoreo de las unidades experimentales.

En la longitud del tallo (Figura 5.13), durante los primeros diez días, el tallo del testigo, presentó una longitud promedio de 1 250 mm aproximadamente, siendo la mayor longitud en ese periodo e incluso para el segundo periodo, la fito-remediación asistida con AZm1 obtuvo una menor longitud de tallo con un promedio aproximado de 833 mm; sin embargo, logra recuperarse, manteniéndose constante hasta alcanzar al testigo en el último periodo. El control con AZm1 presenta una gran variabilidad durante los periodos intermedios junto con la fito-remediación convencional, es ésta la que logra incrementar la longitud del tallo en el último periodo (día 62), alcanzando los 1 500 mm.

Para la longitud del tallo en el análisis estadístico, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, el control y el testigo.

Es decir, la presencia de la cepa AZm1 en los arreglos experimentales no incrementó el desarrollo radicular ni del tallo, lo cual sería importante para alcanzar mayores profundidades dentro de un eventual tratamiento real.

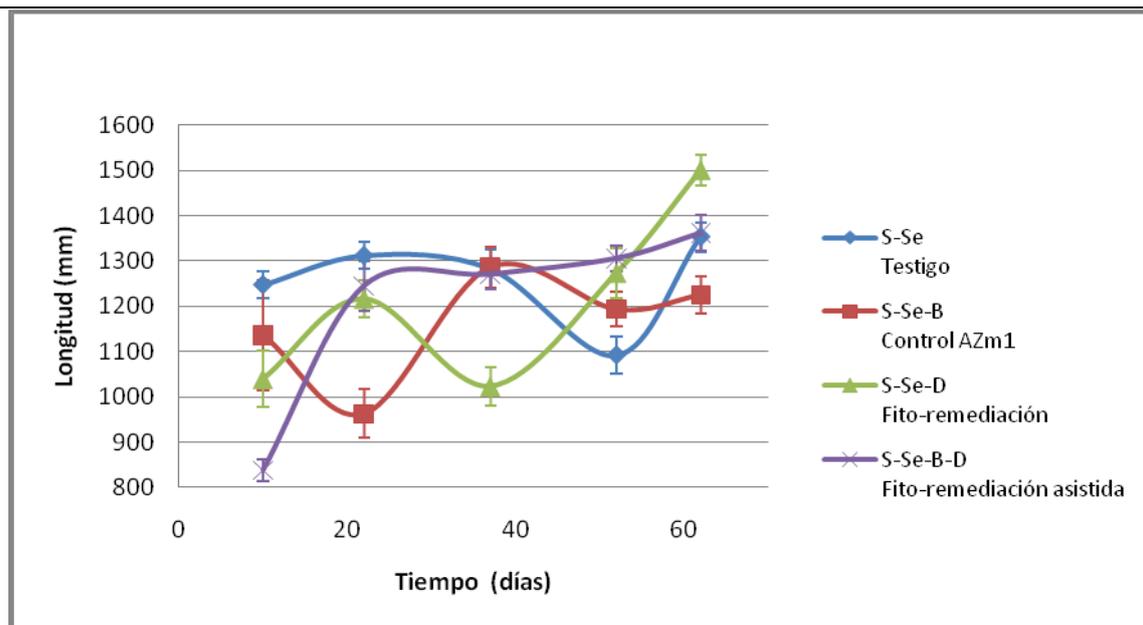


Figura 5.13. Longitud de la tallo durante el monitoreo de las unidades experimentales.

Además de los resultados del desarrollo físico de la planta, se analizaron HFM, HA e HAP. Los resultados para el tiempo cero y los dos primeros periodos fueron por triplicado; no obstante, para los tres últimos periodos se tuvieron duplicados, debido a que se extendió el tiempo del tratamiento.

5.8.3. Concentración de hidrocarburos

Se dio seguimiento a la concentración de hidrocarburos de fracción media (HFM), alifáticos (HA) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Los resultados se encuentran en las Tablas del Anexo C.

La concentración HFM se obtuvo haciendo la relación de las integraciones de las áreas de los cromatogramas correspondientes a los hidrocarburos C_{10} al C_{28} . En la Figura 5.14 se muestran los resultados en una gráfica de tiempo en días contra concentración de HFM expresados en $mg \cdot kg^{-1}$ con las curvas pertenecientes al testigo (en adelante se hará referencia como atenuación natural), fito-remediación convencional con RPT y la asistida con AZm1. Se puede observar a la atenuación natural por arriba de ambos tratamientos. La concentración inicial de las tres es de $10\ 522.42\ mg \cdot kg^{-1}$. Los tratamientos al día 62 obtuvieron una concentración de $1\ 770.92$ y de $1\ 733.04\ mg \cdot kg^{-1}$ para la fito-remediación y la fito-remediación asistida, respectivamente; mientras que el testigo finalizó con una concentración de $7\ 177.05\ mg \cdot kg^{-1}$.

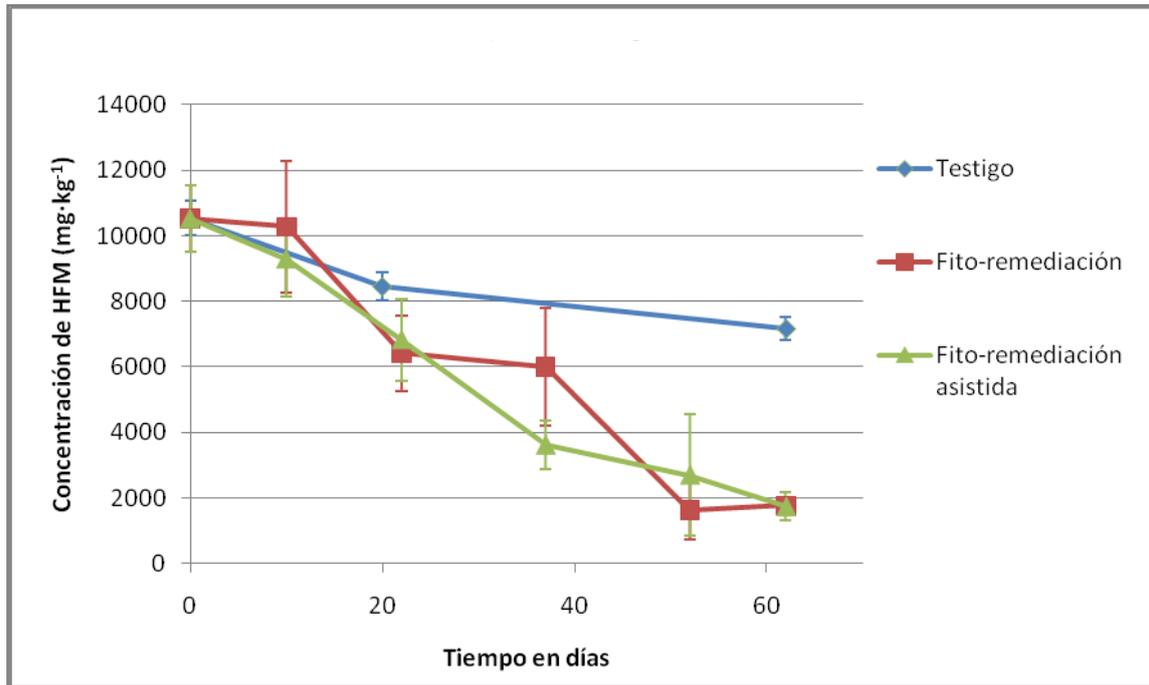


Figura 5.14. Monitoreo de la concentración de HFM vs. tiempo.

Para concentración de hidrocarburos alifáticos (HA) fue calculada utilizando los picos del cromatograma comparados con un estándar mismos que fueron integrados por el mismo equipo cromatográfico, tomando los picos que se encuentran entre los hidrocarburos C₁₀ al C₂₈. En la Figura 5.15 se muestran los resultados en una gráfica de tiempo en días contra concentración de HA expresados en mg·kg⁻¹ con las curvas de atenuación natural, fito-remediación convencional con RPT y la asistida con AZm1. De la gráfica se puede observar a la atenuación natural por arriba de ambos tratamientos, de igual forma, que durante el monitoreo de HFM. Por la parte de los tratamientos, se realizó un análisis estadístico para observar la existencia significativa entre ellos. Estos resultados se describen en la sección 5.6.4. La concentración inicial de las tres es de 1 215.08 mg·kg⁻¹. Los tratamientos de fito-remediación y fito-remediación asistida al día 62 obtuvieron una concentración de 657.92 y de 423.61 mg·kg⁻¹, respectivamente; mientras que la atenuación natural finalizó con una concentración de 723.20 mg·kg⁻¹.

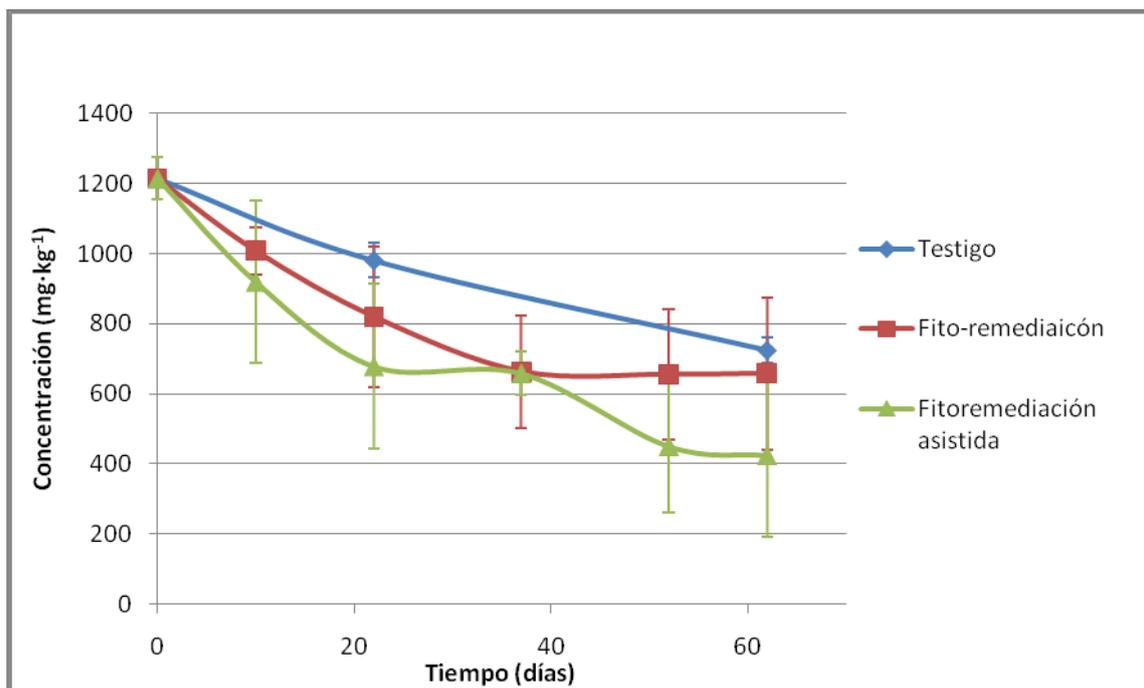


Figura 5.15. Monitoreo de la concentración de HA vs. tiempo.

Para concentración de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), se utilizaron los picos del cromatógrafo comparados con un estándar; los picos fueron integrados por el mismo equipo cromatográfico. Además, el cromatograma muestra toda la serie de HAP; sin embargo, para poder tener un punto de comparación con los límites máximos permisibles de la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, solo se tomaron en cuenta los seis HAP listados los cuales son: benzo[a,h]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluranteno, benzo[k]fluoranteno, e indeno (1,2,3-cd) pireno . En Figura 5.16 no se observan diferencias entre el testigo y los tratamientos por lo que es necesario realizar el análisis estadístico y observar la existencia de diferencias significativas entre ellos, mismos que se encuentran en la sección 5.6.4. La concentración inicial de las tres es de 23.04 mg·kg⁻¹. La atenuación natural, la fito-remediación convencional y la fito-remediación asistida alcanzaron al día 62 una concentración de 23.95, 18.34 y 20.95 mg·kg⁻¹, respectivamente.

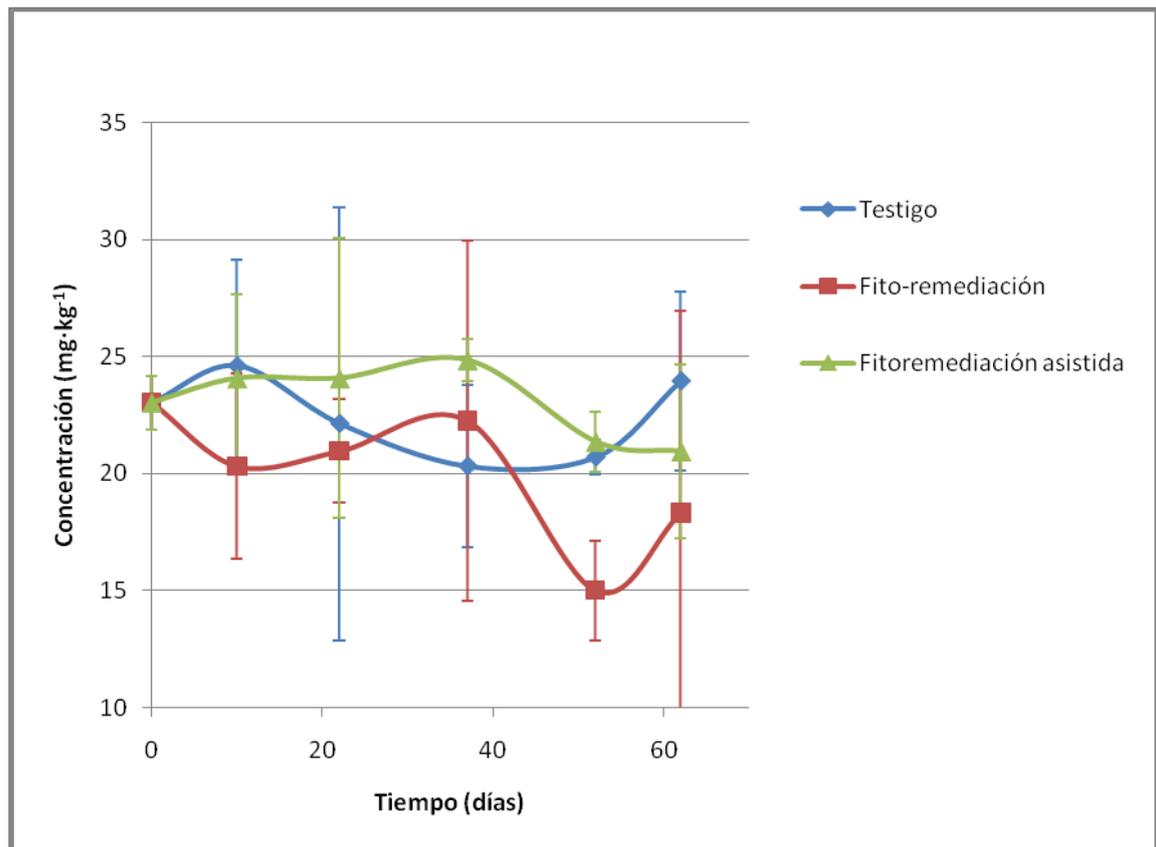


Figura 5.16. Monitoreo de la concentración de HAP vs. tiempo.

5.8.4. Análisis estadístico de la concentración de hidrocarburos

El análisis estadístico de la concentración de HFM para la fito-remediación convencional y para la fito-remediación asistida con AZm1 muestran concentraciones medias de 5 571.23 mg·kg⁻¹ y de 6 675.68 mg·kg⁻¹, respectivamente. Presentando una mayor concentración en la fito-remediación asistida que en la fito-remediación convencional.

Opuesto a lo anterior, se encuentran las concentraciones de HA con 6 228.86 mg·kg⁻¹ para la fito-remediación con convencional y de 4 269.39 mg·kg⁻¹ para la fito-remediación asistida con AZm1. Siendo menor la fito-remediación asistida que la convencional.

Para la concentración de HAP según la prueba de rangos múltiples de Duncan, no se observaron diferencias significativas entre el testigo y los tratamientos.

5.9. Determinación de las remoción, eficiencia y velocidad de degradación

En la Tabla 5.8 se presentan la remoción de HFM, HA y de HAP para la atenuación natural (Testigo) y ambos tratamientos; tomando la diferencia de la concentración promedio inicial y final (C_0-C_f).

Para los tres tipos de hidrocarburos, se observó una mayor remoción en el tratamiento de fito-remediación asistida por la cepa de AZm1 y el testigo presentó una menor remoción del hidrocarburo.

Tabla 5.8. Remoción de HFM, HA y HAP.

| | Remoción de HFM C_0-C_f $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | Remoción HA C_0-C_f $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ | Remoción HAP C_0-C_f $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ |
|--------------------------------------|---|--|---|
| Testigo | 6 536.84 | 491.89 | 0.64 |
| Fito-remediación | 9 751.50 | 557.16 | 1.99 |
| Fito-remediación asistida | 9 789.39 | 791.47 | 3.13 |

Una presentación de los resultados anteriores a lo largo del tiempo es la eficiencia del tratamiento $[(C_0-C_f)\times 100/C_0]$ durante el tratamiento experimental. En las Figuras 5.17, 5.18 y 5.19 se presentan la eficiencia del tratamiento de HFM, HA y HAP.

Las figuras presentan tiempo en días contra eficiencia de remoción en promedio para cada periodo, expresadas en porcentaje. Nuevamente, se observa una mayor remoción en los tratamientos que en el testigo, tanto para HFM como para HA (Figuras 5.17 y 5.18). En la Figura 5.19 se observa una mayor eficiencia de remoción en la fito-remediación; en cambio, en el análisis estadístico se determinó que no existen diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo. En esta última Figura se pueden observar resultados con valores negativos puesto que las concentraciones intermedias y finales excedían a la inicial.

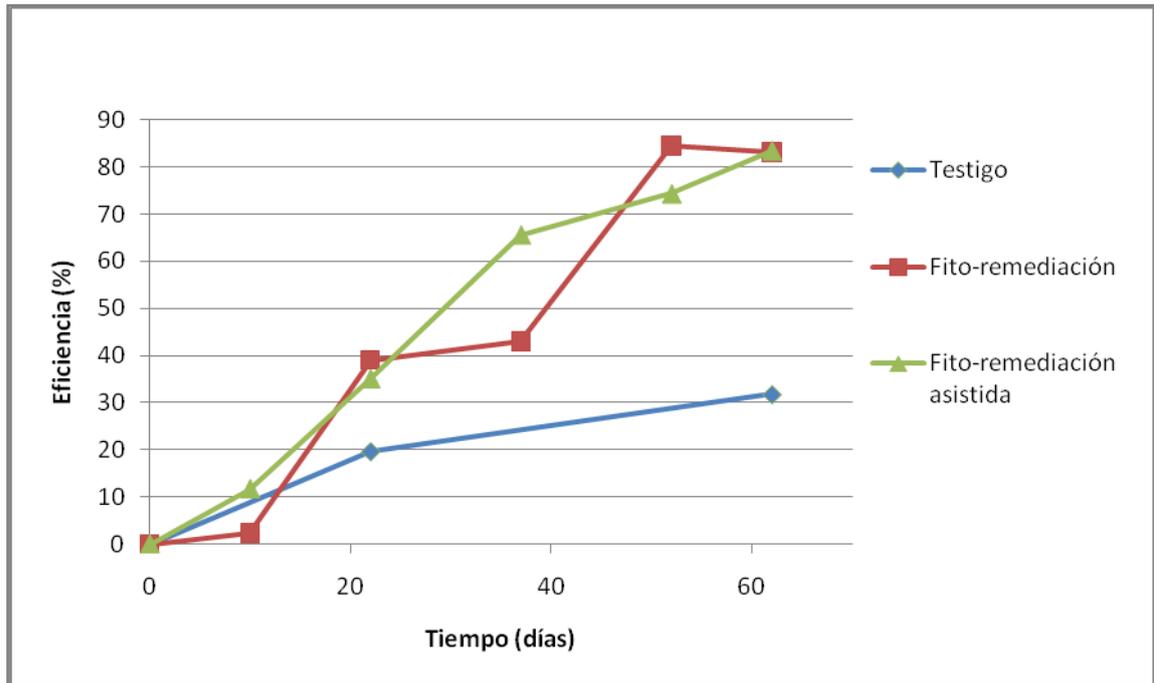


Figura 5.17. Eficiencia de remoción para HFM.

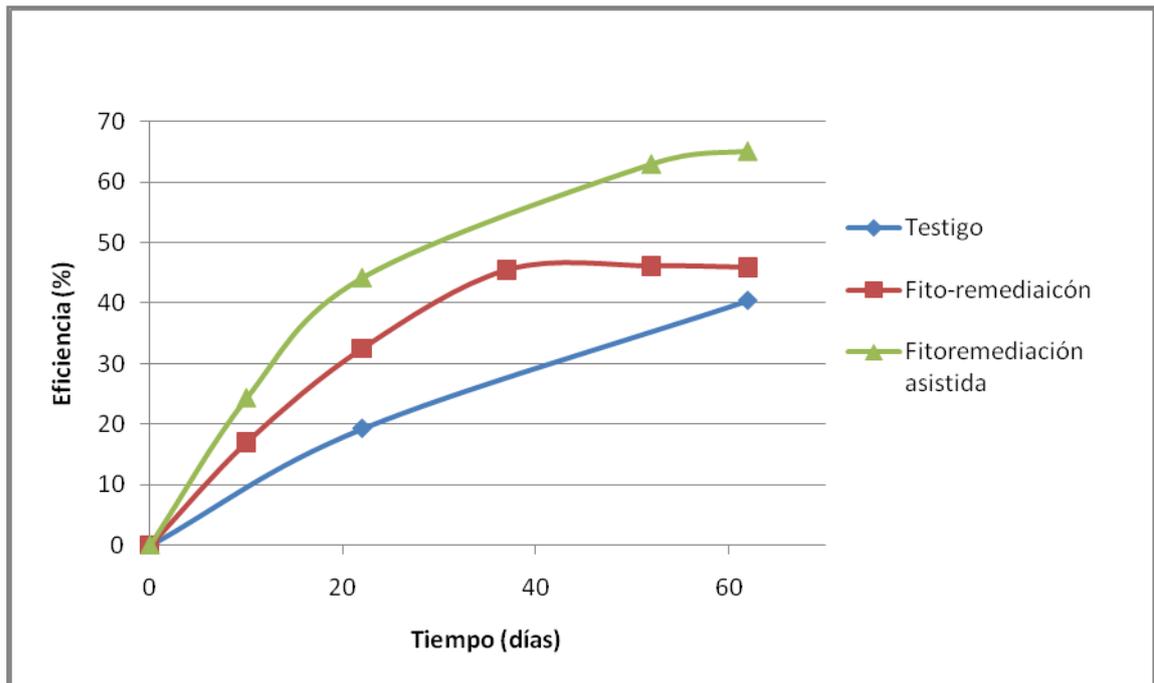


Figura 5.18. Eficiencia de remoción para HA.

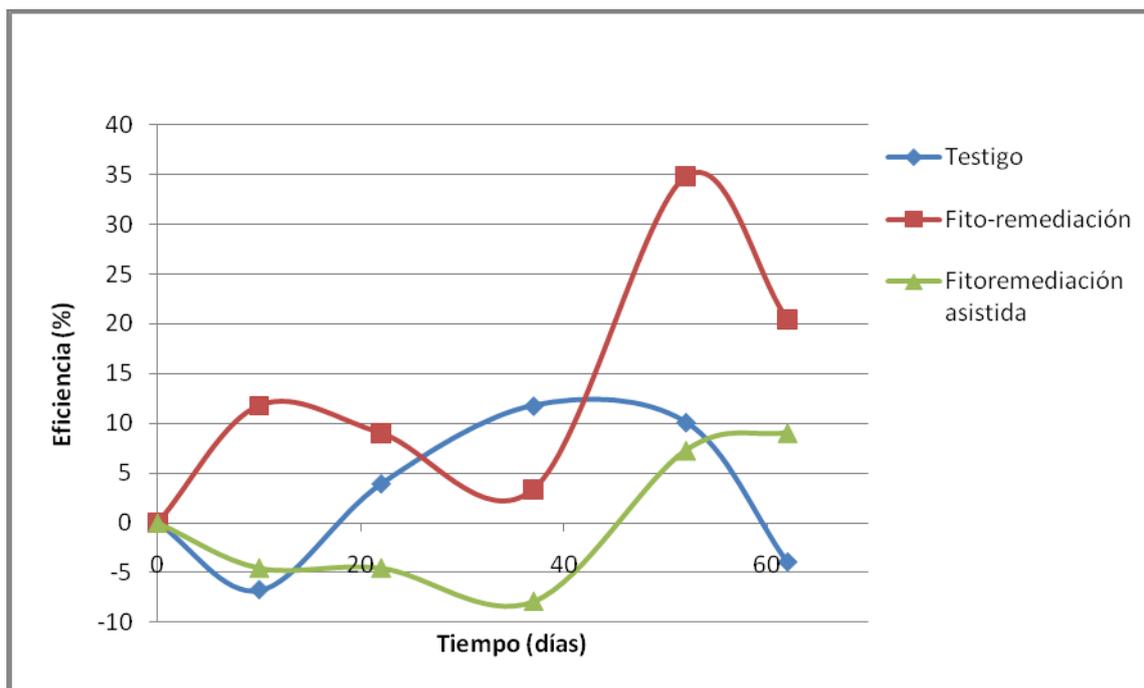


Figura 5.19. Eficiencia de remoción para HAP.

Los resultados se resumen en la Tabla 5.9 se presentan las eficiencias de remoción para cada uno de los hidrocarburos reportados.

Tabla 5.9. Eficiencia de remoción de HFM, HA y HAP.

| | Remoción de HFM % | Remoción HA % | Remoción HAP % |
|----------------------------------|-------------------|---------------|----------------|
| Testigo | 31.79 | 40.48 | -3.95 |
| Fito-remediación | 83.17 | 45.85 | 20.40 |
| Fito-remediación asistida | 83.53 | 65.14 | 9.06 |

Como se observa, la eficiencia de remoción de HFM es prácticamente la misma en ambos tratamientos (aproximadamente 80%) y mayor que el testigo (aproximadamente 30%). La eficiencia de remoción para HA es similar en el testigo y la fito-remediación convencional (aproximadamente un 40 %) y se tiene una mayor eficiencia de remoción para la fito-remediación asistida con AZm1 con aproximadamente un 60%. Para la eficiencia de remoción de HAP se observa que se removieron mayormente en la fito-remediación convencional que en el testigo o la fito-remediación asistida.

Para obtener la velocidad de degradación se obtienen ajustes exponenciales correspondientes para HFM, HA y HAP. De la ecuación 2-1 ($-\frac{dC}{dt} = k_d C^n$) se obtiene las velocidades de degradación obteniendo la k_d (en d^{-1}) para el testigo y los tratamientos de cada uno de los hidrocarburos determinados.

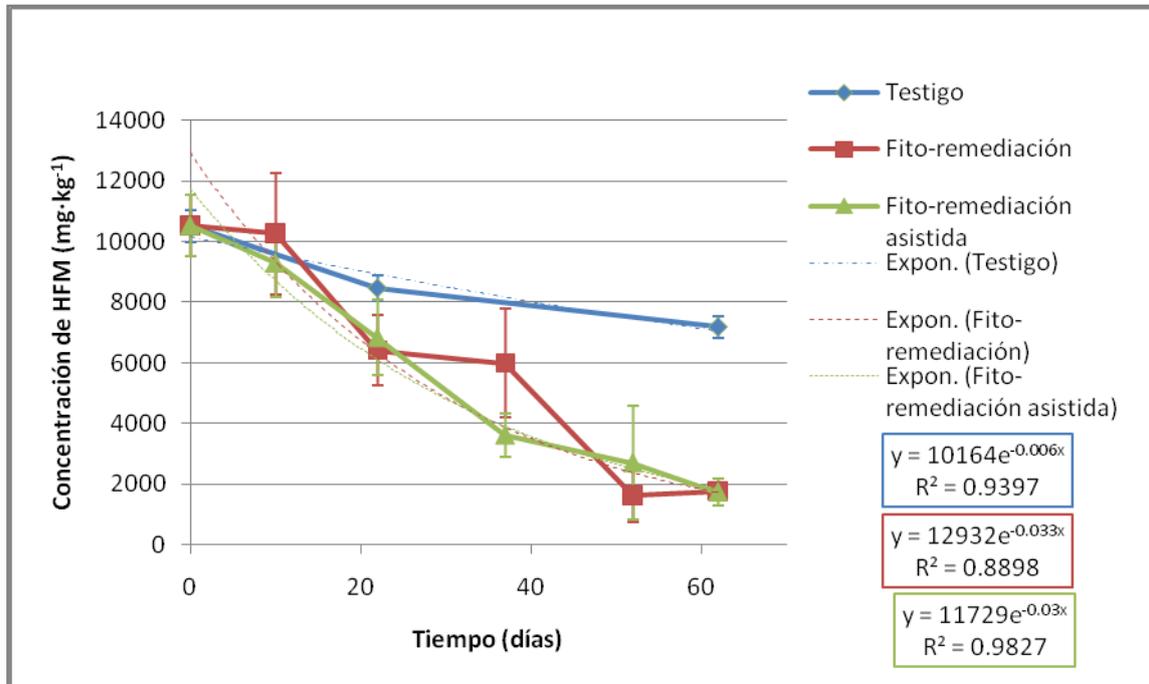


Figura 5.20. Velocidades de degradación de HFM.

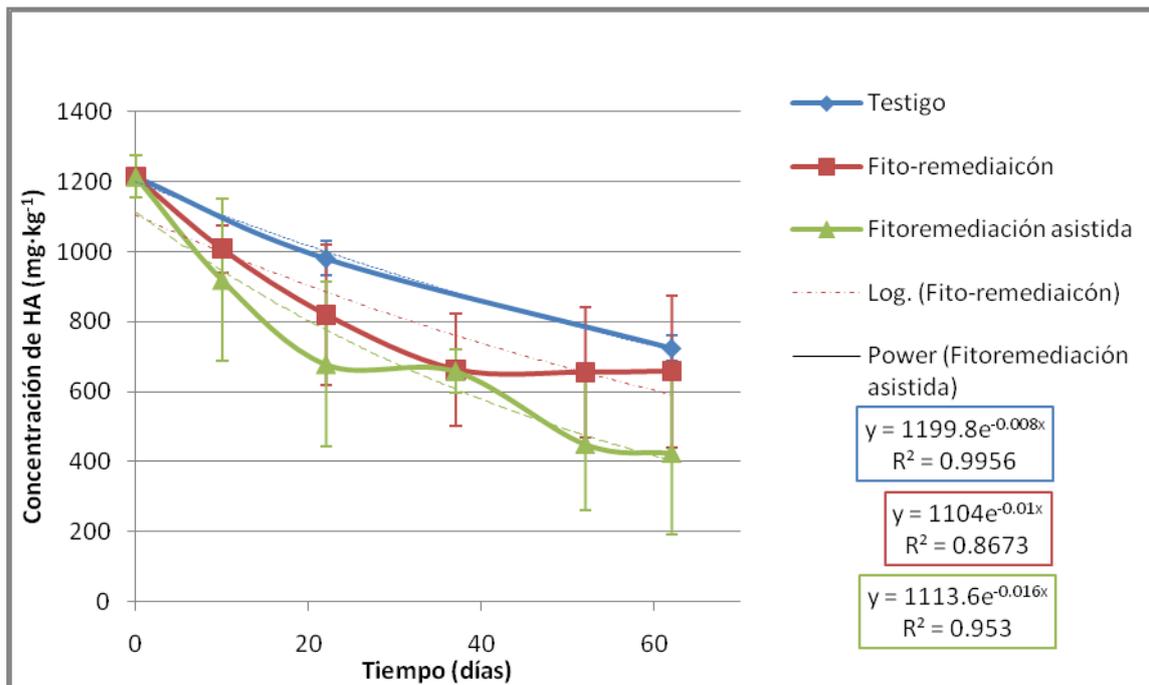


Figura 5.21. Velocidades de degradación de HA.

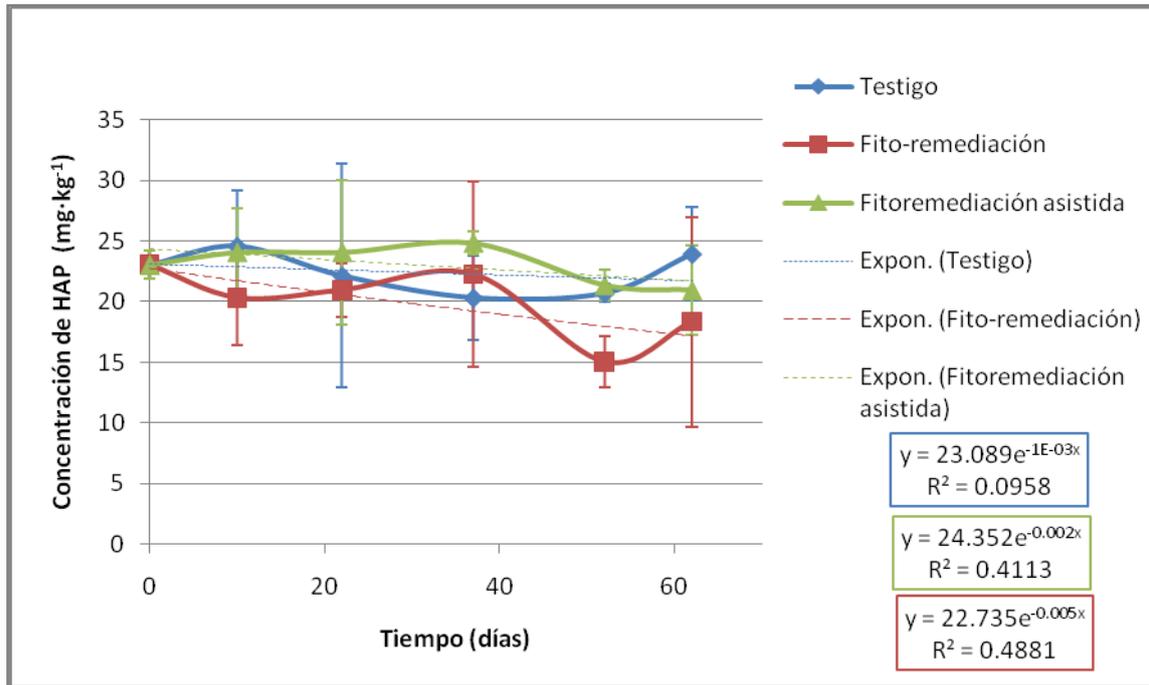


Figura 5.22. Velocidades de degradación de HAP.

La Tabla 5.10 presenta las velocidades de degradación (k_d) para el testigo y los tratamientos determinados para cada hidrocarburo. Como se puede observar nuevamente no existe diferencia entre los tratamientos.

Tabla 5.10. Velocidad de degradación de HFM, HA y HAP.

| | k_d de HFM d^{-1} | k_d de HA d^{-1} | k_d HAP d^{-1} |
|---------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------------|
| Testigo | 0 | 0 | 0 |
| Fito-remediación | 0.03 | 0.01 | 0 |
| Fito-remediación asistida | 0.03 | 0.01 | 0 |

5.10. Determinación de toxicidad aguda post-tratamiento con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*)

Para la determinación de toxicidad aguda utilizando semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) de los suelos al término de los tratamientos, se utilizaron las siguientes variables de respuesta: porcentaje de germinación y longitud radicular. La información de ambos fue sintetizada en el índice de germinación (Ecuación 4.4. Índice de germinación (Hamdia et al., 2007).

En la Figura 5.23 se presentan los resultados para el índice de germinación en las semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en el testigo (S-Se), el suelo control (S-D), el suelo con la cepa de AZm1 (S-B), la asociación de Azm1 con RPT, el tratamiento de fito-remediación convencional (S-Se-D) y el tratamiento de fito-remediación asistida con AZm1 (S-Se-B-D).

La línea roja punteada se refiere al Índice de Germinación (IG=1) indica el valor por debajo del cual la longitud radicular es inhibida con respecto de los controles.

Aquellas semillas que presentaron una mayor inhibición es cuando se tiene el suelo a una concentración del 100% y una menor inhibición al 1%.

En la concentración del 1% se observa un índice de germinación alto (mayor a 3) por la presencia de la cepa AZm1 y aquella que muestra una mayor inhibición es en donde se tiene la asociación de la RPT con AZm1. Al 10% se tiene una menor inhibición de crecimiento radicular en el tratamiento de fito-remediación asistida con AZm1 y una mayor inhibición con la presencia del suelo con diesel. Al 1% se presentó una menor inhibición en el tratamiento de fito-remediación asistida con AZm1 y una mayor inhibición cuando se presentó la asociación de suelo con la cepa AZm1.

Al 100%, la presencia de la planta en asociación con el AZm1 presentaron un mayor desarrollo de la lechuga que en el testigo; sin embargo, el suelo con solamente la bacteria presentó el menor desarrollo.

De igual forma, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) a los tratamientos con el fin de determinar la existencia de diferencias significativas entre los arreglos experimentales con pruebas de rango múltiple de Duncan con el programa SPSS versión 15.0. Las Tablas de dicha información se encuentran en el Anexo D.

Los suelos de los arreglos experimentales con AZm1 al 1% (S-Se-B y S-Se-B-D) mostraron un mayor desarrollo que incluso el testigo, con diferencias significativas. En un segundo bloque se presentaron aquellos suelos con una fito-toxicidad mayor, como fue la del testigo y la atenuación natural, finalmente aquellos que presentaron una mayor fito-toxicidad fueron los suelos con el diesel degradado.

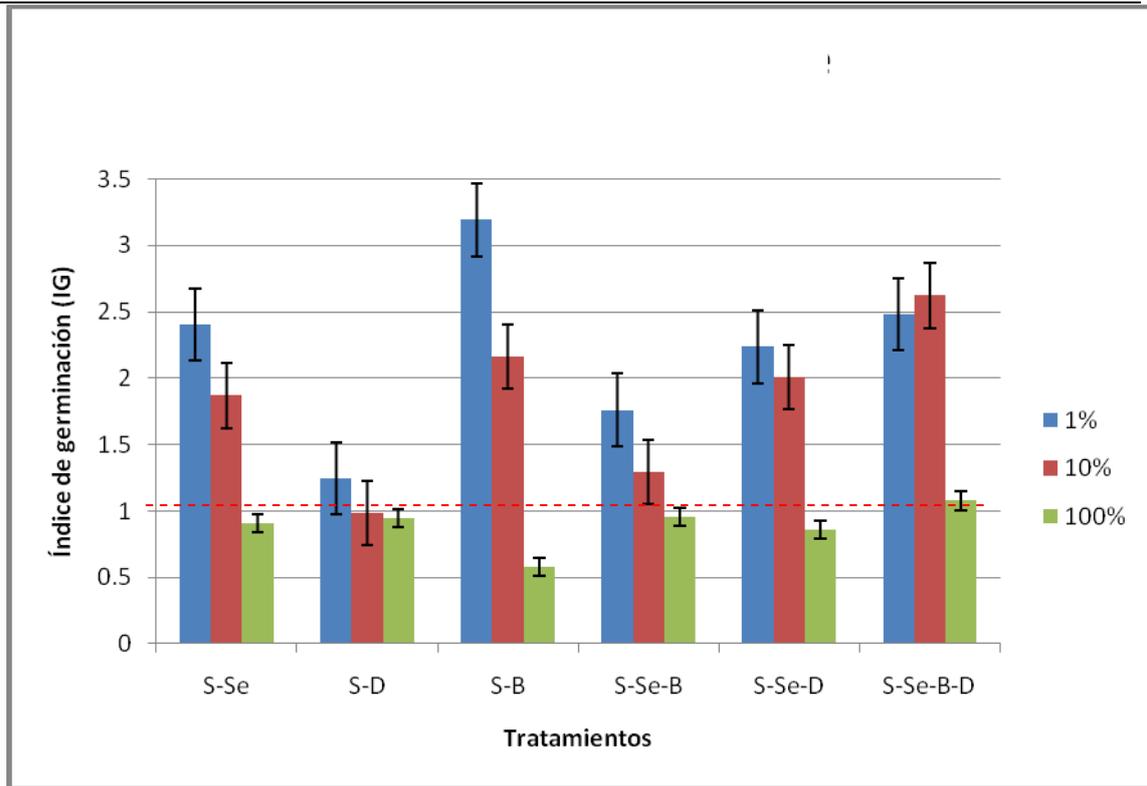


Figura 5.23. Índice de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en el suelo de las unidades experimentales.

6. Conclusiones y recomendaciones

La presencia de la AZm1 en la fito-remediación con ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) incrementa el porcentaje de sobrevivencia pero no incrementa el desarrollo radicular, ni del tallo, lo cual sería importante para alcanzar mayores profundidades para un tratamiento real.

Para los tres tipos de hidrocarburos, se observó una mejor remoción en el tratamiento de fito-remediación con ryegrass perene tetraploide asistida por AZm1 (con 9 789.39 mg·kg⁻¹ removidos) seguida de la fito-remediación convencional (9 751.50 mg·kg⁻¹ removidos) y el testigo es aquel que presenta una menor remoción del hidrocarburo (6 536.84 mg·kg⁻¹ removidos).

La eficiencia de remoción de HFM es prácticamente la misma en ambos tratamientos (aproximadamente 80%) llegando a 1 770 mg·kg⁻¹ para la fito-remediación y de 1 733 mg·kg⁻¹ para la fito remediación asistida y mayor que el testigo (aproximadamente 30%).

La eficiencia de remoción para HA es similar al testigo y a la fito-remediación con ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) (aproximadamente un 40 %) y se tiene una mayor eficiencia de remoción para la fito-remediación con ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) asistida por la cepa de AZm1 con aproximadamente un 60% de eficiencia de remoción.

Para la eficiencia de remoción de HAP se removieron principalmente por fito-remediación con ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) (llegando a 20.95 mg·kg⁻¹) respecto del testigo (23.95 mg·kg⁻¹) y de la fito-remediación asistida (20.95 mg·kg⁻¹). Sin embargo, estas diferencias no son significativas.

Las velocidades de degradación fueron de 0.03 d⁻¹ para la fito-remediación y la fito-remediación asistida, mientras que para HFM y HA fueron de 0.01 d⁻¹ en ambos casos, pero no se obtuvo una degradación para HAP en ninguno de los tratamientos.

Finalmente, en cada uno de los arreglos experimentales, se realizaron bioensayos con semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), para obtener información de la toxicidad aguda post-tratamiento utilizando el índice de germinación (IG). Los suelos, en la presencia de la AZm1 asociados con la RPT, obtuvieron un mayor IG que incluso el testigo. Sin embargo, la sola presencia de la AZm1 en el suelo resulta fito-tóxica, a menos que se mezcle con más sustrato que permita reducir la concentración de la cepa. En este caso, será incrementará el desarrollo de la especie vegetal plantada.

Recomendaciones

Al término de la fase experimental se tienen las siguientes recomendaciones:

- La textura y estructura del suelo obtenida no facilitó el crecimiento de las plantas pese a la adición de agrolita, probablemente se deba al tipo de arcilla que se agregó (caolinita) por lo que se recomienda buscar otro tipo de arcilla para la conformación del suelo artificial y por la granulometría empleada.
- La asociación de ryegrass perene tetraploide (*Lolium perenne tetraploide*) asistida por la cepa de AZm1, no resultó ser tan efectiva, por lo que se recomienda buscar otra asociación.
- Al suelo artificial, no se le adicionó ningún tipo de fertilizante, al parecer durante los primeros 20 días la cantidad de materia orgánica y de los nutrientes disponibles resultaron suficientes. Sin embargo, con el paso del tiempo es posible que el desarrollo de la planta se vea afectados por la falta de éstos, por tal motivo, se recomienda agregar nutrientes en forma controlada.

ANEXO A: Resultados

A.1 Resultados de la cuenta UFC

Se trabajó específicamente con la cepa de BPCV (AZm1, AZm3, y AZm5) los resultados se muestran en la Tabla A.1. Los resultados son por triplicado (marcadas como R1, R2, y R3).

Tabla 8.1. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm1.

| AZm1 | Dilución | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | Bacterias por mL |
|------|----------------------|------------|-----------|-----------|--------------------------------------|
| | R1 | incontable | 33 | 3 | |
| | R2 | incontable | 13 | 1 | |
| | R3 | incontable | 24 | 1 | |
| | Promedio de colonias | 23.33 | | | |
| | σ | 10.02 | | | |
| | Resultado | | | | 2.33×10^7 |

Tabla 8.2. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm3.

| AZm3 | Dilución | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | Bacterias por mL |
|------|----------------------|------------|-----------|-----------|--------------------------------------|
| | R1 | incontable | 56.00 | 12.00 | |
| | R2 | incontable | 54.00 | 4.00 | |
| | R3 | incontable | 18.00 | 4.00 | |
| | Promedio de colonias | 42.67 | | | |
| | σ | 21.38 | | | |
| | Resultado | | | | 4.27×10^7 |

Tabla 8.3. Resultados de cuenta de bacterias por cepa de BPCV para AZm5.

| AZm5 | Dilución | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | Bacterias por mL |
|------|----------------------|------------|-----------|-----------|--------------------------------------|
| | R1 | incontable | 57.00 | 2.00 | |
| | R2 | incontable | 54.00 | 0 | |
| | R3 | incontable | 44.00 | 0 | |
| | Promedio de colonias | 55.5 | | | |
| | σ | 6.81 | | | |
| | Resultado | | | | 5.55×10^7 |

A continuación se presentan los resultados para el conteo de bacterias por semilla para cada una de las cepas de BPCV:

Tabla 8.4. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm1 en ryegrass perene tetraploide.

| AZm1 | Dilución | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | Bacterias por semilla |
|------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| | R1 | 4.00 | 0 | 0 | |
| | R2 | 10.00 | 0 | 0 | |
| | R3 | 15.00 | 0 | 0 | |
| | Promedio de colonias | 9.67 | | | |
| | σ | 5.51 | | | |
| | Resultado | | | | 9 666.67 |

Tabla 8.5. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm3 en ryegrass perene tetraploide.

| AZm3 | Dilución | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | Bacterias por semilla |
|------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| | R1 | 7.00 | 1.00 | 0 | |
| | R2 | 2.00 | 0 | 0 | |
| | R3 | 7.00 | 0 | 0 | |
| | Promedio de colonias | 5.33 | | | |
| | σ | 2.88 | | | |
| | Resultado | | | | 5 333.33 |

Tabla 8.6. Resultados de cuenta de bacterias por semilla para AZm5 en ryegrass perene tetraploide.

| AZm5 | Dilución | 10 ⁻¹ | 10 ⁻² | 10 ⁻³ | Bacterias por semilla |
|------|----------------------|------------------|------------------|------------------|-----------------------|
| | R1 | 43.00 | 4.00 | 0 | |
| | R2 | 45.00 | 5.00 | 0 | |
| | R3 | 48.00 | 8.00 | 0 | |
| | Promedio de colonias | 45.33 | | | |
| | σ | 2.52 | | | |
| | Resultado | | | | 45 333.33 |

Anexo B: Experimentación preliminar

B.1. Selección de la concentración de trabajo

Las pruebas fueron realizadas se expresó en la metodología, en donde se colocó en cada bioensayo como disolvente del diesel, dimetil sulfóxido (DMSO) y al 5% para riego cada tercer día. Sin embargo, se obtuvieron resultados muy bajos. Obteniéndose los resultados que se encuentran en la Tabla B1:

Tabla 9.1. Resultados de porcentaje de germinación a tres concentraciones de diesel utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente.

| Nombre de la variedad | Clave Completa | Concentración diesel | Porcentaje de germinación (%) | Desviación estándar |
|------------------------------------|------------------|---|-------------------------------|---------------------|
| Alfalfa Española | Control positivo | DMSO y agua | 30.00 | 10 |
| | Control negativo | Agua | 90.00 | 10 |
| | Tratamiento 1 | DMSO, agua, diesel a 5 000 mg·kg ⁻¹ | 13.33 | 11.55 |
| | Tratamiento 2 | DMSO, agua, diesel a 25 000 mg·kg ⁻¹ | 16.67 | 11.55 |
| | Tratamiento 3 | DMSO, agua, diesel a 50 000 mg·kg ⁻¹ | 35.83 | 5.20 |
| Ryegrass perene tetrapolide | Control positivo | DMSO y agua | 3.33 | 5.77 |
| | Control negativo | Agua | 90 | 10 |
| | Tratamiento 1 | DMSO, agua, diesel a 5 000 mg·kg ⁻¹ | 0.00 | 0 |
| | Tratamiento 2 | DMSO, agua, diesel a 25 000 mg·kg ⁻¹ | 0 | 0 |
| | Tratamiento 3 | DMSO, agua, diesel a 50 000 mg·kg ⁻¹ | 0 | 0 |
| Trébol Rojo | Control positivo | DMSO y agua | 3.33 | 5.77 |
| | Control negativo | Agua | 86.67 | 15.27 |
| | Tratamiento 1 | DMSO, agua, diesel a 5 000 mg·kg ⁻¹ | 3.33 | 5.77 |
| | Tratamiento 2 | DMSO, agua, diesel a 25 000 mg·kg ⁻¹ | 0 | 0 |
| | Tratamiento 3 | DMSO, agua, diesel a 50 000 mg·kg ⁻¹ | 3.33 | 5.77 |

Se realizó una segunda prueba cambiando el DMSO por diclorometano como solvente del diesel y de la misma forma se trabajó a tres distintas concentraciones cuyos resultados fueron mejorados y se encuentran descritos en la Tabla 5.7.

Se han realizado pruebas *in vitro*, utilizando papel filtro como soporte; sin embargo, como algunos artículos así lo expresan el resultado no es aproximado con la realidad, por lo que se repitió el experimento añadiendo el suelo artificial en las cajas Petri.

Se repitió la prueba tres veces hasta obtener desviaciones estándar cercanas a 1 como se muestran en la Tabla B.2:

Tabla 9.2. Resultados de porcentaje de germinación a tres concentraciones de diesel utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) como solvente.

| Concentración | Muestra Réplica | % de germinación | Media | Germinación % | σ |
|----------------------------|-----------------|------------------|-------|---------------|----------|
| 1,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 2 | | | |
| 1,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 2 | | | |
| 1,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 4 | 2.67 | 26.67 | 1.15 |
| 2,500 mg·kg ⁻¹ | R1 | 3 | | | |
| 2,500 mg·kg ⁻¹ | R2 | 6 | | | |
| 2,500 mg·kg ⁻¹ | R3 | 5 | 4.67 | 46.67 | 1.53 |
| 4,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 7 | | | |
| 4,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 7 | | | |
| 4,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 5 | 6.33 | 63.33 | 1.15 |
| 5,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 3 | | | |
| 5,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 2 | | | |
| 5,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 4 | 3 | 30 | 1.00 |
| 6,500 mg·kg ⁻¹ | R1 | 1 | | | |
| 6,500 mg·kg ⁻¹ | R2 | 2 | | | |
| 6,500 mg·kg ⁻¹ | R3 | 1 | 1.33 | 13.33 | 0.58 |
| 8,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 2 | | | |
| 8,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 1 | | | |
| 8,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 3 | 2 | 20 | 1.00 |
| 9,500 mg·kg ⁻¹ | R1 | 2 | | | |
| 9,500 mg·kg ⁻¹ | R2 | 3 | | | |
| 9,500 mg·kg ⁻¹ | R3 | 3 | 2.67 | 26.67 | 0.58 |
| 12,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 1 | | | |
| 12,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 2 | | | |
| 12,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 2 | 1.67 | 16.67 | 0.58 |
| 16,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 1 | | | |
| 16,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 1 | | | |
| 16,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 1 | 1 | 10 | 0.00 |
| 19,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 0 | | | |
| 19,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 0 | | | |
| 19,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 1 | 0.33 | 3.33 | 0.58 |
| 22,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 0 | | | |
| 22,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 1 | | | |
| 22,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 0 | 0.33 | 3.33 | 0.58 |
| 25,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 0 | | | |
| 25,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 0 | | | |
| 25,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |
| 50,000 mg·kg ⁻¹ | R1 | 0 | | | |
| 50,000 mg·kg ⁻¹ | R2 | 0 | | | |
| 50,000 mg·kg ⁻¹ | R3 | 0 | 0 | 0 | 0.00 |

B.3. Determinación de la tolerancia y degradación de diesel por AZm1

Se realizó una prueba previa con el fin de determinar la tolerancia de AZm1 al diesel y la posible degradación. Se colocaron tres medios: gelosa nutritiva, medios mineral y Nfb.

Con esta prueba se buscó que en la gelosa nutritiva y el medio Nfb se desarrolle la bacteria en presencia del diesel con lo que se probaría la tolerancia del microorganismo. El caso del medio mineral, tiene el fin de tener como única fuente de carbono al diesel por lo que probaría su degradación.

La prueba se realizó *in vitro*, en las placas se colocó un mL de diesel extendido en placa además de que se estrió inóculo en suspensión de *Azospirillum* en ambos medios.

Los resultados se muestran en la Tabla B.3:

Tabla 9.3. Resultados de prueba de tolerancia y degradación de diesel con *Azospirillum*.

| Medio | Repetición | Resultado Postivo (+) / Negativo (-) | |
|-----------------------|--------------|---|-----------|
| | | Tinción de Gram | En fresco |
| Agar nutritivo | Repetición 1 | + | + |
| | Repetición 2 | + | + |
| | Repetición 3 | + | + |
| Medio mineral | Repetición 1 | - | - |
| | Repetición 2 | - | - |
| | Repetición 3 | - | - |
| Medio selectivo (Nfb) | Repetición 1 | + | + |
| | Repetición 2 | + | + |
| | Repetición 3 | + | + |

Lo anterior de muestra que AZm1 no es capaz de degradar diesel teniéndolo como fuente de carbono por tal motivo se eliminó las unidades experimentales de bio-aumentación.

En la Figura B.1. se presentan fotografías del trabajo realizado en condiciones sépticas para el sembrado.

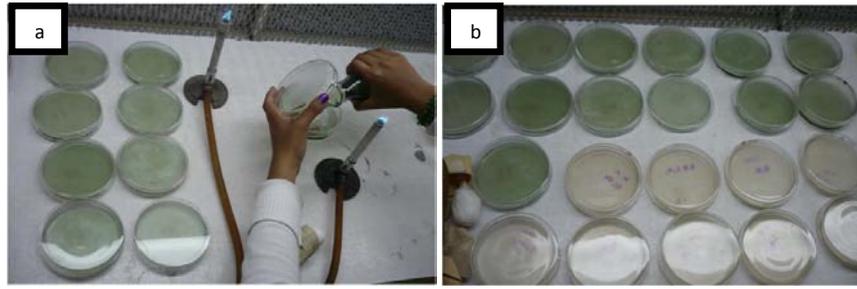


Figura 9.1. a) Sembrado en caja Petri para prueba de tolerancia y degradación y b) medios de cultivo en gelosa nutritiva, medios mineral y Nfb.

Anexo C: Resultados durante el monitoreo

A continuación se presentan las Tablas C.1, C.2 y C. 3 correspondientes a la medición de las características físicas correspondientes a la plántula tales como porcentaje de germinación, longitud de raíz y tallo. En cada celda se presentan los resultados del promedio para una población de 25.

Tabla 10.1. Resultados promedio del porcentaje de sobrevivencia durante la experimentación para una N de 25 unidades.

| Porcentaje de germinación (%) | | | | | | | |
|-------------------------------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Id. | Replica | | 10 días | 22 días | 37 días | 52 días | 62 días |
| Testigo | 1 | S-Se | 88 | 84 | 84 | 96 | 60 |
| | 2 | S-Se | 92 | 76 | 92 | 96 | 68 |
| | 3 | S-Se | 92 | 92 | - | - | - |
| Control | 1 | S-Se-B | 68 | 88 | 96 | 68 | 76 |
| | 2 | S-Se-B | 44 | 96 | 92 | 80 | 68 |
| | 3 | S-Se-B | 72 | 88 | - | - | - |
| T1 | 1 | S-Se-D | 60 | 76 | 48 | 72 | 76 |
| | 2 | S-Se-D | 76 | 84 | 88 | 60 | 72 |
| | 3 | S-Se-D | 68 | 88 | - | - | - |
| T2 | 1 | S-Se-B-D | 72 | 52 | 80 | 56 | 80 |
| | 2 | S-Se-B-D | 12 | 72 | 76 | 72 | 64 |
| | 3 | S-Se-B-D | 12 | 72 | - | - | - |

Tabla 10.2. Resultados promedio de longitud de raíz durante la experimentación para una N de 25 unidades.

| | | Longitud de raíz (mm) | | | | | |
|----------------|----------------|-----------------------|---------|---------|---------|---------|---------|
| Id. | Replica | | 10 días | 22 días | 37 días | 52 días | 62 días |
| Testigo | 1 | S-Se | 34.09 | 55.90 | 60.24 | 41.30 | 70.00 |
| | 2 | S-Se | 49.57 | 50.58 | 51.96 | 49.78 | 76.47 |
| | 3 | S-Se | 54.00 | 48.13 | | | |
| Control | 1 | S-Se-B | 30.53 | 41.36 | 44.78 | 42.94 | 64.21 |
| | 2 | S-Se-B | 33.64 | 42.87 | 41.30 | 35.00 | 58.24 |
| | 3 | S-Se-B | 28.89 | 38.18 | | | |
| T1 | 1 | S-Se-D | 44.07 | 44.79 | 53.33 | 51.67 | 72.11 |
| | 2 | S-Se-D | 65.63 | 52.29 | 50.00 | 44.00 | 70.00 |
| | 3 | S-Se-D | 38.24 | 51.77 | | | |
| T2 | 1 | S-Se-B-D | 58.33 | 26.38 | 39.00 | 27.14 | 62.00 |
| | 2 | S-Se-B-D | 13.00 | 34.44 | 43.42 | 40.00 | 73.13 |
| | 3 | S-Se-B-D | 38.33 | 57.78 | | | |

Tabla 10.3. Resultados promedio longitud de tallo durante la experimentación para una N de 25 unidades.

| | | Longitud de tallo (mm) | | | | | |
|----------------|----------------|------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|
| Id. | Replica | | 10 días | 22 días | 37 días | 52 días | 62 días |
| Testigo | 1 | S-Se | 1 177.27 | 1 254.76 | 1 234.76 | 1 130.43 | 1 320.00 |
| | 2 | S-Se | 1 243.48 | 1 385.79 | 1 326.09 | 1 060.43 | 1 382.35 |
| | 3 | S-Se | 1 327.50 | 1 301.74 | | | |
| Control | 1 | S-Se-B | 1 404.12 | 1 168.18 | 1 164.35 | 1 229.41 | 1 163.16 |
| | 2 | S-Se-B | 890.91 | 437.39 | 1 452.17 | 1 222.50 | 1 294.12 |
| | 3 | S-Se-B | 1 033.33 | 1 355.00 | | | |
| T1 | 1 | S-Se-D | 930.67 | 1 187.37 | 958.33 | 1 122.22 | 1 557.89 |
| | 2 | S-Se-D | 1 222.11 | 1 277.14 | 1 059.09 | 1 273.33 | 1 438.89 |
| | 3 | S-Se-D | 933.53 | 1 184.09 | | | |
| T2 | 1 | S-Se-B-D | 866.67 | 1 334.62 | 1 215.00 | 892.86 | 1 325.00 |
| | 2 | S-Se-B-D | 953.33 | 1 372.22 | 1 328.95 | 1 305.56 | 1 406.25 |
| | 3 | S-Se-B-D | 553.33 | 1 052.78 | | | |

Las Tablas C.4, C.5 Y C.6 presentan los resultados correspondientes a la concentración de hidrocarburos totales, hidrocarburos alifáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos:

Tabla 10.4. Resultados promedio de concentración de HFM.

| Tiempo (días) | Concentración de HFM ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) | | | | | |
|---------------|---|----------|------------------|----------|---------------------------|----------|
| | Testigo | σ | Fito-remediación | σ | Fito-remediación asistida | σ |
| 0 | 10 522.43 | 526.12 | 10 522.43 | 526.12 | 10 522.43 | 526.12 |
| 10 | | | 10 271.66 | 2 000.17 | 9 291.65 | 1 140.07 |
| 22 | 8 456.73 | 422.84 | 6 414.47 | 1 144.90 | 6 831.62 | 1 249.83 |
| 37 | | | 5 994.08 | 1 809.36 | 3 616.41 | 725.92 |
| 52 | | | 1 633.20 | 898.81 | 2 700.90 | 1 867.06 |
| 62 | 7 177.05 | 358.85 | 1 770.92 | 54.49 | 1 733.04 | 432.49 |

Tabla 10.5. Resultados promedio de concentración de HA.

| Tiempo (días) | Concentración de HA ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) | | | | | |
|---------------|--|----------|------------------|----------|---------------------------|----------|
| | Testigo | σ | Fito-remediación | σ | Fito-remediación asistida | σ |
| 0 | 1 215.08 | 60.75 | 1 215.08 | 60.75 | 1 215.08 | 60.75 |
| 10 | | | 1 008.23 | 68.07 | 919.26 | 232.95 |
| 22 | 980.59 | 49.03 | 820.30 | 200.81 | 677.90 | 235.76 |
| 37 | | | 663.10 | 160.50 | 657.94 | 62.13 |
| 52 | | | 655.28 | 184.70 | 449.73 | 188.77 |
| 62 | 723.20 | 36.16 | 657.92 | 216.97 | 423.61 | 232.25 |

Tabla 10.6. Resultados promedio de concentración de HAP.

| Tiempo (días) | Concentración de HAP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) | | | | | |
|------------------|---|----------|------------------|----------|------------------------------|----------|
| | Testigo | σ | Fito-remediación | σ | Fito-remediación asistida | σ |
| 0 | 23.04 | 1.15 | 23.04 | 1.15 | 23.04 | 1.15 |
| 10 | 24.60 | 4.55 | 20.33 | 3.96 | 24.08 | 3.59 |
| 22 | 22.14 | 9.25 | 20.97 | 2.20 | 24.08 | 5.97 |
| 37 | 20.33 | 3.48 | 22.27 | 7.69 | 24.85 | 0.92 |
| 52 | 20.71 | 0.74 | 15.02 | 2.12 | 21.36 | 1.28 |
| 62 | 23.95 | 3.85 | 18.34 | 8.63 | 20.95 | 3.69 |

Porcentaje de germinación y longitud radicular de las semillas de *Lactuca sativa* para prueba de toxicidad

Los resultados del factor de respuesta de longitud radicular se presentan en la Tabla C.7:

Tabla 10.7. Resultados de longitud de raíz de los germinados de semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) para las concentraciones de 1, 10 y 100 por ciento.

| | Concentración del sustrato (%) | Longitud de raíz (mm) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------|
| S-Se | 1 | 196.67 ± 16.46 |
| | 10 | 447.78 ± 13.66 |
| | 100 | 354.44 ± 19.20 |
| S-D | 1 | 246.84 ± 10.12 |
| | 10 | 232.11 ± 13.69 |
| | 100 | 205.00 ± 19.08 |
| S-B | 1 | 239.47 ± 16.29 |
| | 10 | 594.50 ± 19.21 |
| | 100 | 478.13 ± 8.72 |
| S-Se-B | 1 | 145.56 ± 19.10 |
| | 10 | 311.67 ± 12.03 |
| | 100 | 240.56 ± 14.78 |
| S-Se-D | 1 | 194.67 ± 16.66 |
| | 10 | 416.50 ± 23.92 |
| | 100 | 394.44 ± 19.25 |
| S-Se-B-D | 1 | 217.89 ± 18.58 |
| | 10 | 462.78 ± 27.42 |
| | 100 | 488.33 ± 20.39 |

Nota: Suelo sin tratamiento (S-Se), el suelo contaminado (S-D), el suelo con la cepa de AZm1 (S-B), la asociación de las bacterias con ryegrass (*Lolium perenne*), el tratamiento de fito-remediación con *Lolium perenne* (S-Se-D) y el tratamiento de fito-remediación con *Lolium perenne* asistida por la cepa de AZm1 (S-Se-B-D).

Los cuales se representan en la siguiente figura, expresando los resultados en mm. En la menor concentración

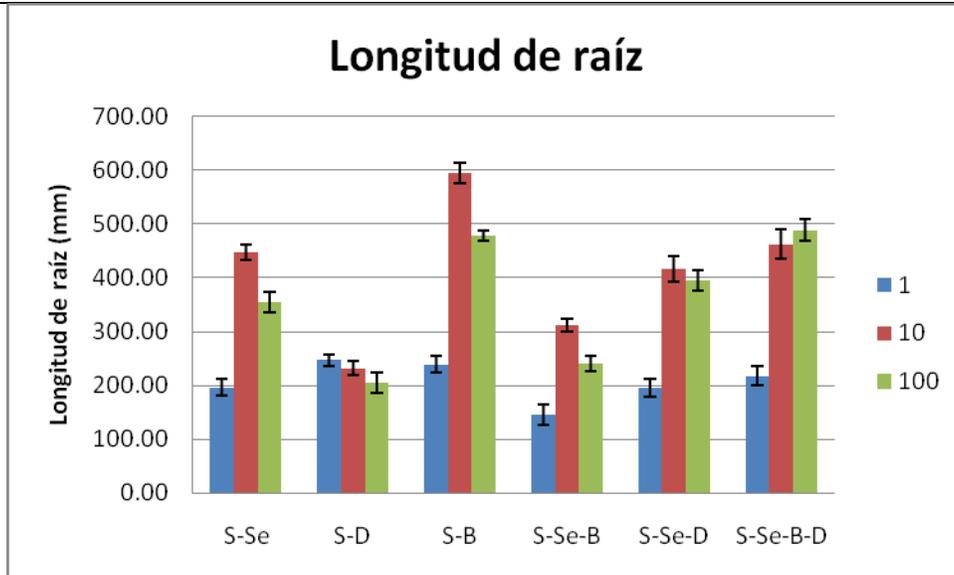


Figura 10.1: Longitud de raíz para semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en el suelo de las unidades experimentales.

Anexo D: Análisis estadísticos

Porcentaje de germinación:

ANOVA Porcentaje de sobrevivencia de ryegrass perene (*Lolium perenne*) durante el tratamiento experimental.

| Fuente de variación | | Suma de cuadrados | G.l. | Cuadrado medio | F | Nivel de significancia |
|---------------------------|------------------------|-------------------|------|----------------|-------|------------------------|
| Porcentaje de germinación | Entre tratamientos | 3 939.667 | 3 | 1313.222 | 4.896 | .005 |
| | Dentro de tratamientos | 11 801.333 | 44 | 268.212 | | |
| | Total | 15 741.000 | 47 | | | |
| Tiempo (días) | Entre tratamientos | 0 | 3 | 0 | 0 | 1.000 |
| | Dentro de tratamientos | 17 542.667 | 44 | 398.697 | | |
| | Total | 17 542.667 | 47 | | | |

Prueba de rangos múltiples de Duncan

Porcentaje de germinación

| Tratamientos | N | alfa = 0.05 | |
|---------------------------|----|-------------|-------|
| | | 1 | 1 |
| Fito-remediación asistida | 12 | 60.00 | |
| Fito-remediación | 12 | 72.33 | 72.33 |
| Control AZm1 | 12 | | 78.00 |
| Testigo | 12 | | 84.67 |
| Sig. | | 0.072 | 0.087 |

Longitud radicular:

ANOVA Longitud de raíz de ryegrass perene (*Lolium perenne*)

| Fuente de variación | | Suma de cuadrados | G.l. | Cuadrado medio | F | Nivel de significancia |
|-----------------------|------------------------|-------------------|------|----------------|-------|------------------------|
| Longitud de raíz (mm) | Entre tratamientos | 1 469.110 | 3 | 489.703 | 2.996 | 0.041 |
| | Dentro de tratamientos | 7 191.598 | 44 | 163.445 | | |
| | Total | 8 660.708 | 47 | | | |
| Tiempo (días) | Entre tratamientos | 0 | 3 | 0 | 0 | 1.000 |
| | Dentro de tratamientos | 17 542.667 | 44 | 398.697 | | |
| | Total | 17 542.667 | 47 | | | |

Prueba de rangos múltiples de Duncan

Longitud de raíz (mm)

| Tratamientos | N | alfa = 0.05 | |
|---------------------------|----|-------------|---------|
| | | 1 | 1 |
| Control AZm1 | 12 | 41.8283 | |
| Fito-remediación asistida | 12 | 42.7458 | 42.7458 |
| Fito-remediación | 12 | | 53.1583 |
| Testigo | 12 | | 53.5017 |
| Sig. | | 0.861 | 0.057 |

Longitud de tallo:

ANOVA Longitud de tallo de ryegrass perene (*Lolium perenne*)

| Fuente de variación | | Suma de cuadrados | G.I. | Cuadrado medio | F | Nivel de significancia |
|------------------------|------------------------|-------------------|------|----------------|-------|------------------------|
| Longitud de tallo (mm) | Entre tratamientos | 116 165.772 | 3 | 38721.924 | 0.798 | .502 |
| | Dentro de tratamientos | 213 6324.266 | 44 | 48552.824 | | |
| | Total | 2 252 490.038 | 47 | | | |
| Tiempo (días) | Entre tratamientos | 0 | 3 | 0 | 0 | 1.000 |
| | Dentro de tratamientos | 17 542.667 | 44 | 398.697 | | |
| | Total | 17 542.667 | 47 | | | |

Prueba de rangos múltiples de Duncan

Longitud de tallo (mm)

| Tratamientos | N | Alfa =0.05 |
|---------------------------|----|------------|
| | 1 | 1 |
| Fito-remediación asistida | 12 | 1 133.8808 |
| Control AZm1 | 12 | 1 151.2200 |
| Fito-remediación | 12 | 1 178.7217 |
| Testigo | 12 | 1 262.0500 |
| Sig. | | 0.202 |

Resumen de procesamiento de casos para HFM

| | Casos | | | | | |
|---|----------|------------|----------|------------|-------|------------|
| | Incluido | | Excluido | | Total | |
| | N | Por ciento | N | Por ciento | N | Por ciento |
| Concentración HFM (mg·kg ⁻¹) * Tratamientos | 24 | 100.0% | 0 | 0% | 24 | 100.0% |

Reporte

Concentración HFM (mg·kg⁻¹)

| Tratamientos | Media | N | Desviación estándar |
|---------------------------|------------|----|---------------------|
| Fito-remediación | 5 571.2300 | 12 | 4 181.35727 |
| Fito-remediación asistida | 6 675.6825 | 12 | 3 838.77769 |
| Total | 6 123.4563 | 24 | 3 965.82401 |

Resumen de procesamiento de casos para HA

| | Casos | | | | | |
|---------------------------------|----------|------------|----------|------------|----------|------------|
| | Incluido | | Incluido | | Incluido | |
| | N | Por ciento | N | Por ciento | N | Por ciento |
| Concentración HA * Tratamientos | 24 | 100.0% | 0 | 0% | 24 | 100.0% |

Reporte

Concentración HA (mg·kg⁻¹)

| Tratamientos | Media | N | Desviación estándar |
|---------------------------|------------|----|---------------------|
| Fito-remediación | 6 228.8606 | 12 | 3 459.99245 |
| Fito-remediación asistida | 4 269.3931 | 12 | 3 508.29633 |
| Total | 5 249.1268 | 24 | 3 551.56840 |

ANOVA Concentración de HAP

| Fuente de variación | | Suma de cuadrados | G.l. | Cuadrado medio | F | Nivel de significancia |
|---------------------|------------------------|-------------------|------|----------------|-------|------------------------|
| Concentración HAP | Entre tratamientos | 30.324 | 2 | 15.162 | 0.411 | 0.666 |
| | Dentro de tratamientos | 1 216.857 | 33 | 36.874 | | |
| | Total | 1 247.181 | 35 | | | |

Concentración HAP ($\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)

Duncan

| Tratamientos | N | alfa = 0.05 |
|---------------------------|----|-------------|
| | 1 | 1 |
| Fito-remediación | 12 | 21.4633 |
| Testigo | 12 | 23.0860 |
| Fito-remediación asistida | 12 | 23.6222 |
| Sig. | | 0.419 |

Análisis multifactorial

Interfactores

| | | Etiqueta | N |
|-------------------------|---|--------------------|----|
| Identificación | 1 | S-Se | 11 |
| | 2 | S-D | 11 |
| | 3 | S-B | 12 |
| | 4 | S-Se-B | 11 |
| | 5 | S-Se-D | 12 |
| | 6 | S-Se-B-D | 10 |
| Concentración del suelo | 1 | 1% Concentración | 24 |
| | 2 | 10% Concentración | 22 |
| | 3 | 100% Concentración | 21 |

Variable dependiente: Índice de Germinación

| Fuente | Tipo III Suma de cuadrados | Df | Cuadrados medios | F | Sig. |
|---------------------------|----------------------------|----|------------------|---------|------|
| Modelo corregido | 36.928(a) | 17 | 2.172 | 3.578 | 0.00 |
| Intercepción | 180.614 | 1 | 180.614 | 297.460 | 0.00 |
| Identificación | 8.863 | 5 | 1.773 | 2.919 | 0.02 |
| Concsuel | 17.993 | 2 | 8.997 | 14.817 | 0.00 |
| Identificación * Concsuel | 7.335 | 10 | 0.733 | 1.208 | 0.31 |
| Error | 29.752 | 49 | 0.607 | | |
| Total | 258.727 | 67 | | | |
| Total corregido | 66.680 | 66 | | | |

Índice de Germinación

Duncan

| Identificación | N | Bloques | | | |
|----------------|----|---------|--------|--------|--------|
| | | 1 | 2 | 3 | 1 |
| S-D | 11 | | 1.0410 | | |
| S-Se-B | 11 | | 1.4029 | 1.4029 | |
| S-Se | 11 | | 1.7316 | 1.7316 | 1.7316 |
| S-Se-D | 12 | | 1.7320 | 1.7320 | 1.7320 |
| S-B | 12 | | | 1.9873 | 1.9873 |
| S-Se-B-D | 10 | | | | 2.2873 |
| Sig. | | | 0.060 | 0.112 | 0.131 |

7. Referencias bibliográficas

1. Bais H., Weir T., Perry L., Gilroy S. y Vivanco J. 2006. "The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms". The Annual Review of Plant Biology, 57: 233-266.
2. Bashan Y. 1998. "Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture" Biotechnology Advances; Departamento de Microbiología, División de Biología Experimental, Centro de Investigación Biológica del Noroeste. México.
3. Bashan Y. y de-Bashan L. 2005. "Plant growth –promoting" Encyclopedia of soils in the environment. Center for Biological. Research of the Northwest (CIB), Elsevier; Vol. 1, págs. 103-115. Mexico.
4. Brohona B. y Gourdon R. 2000. "Influence of soil microbial activity level on the determination of contaminated soil toxicity using Lumistox and MetPlate bioassays"; Soil Biology & Biochemistry; Laboratorio de Ciencias del Medio Ambiente; Escuela Francesa de Trabajos Públicos del Estado; págs. 853-857. Francia.
5. Bustamante A. 2007. "Hidrocarburos disueltos en la sonda de Campeche". Tesis para obtener el título académico de ingeniero químico; Facultad de Química, Biológicas; Facultad de Ciencias; UNAM; págs. 6-10. México.
6. Camarillo A. 2006. "Determinación de la actividad de la ACC deaminasa en cepas de Azospirillum". Tesis de Licenciatura. Facultad de Química .UNAM. 91 pp. México.
7. Castro V., Martin C., Silvaa C., y Nunes A. 2010. "Assessing the safety of *Pseudomonas putida* introduction in the environment: An overview of ecotoxicological tests"; Embrapa Environment, Laboratorio de Bioseguridad Ecotoxicológica; Vol. 56; págs 300–305. Brasil.
8. Egamberdiyeva D. 2007. "The effect of plant growth promoting bacteria on growth and nutrient uptake of maize in two different soils"; Applied Soil Ecology; Centro de Agroecología, Tashkent State University of Agriculture; págs. 184-189. Uzbekistan.
9. Esquivel-Cote R. 2002. "Selección e identificación de rizobacterias promotoras de desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con aguas residuales y su

- efecto sobre el desarrollo del jitomate (*Lycopersicon esculentum*)". Tesis de maestría en ciencias. Facultad de Ciencias, UNAM. 154 pp. México.
10. Fernet J. 2008. "Plant bacterial inoculants to remediate hydrocarbon polluted soil"; College of Graduate Studies and Research; Departamento de Ciencias del Suelo; Universidad de Saskatchewan, Canada.
 11. Glick B. 2005. "Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase"; FEMS Microbiology. Lett. Vol. 251. págs. 1-7.
 12. Greenberg B., Huang X., Gurska Y., Gerhardt K., Lampi M., Khalid A., Isherwood D., Chang P., Wang W., Wang H., Dixon D. y Glick B. 2006. "Development and successful field tests of a multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent petroleum and organic contaminants in soils"; Departamento de Biología, Universidad de Waterloo. Canada.
 13. Hamdia H., Benzartib S., Manusadz L., Aoyamaa I. y Jedidid N. 2007. "Bioaugmentation and biostimulation effects on PAH dissipation and soil ecotoxicity under controlled conditions"; Soil Biology & Biochemistry; Departamento de Investigación de Biorrecursos, Escuela de Graduados de Ciencias Ambientales; Universidad de Okayama; págs. 1926–1935. Japón.
 14. Huang X., El-Alawi Y., Gurska J., Glick B. y Greenberg B. 2005. "A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils"; Microchemical Journal; Departamento de Biología, Universidad de Waterloo, págs. 139-147. Canadá.
 15. Johnsona D., Andersonb D. y McGrath S. 2005. "Soil microbial response during the phytoremediation of a PAH contaminated soil"; Soil Biology & Biochemistry; División de Medio Ambiente y Agricultura, Investigación de Rothamsted, págs. 2334–2336. Inglaterra.
 16. Kaimi E., Mukaidani T., Miyoshi M., y Tamaki M. 2004. "Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil"; Department of Environmental Research and Development, Japan; School of Bioresources, Hiroshima Prefectural University, Environmental and Experimental Botany; Vol. 55; págs. 110–119. Japón.
 17. Kechavarzi C., Pettersson K., Leeds-Harrison P., Ritchie L., y Ledin S. 2006. "Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers"; National Soil Resources Institute, Cranfield University at Silsoe, Reino Unido. Institute of Bioscience and Technology, Cranfield University

- at Silsoe, Reino Unido; Department of Soil Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Environmental Pollution. Vol. 145 Págs. 68-74. Suecia.
18. Khan F., Husain T., Hejazi R. 2004. "An overview and analysis of site remediation technologies"; Facultad de Ingeniería y Ciencias Aplicadas, Memorial University of Newfoundland; Journal of Environmental Management; Vol. 71 págs. 95–122; Canada.
 19. Liebeke M., Brözel V., Hecker M., y Lalk M. 2009. "Chemical characterization of soil extract as growth media for the ecophysiological study of bacteria"; Applied Microbial and Cell Physiology, Applied Microbiology and Biotechnology; Vol. 83; págs. 161–173.
 20. López S., Gallegos M.; Pérez L., y Gutiérrez M. 2005. "Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas"; Revista internacional de Contaminación Ambiental; año/vol. 21, no. 002; UNAM. págs. 91-100. México.
 21. Lors F., Perie F., Grand C., Damidot D. 2009. "Benefits of ecotoxicological bioassays in the evaluation of a field biotreatment of pahs polluted soil"; Global NEST Journal, Vol. 11, No. 3, págs. 251-259. Grecia.
 22. Mata A. y Quevedo F. 1998. "Diccionario didáctico de ecología", Editorial de la Universidad de Costa Rica, pág. 78. San José.
 23. Martín C., González A. y Blanco M. 2004. "Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación"; Revista Iberoamericana de Micología. Vol. 21; págs. 103-120. España.
 24. Norma Oficial Mexicana. NOM-021-SEMARNAT-2000. "que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis"; Fecha de Publicación: 17 de octubre del 2000; Diario Oficial de la Federación; México.
 25. Norma Oficial Mexicana. NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. "Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación"; Fecha de Publicación: 30 de Marzo del 2005; Diario Oficial de la Federación; México.
 26. OECD. 2003. "OECD guideline for the testing of chemicals. Terrestrial Plant Test: 208: Seedling Emergence and Seedling Growth Test" Update.

27. Papadopoulos A. 1991. "Growing greenhouse tomatoes in soil and in soilless media"; Agriculture Canada Publication, y 3Minister of Supply and Services Canada; Research Station. pág. 30-77. Canada.
28. Pérez G. 2006. "Calidad del suelo en un sitio contaminado con hidrocarburos y sometido a un proceso de remediación"; Tesis para obtener el grado académico de maestra en ciencias (Edafología); Posgrado en Ciencias Biológicas; Facultad de Ciencias; UNAM; págs. 9-29; México.
29. Piña M. 2004. "Estudio de la biodegradación aerobia de hidrocarburos en un suelo conformado artificialmente"; Tesis para obtener el grado académico de maestra en ciencias; Posgrado en Ciencias Biológicas; Facultad de Ciencias; UNAM; págs. 37-41. México.
30. Rivera M. 2008. "Efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas de alfalfa (*Medicago sativa*) y de rabanito (*Raphanus sativus*) utilizando suelos de uso industrial y agrícola"; Tesis para obtener el grado académico de maestra en ciencias; Posgrado en Ciencias Biológicas; Facultad de Ciencias; UNAM; págs. 21-31. México.
31. Sabate J., Viñas M. y Solanas A. 2003. "Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils"; International Biodeterioration & Biodegradation; Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Barcelona; págs. 19-25. España.
32. Serrano A., Gallego M. González J., Tejada M. 2007. "Natural attenuation of diesel aliphatic hydrocarbons in contaminated agricultural soil". Departamento de Química Analítica; Departamento de Química Agrícola y Pedología, , Campus de Rabanales, Universidad de Córdoba; y Departamento de Cristalografía, Mineralogía y Química Agrícola, Universidad de Sevilla. Environmental Pollution. págs. 494-502. España.
33. Shahriari M., Savaghebi-Firoozabad G., Azizi M., Kalantari F., y Minai-Tehrani D. 2007. "Study of growth and germination of *Medicago sativa* (Alfalfa) in light crude oil-contaminated soil". Soil Science Engineering Department, College of Agriculture and Natural Resources, Tehran University. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences, Vol. 3(1). págs. 46-51. Iran.
34. Siebe C., Jahn R. y Stahr K. 2006. "Manual para la descripción y evaluación ecológica de suelos en el campo"; 2ª ed.; UNAM, D.F.; 71 pp. México
35. Tesar M., Reichenauer T., y Sessitsch A. 2002. "Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation

- of diesel fuel”; ARC Seibersdorf research G.m.b.H., Division of Environmental and Life Sciences. *Soil Biology & Biochemistry*. Vol. 34; págs. 1883–1892. Austria.
36. Thompson I., van der Gast C., Ciric L., y Singer A. 2005. “Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection”; *Environmental Biotechnology Section and Molecular Microbial Ecology Section, NERC Centre for Ecology and Hydrology. Environmental Microbiology* Vol. 7(7), págs. 909–915. Inglaterra.
37. Ulacio D., Pérez C. y Pineda J. 1997. “Microflora asociada a las raíces de plantas de tabaco provenientes del Estado Portuguesa”; *Bioagro*; Vol. 9(1); págs. 3-11. Portugal.
38. USEPA [Agencia de Protección Ambiental de los EE.UU. (U.S. Environmental Protection Agency)]. 2000. “Introduction to Phytoremediation”. Laboratorio de Investigación de Manejo de Riesgo Nacional de los EE.UU.; Oficina de Desarrollo e Investigación; 600/R-99/107. pág. 1 y 44. EE.UU.
39. van der Gaag D. y Wever G. 2005. “Conduciveness of different soilless growing media to *Pythium* root and crown rot of cucumber under near-commercial conditions”; *Applied Plant Research, Business Unit Glasshouse Horticulture, European Journal of Plant Pathology*. Vol. 112; págs. 31–41. Holanda.
40. Valderrama B. y Téllez-Sosa J. 2000. “Microbiología del petróleo y sus derivados”; Instituto de Biotecnología. Universidad Nacional Autónoma de México. AP 510-3 págs. 1-30. México.
41. Volke T. y Velasco J. 2002. “Tecnologías de remediación para suelos contaminados”; INE-SEMARNAT; págs. 30-38. México.
42. Vermeulen J. 2007. “Ripening of PAH and TPH polluted sediments – Determination and quantification of bioremediation parameters”. Tesis doctoral de la Universidad Wageningen en Wageningen. págs. 30-79. Alemania.
43. Zhuang X., Chen J., Shim H. y Bai Z. 2007. “New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation”. *Environment International*; Oficina de Ciencias y Tecnología para los Recursos Ambientales. Academia China de las Ciencias. págs. 406-413. China.