



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**SEGUIMIENTO DEL PROCESO DE FITORREMEDIACIÓN
ASISTIDA MEDIANTE DETERMINACIÓN INDIRECTA DE AIA**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

JACQUELINE FUENTES JAIME



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

VOCAL: Profesor: ALEJANDRO CAMACHO CRUZ

SECRETARIO: Profesor: RUTH EDITH MARTÍN FUENTES

1er. SUPLENTE: Profesor: ROSALBA ESQUIVEL COTE

2° SUPLENTE: Profesor: MARÍA GUADALUPE TSUZUKI REYES

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA

EXPERIMENTAL, DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

SUPERVISOR TÉCNICO: M EN C. GUADALUPE TSUZUKI REYES

SUSTENTANTE: JACQUELINE FUENTES JAIME



Reconocimientos

Se hace patente el apoyo recibido por parte del proyecto DGAPA PAPIIT IN-107209 “Desarrollo de un humedal artificial de alta eficiencia para remoción de contaminantes orgánicos y microorganismos patógenos”, así como del PAIP FQ-VMLP 6190-14 2009 y 2010.

Agradecimientos

Se manifiesta gratitud por el apoyo y colaboración en la realización de este proyecto:

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por permitir integrarme a su grupo de investigación en el Laboratorio de Microbiología Experimental.

A la M en I. Holdayara Emilia Hernández Reyes, por sus consejos y sugerencias constructivas para la elaboración de la presente tesis, así como por su apoyo y disponibilidad de tiempo.

A la M en C. Guadalupe Tsuzuki Reyes, por su disposición para resolver dudas cuando éstas surgían y por su apoyo técnico.

A Don Félix del Laboratorio de Orgánica por suministrar reactivos cuando estaban carentes en el Laboratorio de Microbiología Experimental.

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Experimental.

A Vianney por su apoyo moral y compañía durante mi estancia en el laboratorio.

A Dios, por su invaluable apoyo espiritual.



Dedicatoria

A mi madre, quien con su abnegación paciente y leal esperanza me ha inculcado los mejores valores, forjándome de tal modo como una persona de provecho. Gracias por tu apoyo incondicional y desinteresado durante la realización y culminación de todos mis proyectos, así como por tu prudencia e intrepidez demostrados durante los infortunios presentados en nuestras vidas.

A mi hermanito Alan, con quien he compartido las mejores experiencias rebosantes de alegría y felicidad. Gracias por enseñarme que los acontecimientos más sencillos y espontáneos de la vida son los que te colman de plenitud y sabiduría.

CONTENIDO

<i>Índice de figuras</i>	<i>vii</i>
<i>Índice de tablas</i>	<i>ix</i>
RESUMEN	x
Capítulo 1. Introducción	14
Capítulo 2. Objetivos y estrategia de trabajo	19



2.1	Objetivos	19
2.2	Hipótesis.....	19
2.3	Estrategia de trabajo	20
Capítulo 3. Marco conceptual		22
3.1 Diesel		22
3.1.1	Composición del crudo de petróleo	22
3.1.2	Refinado del crudo de petróleo.....	27
3.1.3	Características generales del diesel.....	29
3.1.4	Impacto ambiental y contaminación por el uso de diesel.....	29
3.2	Fitorremediación	30
3.2.1	Tecnologías de remediación de suelos.....	30
3.2.2	Fitorremediación asistida.....	31
3.3	El suelo.....	34
3.3.1	Componentes y estructura del suelo	34
3.3.2	La rizosfera	38
3.3.3	Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en un suelo	39
3.4	<i>Azospirillum lipoferum</i>	40
3.4.1	Características generales.....	40
3.4.2	Distribución	41
3.4.3	Asociación <i>Azospirillum sp.</i> - planta	41
3.4.4	Promoción del crecimiento vegetal mediado por <i>Azospirillum sp.</i>	43
3.5	Ácido indol-3-acético	43
3.5.1	Auxinas.....	43
3.5.2	Importancia fisiológica de las auxinas producidas por <i>Azospirillum</i>	44
3.5.3	Vías de síntesis de AIA en <i>Azospirillum</i>	46
Capítulo 4. Diseño experimental y metodología		50



4.1	Experimentación relacionada con suelo.....	50
4.1.1	Obtención y caracterización fisicoquímica del suelo natural	50
4.1.2	Preparación del suelo artificial y caracterización fisicoquímica.....	50
4.1.3	Hidrocarburo contaminante	51
4.1.3.1	Obtención de la muestra de diesel.....	51
4.2	Determinaciones analíticas en suelo durante la etapa de saneamiento.....	52
4.2.1	Determinación de fósforo soluble en bicarbonato de sodio usando ácido ascórbico como agente reductor	52
4.2.2	Cuantificación de nitrógeno total (Kjeldahl)	54
4.2.3	Evaluación de hidrocarburos fracción media.....	55
4.3	Experimentación asociada con <i>Azospirillum lipoferum</i>	56
4.3.1	Cepas de <i>Azospirillum lipoferum</i> (AZm1, AZm3 y AZm5).....	56
4.3.2	Verificación de pureza de las cepas	56
4.3.3	Tolerancia al diesel de AZm1, AZm3 y AZm5.....	56
4.3.4	Selección de especie vegetal (<i>Medicago sativa</i> , <i>Lolium multiflorum</i> y <i>Lolium perenne</i>) y cepa de <i>Azospirillum lipoferum</i> (AZm1, AZm3 y AZm5).....	58
4.4	Diseño experimental.....	61
4.4.1	Condiciones de crecimiento y material vegetal.....	61
4.4.2	Fitorremediación asistida y convencional	62
4.4.3	Bioestimulación	62
4.5	Análisis estadístico	62
4.6	Análisis al vegetal	65
4.6.1	Porcentaje de viabilidad de las semillas	65
4.6.2	Longitud radical y de parte aérea.....	65
4.6.3	Determinación indirecta de AIA	65
	Capítulo 5. Análisis y discusión de resultados.....	69



5.1 Cuenta de UFC de <i>Azospirillum lipoferum</i> por mililitro	69
5.2 Cuenta de UFC de <i>Azospirillum lipoferum</i> adsorbidas en las semillas.....	69
5.3 Propiedades físicas y químicas del suelo natural y artificial	71
5.4 Efectos de la adición de <i>Azospirillum lipoferum</i> sobre <i>Lolium multiflorum</i> en el proceso de fitorremediación asistida.....	73
5.5 Estimación del efecto de fitorremediación	81
5.6 Estimación de AIA radical.....	84
5.7 Impacto del diesel en la producción de AIA.....	86
5.8 Discusión integral.....	87
Capítulo 6. Conclusiones	91
Referencias bibliográficas	93
Anexo A. Resultados monitoreados durante el transcurso experimental	1-A
Anexo B. Análisis estadístico.....	1- B

Índice de figuras

Figura 2.1. Diseño experimental desarrollado para el montaje y ejecución del proyecto.....	20
Figura 3.1. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo.....	23
Figura 3.2. Estructuras químicas de hidrocarburos aromáticos policíclicos representativos.	24
Figura 3.3. Esquema de los horizontes de un suelo.....	36



Figura 3.4. Vías de producción de AIA dependientes de triptófano.....	47
Figura 4.1. Determinación de fósforo en el suelo experimental. A) Filtración de suelo, B) Obtención del filtrado, C) Formación del complejo coloreado.....	53
Figura 4.2. Cuantificación de nitrógeno. A) Digestión de la muestra, B) Destilación, C) Muestras valoradas.....	55
Figura 4.3. Tolerancia de <i>A. lipoferum</i> al diesel. A) AZm5 en medio Nfb, B) AZm5 en agar nutritivo, C) AZm3 en medio Nfb.....	57
Figura 4.4. Cuenta de UFC por mililitro de acuerdo al método de diluciones seriadas.....	59
Figura 4.5. Cuenta de UFC de las cepas AZm1, AZm3 y AZm5 adheridas a las semillas de alfalfa (<i>Medicago sativa</i>), rye grass anual (<i>Lolium multiflorum</i>) y rye grass perenne (<i>Lolium perenne</i>).....	60
Figura 4.6. Diseño experimental empleado durante la realización del proyecto.....	64
Figura 4.7. Distribución de las unidades experimentales.....	61
Figura 4.8. Diferente coloración dependiente de la concentración de AIA en las muestras.....	66
Figura 5.1. Relación del número de UFC por mililitro de las cepas AZm1, AZm3 y AZm5.....	69
Figura 5.2. Relación de las cepas AZm1, AZm3 y AZm5 adheridas a las semillas <i>Medicago sativa</i> , <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i>	70
Figura 5.3. Comparación de los porcentajes de sobrevivencia durante el proceso de saneamiento.....	73
Figura 5.4. Longitudes radicales durante 60 días.....	76
Figura 5.5. Longitudes aéreas de rye grass anual durante 60 días de transcurso experimental de los diferentes bloques.....	77
Figura 5.6. Cambios en la concentración de fósforo en suelo con las tecnologías de saneamiento empleadas.....	79
Figura 5.7. Comparación de los niveles de nitrógeno cuantificado durante el período de saneamiento.....	80



Figura 5.8. Concentración de hidrocarburos fracción media durante 60 días.....82

Figura 5.9. Monitoreo de la producción de AIA.....85

Figura 5.10. Correlación entre la producción de AIA y disipación de diesel.....87

Índice de tablas

Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 16 HAP prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), 2010.....26

Tabla 3.2. Fuentes de origen de los HAP.....27

Tabla 3.3. Fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo.....28



Tabla 3.4. Principales propiedades del combustible diesel.....	29
Tabla 3.5. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	32
Tabla 3.6. Comparación del tamaño y número de partículas de arena, limo y arcilla.....	36
Tabla 3.7. Cantidad de nutrimentos en la superficie de suelos mineralizados en zonas templadas.....	37
Tabla 4.1. Determinaciones realizadas de acuerdo al bloque correspondiente.....	63
Tabla 4.2. Curva patrón para la estimación de la concentración de AIA.....	66
Tabla 5.1. Resultados de la caracterización del suelo natural de Tierra Blanca, Veracruz....	71
Tabla 5.2. Resultados de textura del suelo de Tierra Blanca, Veracruz.....	72
Tabla 5.3. Caracterización fisicoquímica del suelo artificial.....	72
Tabla 5.4. Porcentajes de remoción de hidrocarburos fracción media.....	83

RESUMEN

La fitorremediación es una tecnología de saneamiento que aprovecha la presencia de plantas para mejorar la remoción de contaminantes en suelos. Una variación corresponde a fitorremediación asistida, la cual emplea bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) para promover la remoción de contaminantes. La promoción del crecimiento mediado por BPCV es una consecuencia de la producción de fitohormonas, entre ellas el ácido indol-3-acético (AIA).



El propósito de este estudio se enfocó al seguimiento en la producción de AIA previa inoculación de *Azospirillum lipoferum* en un proceso de fitorremediación asistida en suelo artificial contaminado con diesel. Para tal efecto, se realizó la evaluación experimental, durante 60 días, empleando la cepa bacteriana AZm1 de *A. lipoferum* y la especie vegetal rye grass anual (*Lolium multiflorum*) en un suelo contaminado con 18 706 mg Kg⁻¹ de diesel.

El diseño experimental fue de tipo unifactorial con cuatro niveles del factor: fitorremediación asistida, fitorremediación convencional, bioestimulación y atenuación natural. La bioestimulación consistió en la adición controlada de fuentes enriquecedoras de urea y fosfato diamónico (5:10).

Los resultados revelaron que la presencia de *A. lipoferum* en el proceso de fitorremediación asistida incrementó la concentración de AIA, lo que se tradujo en una remoción más eficiente (71.88%) con respecto al control. Sin embargo, la producción mayor de AIA correspondió a la tecnología de bioestimulación, obteniendo una remoción equivalente a 75.33%; el análisis estadístico (ANOVA) reveló diferencias significativas relacionadas con las remociones de diesel de los diferentes bloques. Mediante la bioestimulación es posible alcanzar 56.97% de remoción al día 20, el cual es superior al resto de las tecnologías.

La inoculación previa de *A. lipoferum* no mejoró el porcentaje de sobrevivencia en rye grass anual, pero tuvo un efecto positivo relacionado con el porcentaje de remoción del diesel. Las mayores longitudes aéreas y radicales promovieron mejores remociones de hidrocarburo.

El testigo S+P obtuvo la mayor longitud aérea durante 60 días de tratamiento, mientras que la fitorremediación convencional mostró una disminución relacionada con la longitud aérea como consecuencia de la adición de diesel y la carencia de *A. lipoferum*. A pesar de la adición de diesel en la fitorremediación asistida y bioestimulación, los desarrollos aéreos fueron mayores comparando con sus respectivos controles (S+B+P+F y S+B+P) y con la fitorremediación convencional, lo que demostró que la presencia de *A. lipoferum* ejerció un efecto positivo concerniente al desarrollo aéreo de *Lolium multiflorum*.

La cuantificación de nitrógeno mostró una tendencia de incremento durante la etapa experimental. No obstante, el análisis estadístico (ANOVA) indicó la no existencia de diferencias significativas.



Los resultados mostraron que los principales mecanismos promotores del desarrollo vegetal mediados por *A. lipoferum* contribuyeron al progreso durante el proceso de fitorremediación.

La tecnología de saneamiento con mejor rendimiento correspondió a bioestimulación (75.33%) seguida por fitorremediación asistida (71.88%) y fitorremediación convencional (66.56%), respectivamente.



CAPÍTULO 1

*“¿Acaso comprendemos el engaño sutil de las flores,
o el firme tono de un paisaje de verano;
apreciamos acaso del cielo sus colores?
¿Buscamos, entonces el rescate del ser humano?
Y es que al mirar atónitos el perfil de la montaña,
el ámbito infinito de la comba azul,
nos sobrecoge una sensación extraña,
nos envuelve el manto, ese manto de tul.
Oigo el tenue rumor de los seres pequeños,
el trino del ave en su vuelo,
el choque del viento, plegarias, ensueños,
ansiosas notas que suben al cielo...”*

Hesse Herman, 2002, “El lobo estepario”.



1. Introducción

El cuidado del ambiente exige la búsqueda de soluciones a los problemas ecológicos. Los cambios que ocurren en el ambiente, cualquiera que sea su origen, afectan la salud y la calidad de vida del ser humano, así como el entorno social y el equilibrio de los ecosistemas. La calidad de vida puede mejorarse con labores preventivas y prospectivas que promuevan una reciprocidad satisfactoria entre ambiente y desarrollo.

La industria petrolera y sus derivados (petróleo refinado, combustibles destilados, desechos de perforación y residuos de destilación), en el ámbito mundial, están considerados como de alto riesgo ambiental. Lo anterior debido a que las actividades de exploración, extracción y transporte de los hidrocarburos tienen intrínsecamente un riesgo latente de fugas eventuales que conllevan a la contaminación de importantes superficies de suelo o cuerpos de agua (García, 2000; Juárez, 2007; Nie *et al.*, 2011).

La industria petroquímica en México se ha desarrollado aceleradamente, generando diversos satisfactores económicos. Sin embargo, su expansión y desarrollo también ha dado origen a graves problemas ambientales, derivados de emergencias ambientales, con graves repercusiones a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas. Entre las causas que han generado este deterioro ambiental por la contaminación de cuerpos de agua y suelos a lo largo de todo el país, se encuentran las siguientes: (i) manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos; (ii) mantenimiento inadecuado o falta de éste en instalaciones petroleras; (iii) explosiones en instalaciones de alto riesgo; (iv) fugas en líneas de conducción y (v) derrames de hidrocarburos (CENAPRED, 2009; PROFEPA, 2010). Con respecto a los derrames y fugas de hidrocarburos, PEMEX reporta que durante el año 2009 hubo un total de 7 033 toneladas de hidrocarburos (crudo, diesel y gasolina) derramados en su mayoría en tierra, en los cuatro sectores de ductos del país. Esta última cifra es importante, ya que de esta manera puede estimarse la magnitud de la contaminación en los sitios cercanos a los derrames. Uno de los



estados con mayor incidencia de sitios contaminados por actividades petroleras es Veracruz. De acuerdo con información de PEMEX, dos de los lugares más contaminados por hidrocarburos a nivel nacional son la refinería "Lázaro Cárdenas" y el pantano de "Santa Alejandrina", ambos ubicados en el sureste de México.

Entre los contaminantes orgánicos se encuentra el diesel, el cual es un destilado formado por compuestos de hidrocarburos entre 10-20 carbonos teniendo una mayor concentración de cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). La exposición a concentraciones elevadas de vapores causan irritación a los ojos, nariz, garganta, bronquios y pulmones; dolor de cabeza y mareos; puede ser anestésico y también causar efectos al sistema nervioso central. Los HAP afectan a los organismos a través de acciones tóxicas sistémicas o carcinogénicas, éstas acciones pueden interferir con las funciones de los sistemas enzimáticos de las membranas celulares (Hoffman *et al.*, 2003).

Dicho tipo de contaminación ocasiona un deterioro progresivo de la calidad del ambiente y a su vez genera una amenaza a la salud pública así como un desequilibrio ecológico. Es por esto que se ha establecido un marco regulador para la eliminación de residuos peligrosos (NOM-138, SEMARNAT, 2008) y limpieza de lugares contaminados, así como para la prevención del deterioro ambiental. (Atlas y Bartha, 2002; Tang *et al.*, 2010).

Hace más de una década, en países avanzados la atención se enfocó al desarrollo y comercialización de tecnologías para el saneamiento de suelos y acuíferos contaminados, las cuales en su conjunto se denominan tecnologías de remediación. De acuerdo con su funcionamiento, las tecnologías de remediación se clasifican en: biológicas, fisicoquímicas y térmicas.

Las tecnologías de tipo biológico representan una alternativa muy atractiva, debido a que se basan en procesos naturales donde los contaminantes pueden ser realmente transformados y algunos completamente mineralizados, además son



ambientalmente amigables y económicamente asequibles. Esta categorización está representada por biorremediación y fitorremediación, ambas están intrínsecamente relacionadas con la actividad microbiana que puede desarrollarse en el microambiente del suelo y subsuelo (Stephan, 2003). En la biorremediación se recurre a microorganismos degradadores autóctonos o exógenos, la cantidad del inóculo a emplear depende del tamaño de la zona contaminada, dispersión del contaminante y velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores, sin embargo, es deseable mejorar la disponibilidad y viabilidad de los microorganismos autóctonos antes que usar microorganismos exógenos. En tanto que la fitorremediación asistida se refiere al uso de plantas y la contribución de microorganismos asociados a su raíz, tal es el caso de *Azospirillum lipoferum*. (Compant *et al.*, 2010).

Azospirillum lipoferum se encuentra dentro de la clasificación de Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), estas bacterias son aptas para promover el crecimiento de las plantas mediante la colonización radicular (Bashan, 2005). Aunque las BPCV fueron inicialmente aprovechadas para optimizar el rendimiento en campos de producción agrícola, una progresiva atención ha sido dirigida a su aplicación en procesos de fitorremediación.

De acuerdo con Huang *et al.*, (2004), en un proceso de fitorremediación, la adición de BPCV incrementa la remoción de compuestos orgánicos contaminantes como consecuencia de la acumulación de biomasa radical.

Durante los procesos de fitorremediación asistida, *Azospirillum lipoferum* expresa capacidad para asociarse a las raíces y favorece a la planta mediante promoción del crecimiento, fijación de nitrógeno y solubilización de fósforo, además se tienen informes relacionados con la producción de fitohormonas (auxinas, giberelinas, citocininas) la cuales modifican el desarrollo, morfología y función de las raíces por un mecanismo aún no completamente establecido, mejorando la absorción de



nutrimentos y agua, por lo que se produce un incremento de biomasa y una mejor nutrición del vegetal . (Bashan y Holguin, 1997; López *et al.*, 2005).

El representante auxínico más estudiado corresponde al ácido indol-3- acético (AIA), del cual se tiene un especial seguimiento en este proyecto.

La inoculación con *Azospirillum* puede afectar el metabolismo de fitohormonas endógenas de las plantas; sin embargo, no se sabe si este fenómeno es debido al AIA producido por la bacteria, o por el incremento en la síntesis de hormonas en el tejido de la raíz (Aguilar *et al.*, 2008).



CAPÍTULO 2

***“Cuanto más comprensible parece el universo,
más parece también carecer de sentido”***

Weinberg Steven en Next, 2007. Crichton Michael



2. Objetivos y estrategia de trabajo

2.1 Objetivos

-Objetivo general

Evaluar el proceso de fitorremediación asistida por *Azospirillum lipoferum*, mediante determinación indirecta de ácido indol-3-acético (AIA) en un suelo artificial contaminado con diesel.

-Objetivos particulares

- Definir el tipo de semilla con la cual *Azospirillum lipoferum* tendrá mejor compatibilidad.
- Cuantificar el efecto sobre el crecimiento vegetal provocado por la contaminación de diesel en el suelo artificial.
- Determinar las actividades de solubilización de fósforo y fijación de nitrógeno asociadas a *Azospirillum lipoferum*.
- Determinar si existe una correlación entre aumento en el tamaño vegetal y la eficiencia en la remoción de diesel.
- Evaluar el efecto bioestimulante de urea y fosfato diamónico en el suelo conformado artificialmente mediante la estimación de la remoción de hidrocarburos.
- Evaluar diferentes procesos de fitorremediación (asistida, convencional y bioestimulación) a efecto de determinar el mejor en cuanto a remoción de diesel.

2.2 Hipótesis

Si en el proceso de fitorremediación asistida se identifica una relación directa entre la producción de AIA y disipación de diesel, entonces se podrá proponer que la producción de AIA mediada por *Azospirillum lipoferum* y *Lolium multiflorum* conduce a un progreso en la remoción de diesel.



2.3 Estrategia de trabajo

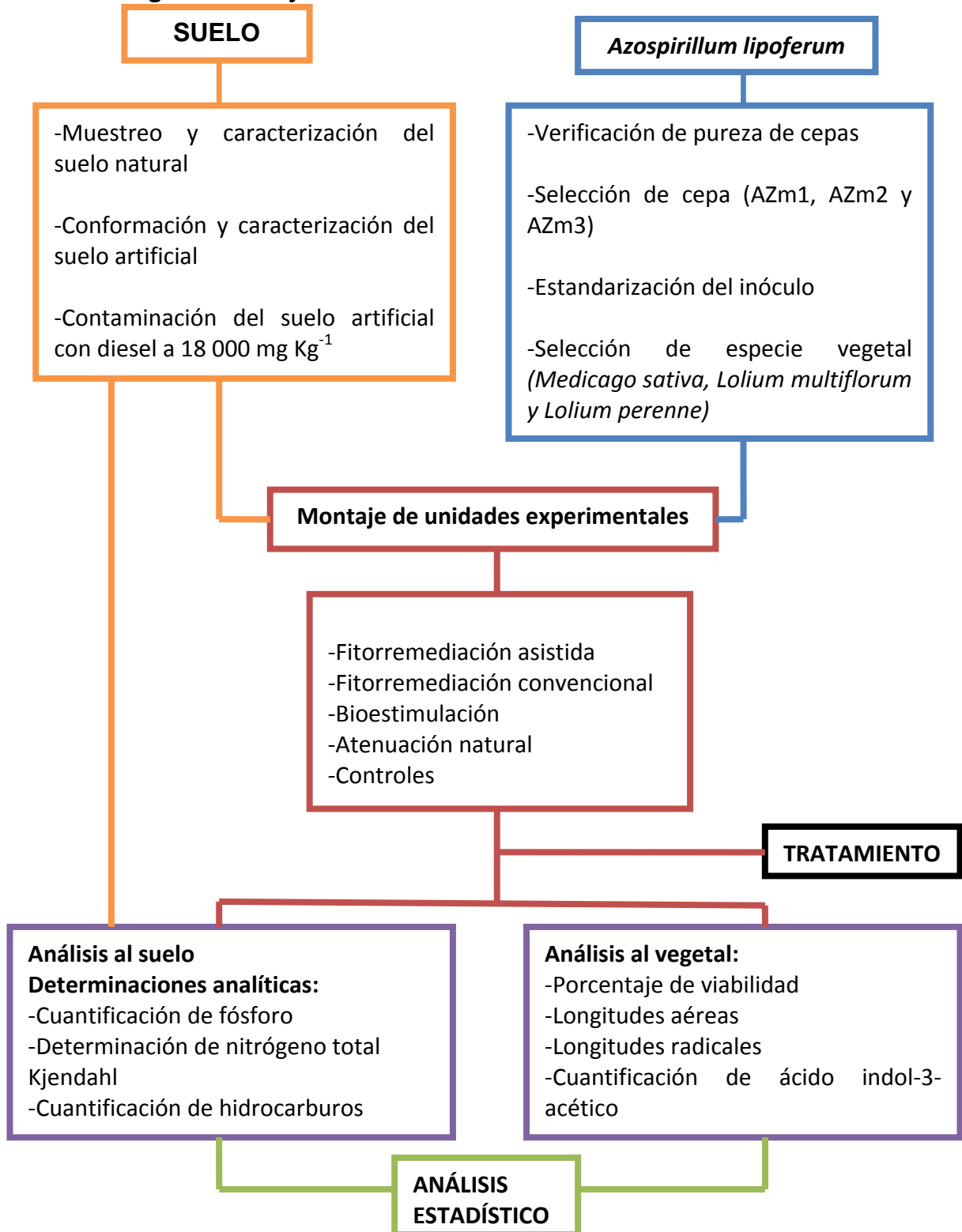


Figura 2.1. Diseño experimental desarrollado para el montaje y ejecución del proyecto.



CAPÍTULO 3

“Si preguntamos por ejemplo si la posición del electrón permanece siendo la misma, hemos de decir que no; si preguntamos si la posición del electrón varió con el tiempo, tenemos que decir que no; si preguntamos si el electrón está en reposo, debemos decir que no; si preguntamos si está en movimiento, hemos de decir que no...”

Oppenheimer Robert en Pálpito de una estatua sensible, Icaza José, 1997.



3. Marco conceptual

3.1 Diesel

3.1.1 Composición del crudo de petróleo

La formación del petróleo está asociada a los procesos de descomposición de organismos de origen animal y vegetal, que fueron comprimidos por altas presiones y calor, dando origen al petróleo y al gas natural, que resultaron incorporados en depósitos (IMP, 2009; Juárez, 2007).

El crudo de petróleo se caracteriza por ser un líquido viscoso, negro y con una composición química compleja. Los hidrocarburos componen la familia predominante de compuestos (un 50-98% de la composición). Principalmente son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. (Fernández *et al.*, 1992; Viñas, 2005). La composición esencial de un crudo está condicionada por la predominancia de los compuestos tipo hidrocarburo: 84-87% de carbono, 11-14% de hidrógeno, de 0-8% de azufre, 0-4% de oxígeno y nitrógeno y metales como el níquel y el vanadio (Howe-Grant, 1996; Viñas, 2005).

Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones:

- Fracción saturada - n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas, cicloparafinas y hopanos;
- Fracción aromática - monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP);
- Fracción de resinas - agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas;
- Fracción de asfaltenos - son menos abundantes y consisten en compuestos más polares, entre ellos: hidrocarburos heterocíclicos, hidrocarburos oxigenados, fenoles polihidratados y ácidos nafténicos (Viñas, 2005).

El crudo de petróleo contiene una mezcla muy compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos



bencénicos en su estructura. Entre ellos se encuentran los hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (con más de dos anillos bencénicos).

Entre los hidrocarburos monoaromáticos se encuentran: el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno) de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad (Viñas, 2005).

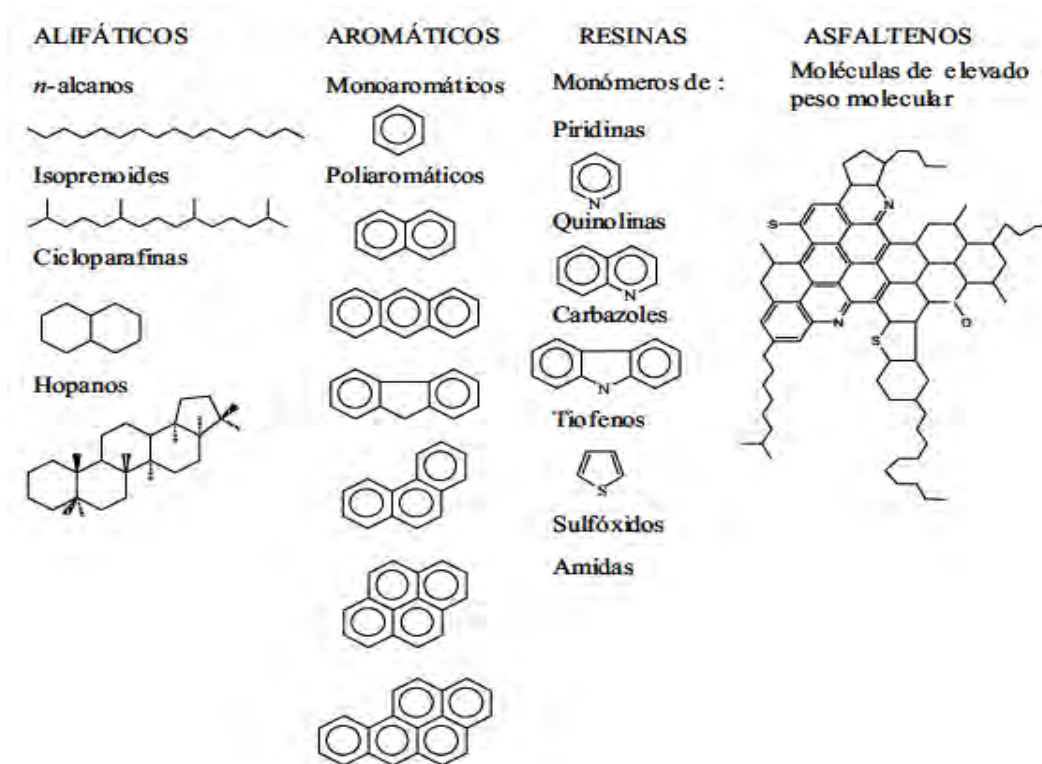


Figura 3.1. Estructuras químicas de diferentes componentes mayoritarios de un crudo de petróleo, (Viñas, 2005).

Entre los hidrocarburos polimaromáticos se encuentran: los hidrocarburos diaromáticos, entre ellos encontramos el naftaleno y sus alquilados que constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en un crudo (Figura 3.1.).



Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos se encuentran: el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos.

Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, se encuentran el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencénico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzo (a) pireno (5 anillos aromáticos), (Figura 3.1.). También se pueden incluir compuestos muy relacionados con los hidrocarburos aromáticos que contienen anillos aromáticos heterocíclicos con azufre (tiofenos, dibenzotiofenos) o nitrógeno (carbazoles), (Viñas, 2005).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (en adelante HAP) se definen por ser estructuras formadas por 2 o más moléculas de benceno fusionadas (Figura 3.2.). La estructura atómica del anillo bencénico les confiere una gran estabilidad termodinámica debido a la elevada energía de resonancia negativa que proporciona contener seis orbitales moleculares π por solapamiento cíclico. Todos los compuestos con sistemas electrónicos π -cíclicos son catalogados como aromáticos.

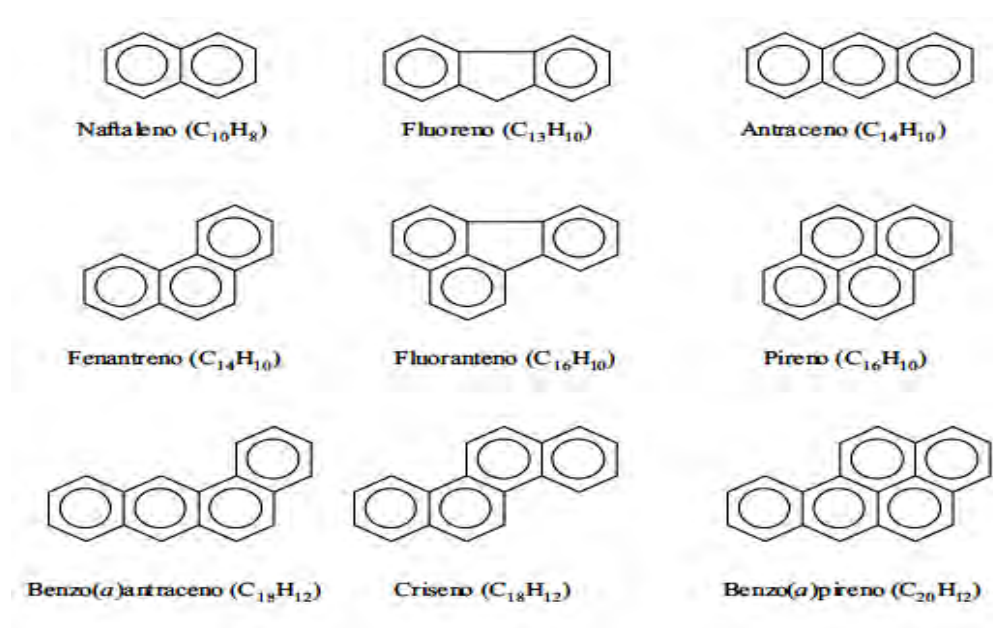


Figura 3.2. Estructura química de hidrocarburos aromáticos policíclicos representativos, (Viñas, 2005).



El anillo bencénico es una de las estructuras más ampliamente distribuida en la naturaleza, se encuentra formando parte de compuestos mono y policíclicos, así como de otras sustancias más complejas como la lignina (Viñas, 2005). Los HAP se forman por la exposición de moléculas orgánicas a elevadas temperaturas (pirólisis), así como también por exposiciones a menor temperatura (100-150 °C) y a elevadas presiones durante millones de años en sedimentos, durante la formación del petróleo (origen petrogénico). Las mezclas de HAP de origen petrogénico se distinguen de las pirolíticas por ser más ricas en HAP alquilados debido a la diferente temperatura de formación.

Las características más importantes que condicionan el comportamiento de los HAP en el ambiente van ligadas a las características fisicoquímicas propias de la estructura de cada HAP (Tabla 3.1.). Son de gran importancia la hidrofobicidad y la volatilidad de los HAP de menor peso molecular. Debido a las propiedades hidrofóbicas, los HAP muestran una fuerte tendencia a adsorberse a las superficies, lo que dificulta su biodegradación, así como a acumularse en la cadena trófica (Clements *et al.*, 1994; Benavides *et al.*, 2006).

Los HAP existentes en el ambiente pueden proceder tanto de la naturaleza como de la actividad humana (Tabla 3.2.). Básicamente las fuentes de HAP se resumen en tres: el petróleo u origen petrogénico, la combustión u origen pirolítico (a partir de combustibles fósiles, madera y erupciones) y la síntesis por seres vivos, cuya aportación es minoritaria (Viñas, 2005; Juárez, 2007).

La Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2010) ha incluido los HAP entre sus contaminantes prioritarios. Esto fundamentalmente se debe a la peligrosidad intrínseca de los HAP, debido a la toxicidad aguda y a la toxicidad de tipo teratogénico, mutagénico y carcinogénico que presentan (Atlas y Bartha, 2002). También se bioacumulan y su biodegradación en general es mucho más lenta, especialmente los de elevado peso molecular (Kanaly y Harayama, 2000; Benavides *et al.*, 2006).



Tabla 3.1. Propiedades fisicoquímicas de los 15 HAP prioritarios de la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA), 2010.

Compuesto	PM ^a	Punto fusión (°C)	Punto ebullición (°C)	Solubilidad agua (mg L ⁻¹) ^b
Naftaleno	128	80	218	30.0
Acenaftileno	152	92	265	16.1
Acenafteno	154	96	279	3.47
Fluoreno	166	116	298	1.8
Fenantreno	178	101	340	1.29
Antraceno	178	218	342	0.073
Fluoranteno	202	110	375	0.260
Pireno	202	150	404	0.135
Benz(a)antraceno	228	159	435	0.014
Benzo(b)fluoranteno	252	168	ND	0.0012
Benzo(k)fluoranteno	252	217	480	0.0005
Benzo(a)pireno	252	179	495	0.0038
Dibenzo(a,h)antraceno	278	267	524	0.0005
Benzo(g,h,i)perileno	276	278	ND	0.0002
Indeno(1,2,3-cd)pireno	276	162	ND	0.062

^a PM: Peso molecular; ^b 20 °C; ND: No determinado. Datos de la tabla según (USEPA, 2010).

En México la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SA1-2008 que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación publicada el 23 de agosto del 2010, establece seis HAP como los más persistentes y perjudiciales para la salud humana; éstos son: benzo[a,]pireno, dibenzo[a,h]antraceno, benzo[a]antraceno, benzo[b]fluranteno, benzo[k]fluoranteno, e indeno (1,2,3-cd) pireno.



Tabla 3.2. Fuentes de origen de los HAP.

Naturales:
Fuegos forestales
Filtraciones naturales de petróleo
Erupciones volcánicas
Antropogénicas:
Combustión de madera y combustibles fósiles
Emissiones de vehículos y aviones
Industria del petróleo
Accidentes de transporte
Almacenamiento
Refinado
Residuos
Creosota
Utilización de petróleo y derivados
Procesos industriales
Aguas residuales urbanas e industriales
Humo de tabaco
Incineración de residuos

3.1.2 Refinado del crudo de petróleo

Para comprender la naturaleza química de los diferentes derivados del petróleo que potencialmente pueden ser contaminantes del ambiente, hay que entender el proceso de refinado del crudo utilizado para la obtención de estos productos petrolíferos. El refinado pasa por un proceso de destilación, con la finalidad de eliminar el color y olor, así como también, los compuestos del azufre. Se destila a temperaturas crecientes obteniendo 4 fracciones principales: gasolina, queroseno, destilados medios (querosenos, gasoil, aceites lubricantes) y un residuo. Este residuo se destila al vacío obteniéndose otros aceites lubricantes (Tabla 3.3.). Así pues, la composición química de la gasolina es diferente a la del gasoil debido a que se han obtenido como productos de destilación del petróleo a partir de diferentes intervalos de temperatura (Tabla 3.3.). La obtención de gasolina es menos directa que la de los gasóleos, ya que en una primera fase se obtiene por destilación del crudo entre 20-180 °C. Esto implica una composición de n-alcanos más ligera (C6-



C11) que los gasóleos (C10-C25). En la gasolina encontramos como componentes más abundantes: butano, isopentano, pentano, mono y dimetilpentanos, hexano, BTEX, mono y dimetilhexanos, trimetilbencenos, metiletilbencenos, y en menor cantidad, los naftalenos.

Tabla 3.3. Fracciones que se pueden obtener durante el refinado por destilación de un crudo de petróleo.

Fracción	Temperatura de ebullición (°C)	Composición aproximada	Usos
Gasolina ligera	20-100	C5H12-C7H16	Disolvente
Bencina	70-90	C6-C7	Limpieza en seco
Ligroína	80-120	C6-C8	Disolvente
Gasolina	20-180	C6-C11	Carburante de motores
Queroseno, Jet fuel	200-300	C12-C16	Alumbrado y carburante
Gasoil, Diesel	200-350	C13-C18	Carburante de motores
Aceite lubricante	200-350	C16-C20	Lubricantes
Grasas, vaselinas	250-400	C18-C22	Farmacéutica
Cera de parafina	245-540	C20-C45	Velas
Betum asfáltico (35% peso)	> 540	C30-C45	Alquitrán asfáltico

Datos según Viñas, 2005.

Los combustibles ligeros y el gasoil forman parte de la fracción intermedia de destilación en el proceso de refinado, lo que implica un rango de puntos de ebullición entre 185- 345 °C, encontrando compuestos de 10 a 25 átomos de carbono, siendo los más abundantes los C15-C17. Su composición es de un 30% en parafinas (n-alcanos e isoprenoides), 45% de naftenos (cicloalcanos) y un 25% de aromáticos (Viñas, 2005).



3.1.3 Características generales del diesel

El diesel se produce a partir de fracciones destiladas del petróleo crudo, los componentes mayoritarios del diesel son n-alcenos (40%), iso y cicloalcenos (40%) e hidrocarburos aromáticos (20%). El punto de ebullición de los compuestos que forman el diesel oscila entre 250 °C y 400 °C (C13 a C25). En la Tabla 3.4 se indican las principales propiedades del diesel.

El diesel es un producto altamente demandado por su alta eficiencia en la combustión y por su buena carburación en todos los rangos de la flama. Se emplea principalmente en calderas, quemadores, hornos, trascabos y tractores (Carranza, 2010).

Tabla 3.4. Principales propiedades del combustible diesel.

PROPIEDADES	UNIDADES	DIESEL
Densidad a 25 °C	Kg L ⁻¹	0.83-0.845
Viscosidad a 38.8 °C	SUS	30-34
Temperatura de inflamación	°C	68-74
Poder calorífico	Kcal Kg ⁻¹	10 500-10 680
Azufre	% v v ⁻¹	<0.05
Composición aproximada	-----	C ₁₃ -C ₁₈

Datos según Carranza, 2010.

3.1.4 Impacto ambiental y contaminación por el uso de diesel

En el caso del suelo, el diesel impide el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos fisicoquímicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo de la humedad, temperatura, textura del suelo y cantidad vertida pueden ser procesos más o menos lentos, lo que ocasiona una mayor toxicidad.



Diferentes estudios han determinado el efecto de la contaminación con hidrocarburos en la germinación y crecimiento vegetal de diferentes especies de plantas en donde se demostró una disminución en su desarrollo y germinación, provocando además necrosis foliar (López *et al.*, 2005).

En el agua, al llegar a ésta, la mancha generada por los hidrocarburos vertidos flota por diferencia de densidades impidiendo el intercambio gaseoso, dando comienzo a la solubilización de compuestos hidrosolubles y a la afección de diferentes poblaciones: la primera población afectada por un derrame es el plancton, en segundo lugar los macroinvertebrados y la última población afectada son los bentos que viven en el fondo de ríos y ciénagas (Fatima *et al.*, 2003; Benavides *et al.*, 2006).

3.2 Fitorremediación

3.2.1 Tecnologías de remediación de suelos

Las tecnologías de remediación pueden clasificarse de diferentes maneras, con base en los siguientes principios: (a) estrategia de remediación y (b) lugar en que se realiza el proceso de remediación. A continuación se describen con más detalle las clasificaciones anteriores. La estrategia de remediación comprende tres tecnologías básicas que pueden usarse separadas o en conjunto para remediar los sitios contaminados: (i) degradación o modificación de los contaminantes, este tipo de tecnología busca alterar la estructura química del contaminante; (ii) extracción o separación, los contaminantes se extraen y/o separan del medio contaminado aprovechando sus propiedades físicas o químicas y (iii) aislamiento o inmovilización del contaminante, los contaminantes son estabilizados, solidificados o contenidos.

El lugar de realización del proceso de remediación corresponde a dos clasificaciones:



(1) *in situ*, son las aplicaciones en las que el suelo contaminado es tratado sin necesidad de excavar el sitio. Es decir, se realizan en el mismo sitio en donde se encuentra la contaminación e incluye bioventeo, el cual consiste en la ventilación natural o forzada del suelo mediante la inyección a presión de aire en la zona no saturada del suelo a través de pozos de inyección; bioaumentación, es la inoculación de una concentración determinada de microorganismos en el suelo contaminado; bioestimulación, consiste en estimular a los microorganismos del suelo adicionando nutrientes como nitrógeno o fósforo y fitorremediación, es el uso de plantas para remover, contener o transformar un contaminante.

(2) *ex situ*, la realización de este tipo de tecnologías requiere la excavación, dragado o cualquier otro proceso para remover el suelo contaminado antes de su tratamiento, incluyen la biolabranza, el suelo superficial es excavado y colocado sobre una capa impermeable para ser tratado por la adición de nutrientes y agua; biopilas, la técnica consiste en la formación de pilas de material biodegradable, formadas por suelo contaminado y materia orgánica, se necesita una temperatura de trabajo de 40°C y una baja proporción de arcillas; bioreactores, el suelo es colocado en contenedores con microorganismos externos o autóctonos capaces de degradar hidrocarburos bajo condiciones controladas de temperatura, humedad y nutrientes, y desorción térmica, el suelo es calentado para provocar la volatilización de los contaminantes orgánicos los cuales posteriormente son confinados en contenedores (Benavides *et al.*, 2006).

3.2.2 Fitorremediación asistida

El término fitorremediación (*phyto* = planta y *remediación* = corregir) fue acuñado en 1991 (EPA 2000; Juárez, 2007). Se fundamenta en el uso de plantas para remediar la contaminación de compuestos orgánicos e inorgánicos. Es una tecnología emergente que usa varias especies de plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar contaminantes de suelo y agua. Ha sido considerada como una innovación, además los costos y beneficios aventajan a tratamientos



comúnmente empleados. En la Tabla 3.5 se presentan algunas ventajas y desventajas de la fitorremediación según McIntyre (2000).

El éxito de la fitorremediación depende del tipo y edad de la planta, de las características de suelo, concentración de nutrientes así como del tipo y concentración de contaminante.

Tabla 3.5. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.

Ventajas	Desventajas
Bajo costo	Los contaminantes pueden pasar a cadenas tróficas
Incrementa la mineralización de los contaminantes	El contaminante puede ser tóxico para las plantas
Minimiza desequilibrio en los ecosistemas	Proceso lento
Evita la erosión	La introducción de plantas no nativas puede ser dañina para el ecosistema
Puede abarcar grandes extensiones de suelos contaminados	Útil a bajas concentraciones de contaminante
Conserva las propiedades naturales del suelo	
Requiere una fuente de energía meramente solar	

Datos de la tabla según McIntyre (2000).

Algunas plantas que han sido identificadas como fitorremediadoras no pueden sobrevivir en todas las partes del mundo, algunas son incapaces de tolerar las condiciones climáticas y de suelo de algunos países. Es por esto que cada país necesita identificar plantas nativas para usarse en la fitorremediación (Bizecki *et al.*, 2003).

Según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (USEPA, 2000) existen diferentes mecanismos de fitorremediación. A continuación se enlistan y detallan:



- i. **Fitoextracción:** es la extracción de metales pesados de suelos contaminados, como zinc, cobre y níquel por las raíces de las plantas y su traslado al interior de la planta, los cuales son generalmente removidos al cosecharse las plantas, evitando así la excavación del suelo.
- ii. **Rizofiltración:** es la absorción de metales pesados disueltos en agua por medio de la raíz la planta. La absorción del contaminante, su concentración y su traslación en la planta ocurre dependiendo del tipo de contaminante. La rizofiltración resulta en la absorción de los contaminantes los cuales son inmovilizados o acumulados sobre o en el interior de la planta y posteriormente son removidos por remoción física de la planta.
- iii. **Fitoestabilización:** es la inmovilización de un contaminante en el suelo a través de la absorción y acumulación o precipitación en la zona de las raíces de las plantas, además previene la dispersión de contaminantes por el viento, evita la erosión por agua, la lixiviación hacia los mantos freáticos y dispersión en el suelo.
- iv. **Rizodegradación:** es la transformación de algunos compuestos orgánicos del suelo a través de la estimulación de la actividad microbiana en la raíz, es decir, la estimulación de la degradación por microorganismos de la rizosfera.
- v. **Fitodegradación:** es la transformación del contaminante por acción de las plantas, a través de procesos metabólicos enzimáticos en su interior. El principal mecanismo es la absorción por la planta y su metabolismo.
- vi. **Fitovolatilización:** es la absorción de un contaminante por las raíces de la planta y su liberación a la atmósfera a través de la transpiración en sus hojas.

Actualmente el uso de la fitorremediación en combinación con Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal se denomina fitorremediación asistida (López *et al.*, 2005), la cual es una tecnología de remoción biológica que tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales pesados, compuestos orgánicos e



inorgánicos por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (Harvey *et al.*, 2002).

Una planta fitorremediadora absorbe, excreta y se desintoxica de los contaminantes. Un factor importante que incide en la penetración del hidrocarburo en la planta son su peso molecular y su hidrofobicidad. La absorción de contaminantes se realiza a través de la rizodermis y la cutícula de la epidermis, las cuales absorben los compuestos por ósmosis dependiendo de factores como la temperatura y el pH del suelo. Después de cruzar la membrana, los contaminantes son distribuidos a través de toda la planta; los más volátiles se excretan vía hojas (fitovolatilización), mientras que la desintoxicación se lleva a cabo por la vía de la mineralización hasta dióxido de carbono (CO₂) (López *et al.*, 2005).

La comunidad de la rizosfera está constituida por microbiota (bacterias, hongos y algas) y por la micro y mesofauna (protozoos e insectos). La rizosfera provee un microambiente complejo y dinámico, donde las bacterias en asociación con las raíces, forman comunidades únicas que responden a los exudados radicales. Estas asociaciones pueden causar beneficio a la planta y considerable potencial para la desintoxicación. Entre las interacciones benéficas destacan las que sostienen las plantas con bacterias que sintetizan factores de crecimiento vegetal, como las hormonas, y las simbiosis con fijadoras de nitrógeno (López, *et al.*, 2005).

3.3 El suelo

3.3.1 Componentes y estructura del suelo

El suelo se forma a partir de las rocas mediante un proceso complejo en el que intervienen fuerzas químicas, físicas y biológicas, que primero reducen la roca madre a regolito (fragmentos de roca) y después a suelo. Se trata de un sistema formado por componentes minerales (meteorización de las rocas), componentes orgánicos, gas (aire en el espacio existente en los poros) y agua envolviendo partículas.



Los cinco principales factores que participan en la formación de suelo son: el material original, el clima, la topografía, la actividad biológica y el tiempo. El suelo contiene comunidades microbianas de gran diversidad y que soportan el crecimiento de las plantas. Los microorganismos contribuyen en gran manera a la fertilidad del suelo, es decir, a su capacidad para sostener el crecimiento vegetal (Metting, 1993; López *et al.*, 2005).

A su vez, las plantas ejercen una notable influencia sobre las comunidades microbianas de los suelos. La cubierta vegetal del suelo es un factor importante para la determinación del tipo y la cantidad de microorganismos presentes. Los exudados de las raíces son una fuente esencial de nutrientes para los microorganismos del suelo.

Cuando los suelos se forman a partir de regolito, se desarrolla típicamente una serie de capas u horizontes que son el resultado de diversos procesos de meteorización (Atlas y Bartha, 2002). Los grupos **O**, u horizontes orgánicos, se desarrollan sobre el suelo mineral y contienen la materia orgánica conocida como humus; estos horizontes se forman a partir de los residuos de animales y vegetales depositados en la superficie. El horizonte **O** se divide en el horizonte **O₁**, donde las formas animales y vegetales originales todavía son reconocibles, y un horizonte **O₂**, donde la degradación de los restos impide ya su identificación.

El horizonte **A**, o eluvial es la capa mineral que se extiende cerca de la superficie del suelo. Se caracteriza por ser la zona de lixiviación máxima; se divide en una capa **A₁**, donde el suelo mineral se mezcla con el humus, una capa **A₂**, con una lixiviación máxima de arcillas de silicato, óxidos de hierro y aluminio, y una capa **A₃**, que es una transición hacia el horizonte **B** que se extiende por debajo.

El horizonte **B**, o iluvial, es donde tiene lugar la deposición y la máxima acumulación de materiales, como óxidos de hierro, óxidos de aluminio y arcillas de silicato. La combinación de los horizontes **A** y **B** se conoce como *solum*. La actividad biológica



no afecta demasiado al horizonte **C**, situado por debajo del *solum*, que contiene las acumulaciones de calcio y carbonato magnésico. Por debajo del horizonte **C** se encuentran el regolito y el lecho de roca (Figura 3.3).

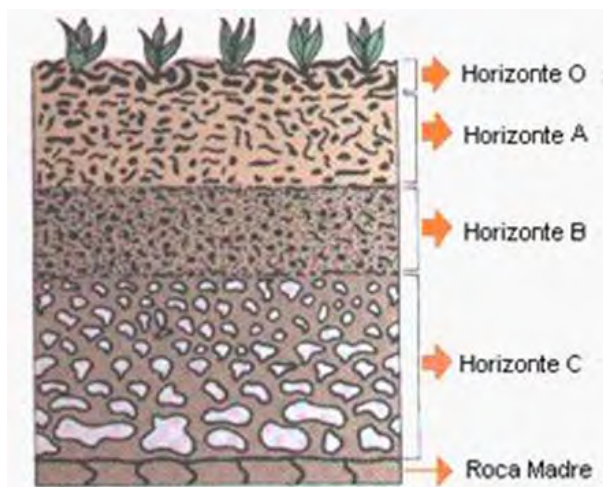


Figura 3.3. Esquema de los horizontes de un suelo. Fuente: Brack y Mendiola, 2000.

Independientemente de los horizontes, los suelos contienen proporciones variables de arcillas, limo y partículas de arena (Tabla 3.6). La proporción de estas partículas constituye la textura del suelo, la cual es una propiedad importante para los microorganismos, ya que determina el área de la superficie disponible para su crecimiento.

Las propiedades químicas del suelo son un factor esencial para los microorganismos. La materia orgánica del suelo procede de los restos de plantas, animales y microorganismos (Atlas y Bartha, 2002).

Tabla 3.6. Comparación del tamaño y número de partículas de arena, limo y arcilla.

Componente del suelo	Diámetro (mm)	Número de partículas g ⁻¹
Arena	2.00-0.05	90
Limo	0.05-0.002	5.78x10 ⁶
Arcilla	< 0.002	9.03x10 ¹⁰

Datos según Atlas y Bartha, 2002.



Las sustancias húmicas son la porción de la materia orgánica del suelo que ha estado sometida a una transformación suficiente como para que el material resultante sea irreconocible. Los compuestos húmicos son polímeros de composición no específica que suponen un núcleo constituido por anillos aromáticos individuales, que son heterocíclicos y están condensados y otros anillos quinoidales unidos transversalmente por enlaces tipo carbono-carbono, éter o amino. Los anillos aportan una gran variedad de grupos funcionales, entre los cuales destacan los grupos carbonilo, carboxilo e hidroxil fenólico. Adheridos a este núcleo se encuentran aminoácidos, péptidos, azúcares y fenoles. El resultado es una estructura esponjosa tridimensional que absorbe fácilmente el agua, los iones y las moléculas orgánicas de manera intercambiable.

Tabla 3.7. Cantidad de nutrimentos en la superficie de suelos mineralizados en zonas templadas.

Nutriente	Porcentaje por peso seco del suelo
Materia orgánica	0.40-10.0
Nitrógeno	0.02-0.5
Fósforo	0.01-0.2
Potasio	0.17-3.3
Calcio	0.07-3.6
Magnesio	0.12-1.5
Azufre	0.01-0.2

Fuente: Atlas y Bartha, 2002

En el suelo se encuentran, en concentraciones y formas químicas muy variables, carbono orgánico e inorgánico, así como fósforo inorgánico disponible (Tabla 3.7.). El contenido de oxígeno en la atmósfera del suelo determina en gran parte los tipos de metabolismo que pueden tener lugar y las transformaciones químicas que pueden llevar a cabo los microorganismos autóctonos.



3.3.2 La rizosfera

Las interacciones entre los microorganismos del suelo y las raíces de las plantas satisfacen requerimientos nutritivos para la planta y para las comunidades microbianas asociadas a ellas (Bashan, 2005). La rizosfera es definida como el volumen de suelo que esta adyacente e influenciado por la raíz de la planta. El término viene de la palabra griega *rhizo* o *rhiza* que se refiere al área de influencia y localización física alrededor de la raíz *sphere*. (Metting, 1993; Juárez, 2007).

El tamaño de la rizosfera depende de la estructura particular del sistema de raíces, la mayoría de los microorganismos asociados a las raíces se encuentran en los alrededores de la rizosfera.

Las interacciones entre las raíces y los microorganismos de la rizosfera se basan principalmente en la modificación interactiva del ambiente del suelo por procesos como: captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción microbiana de factores de crecimiento vegetal y captura de nutrimentos minerales por parte de los microorganismos. En la rizosfera, las raíces de las plantas tienen una influencia directa en la composición y en la densidad de la microbiota del suelo; es lo que se conoce como efecto rizosférico. El efecto rizosférico es una estimulación del crecimiento microbiano alrededor de la raíz por la liberación de compuestos orgánicos.

Una amplia variedad de compuestos orgánicos de origen vegetal han sido encontrados en la rizosfera. La materia orgánica emitida por las raíces de las plantas puede ser clasificada de la siguiente manera (Juárez, 2007):

- I. **Exudados:** compuestos de bajo peso molecular como azúcares y aminoácidos, así como vitaminas y fosfolípidos.
- II. **Mucilago de plantas:** son heterosacáridos de alto peso molecular, muy ramificados, de consistencia gelatinosa, originados en varias partes de la raíz.



La influencia de los materiales liberados por las plantas al suelo se pone de manifiesto porque las poblaciones bacterianas de la rizosfera presentan propiedades nutritivas muy distintas a las poblaciones que crecen en el suelo sin raíces.

Azospirillum es considerado como un género perteneciente al grupo de las Bacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (BPCV), es una bacteria del suelo fijadora de nitrógeno asociada a la rizosfera de algunas plantas, esta bacteria utiliza los exudados de las raíces como fuente de energía para fijar gran cantidad de nitrógeno. Las poblaciones microbianas de la rizosfera benefician a las plantas, ya que: aumentan el reciclado y la solubilización de los nutrientes minerales; sintetizan vitaminas, aminoácidos, auxinas, citoquininas y giberelinas, que estimulan el crecimiento; y muestran antagonismo hacia patógenos potenciales de la planta mediante la competencia y el desarrollo de relaciones amensales basadas en la producción de antibióticos (Zhuang, *et al.*, 2007; Kaimi *et al.*, 2006).

En la última década se han encontrado evidencias científicas relacionadas con las raíces de las plantas asociadas a comunidades microbianas, las cuales ofrecen un potencial importante para la estrategia de remediación biológica de suelos contaminados por sustancias orgánicas (Glick, 2001; López *et al.*, 2005; Glick, 2010).

3.3.3 Destino ambiental de los contaminantes orgánicos en un suelo

Como resultado de actividades antrópicas cada año se liberan grandes cantidades de compuestos químicos orgánicos e inorgánicos en el ambiente. La contaminación de suelos, es una consecuencia bastante común de la actividad industrial (Ulrici, 2000).

La existencia de tres fases en el suelo (sólida, líquida y gaseosa), así como la gran diversidad de materiales que pueden constituirlo, lo convierten en un compartimento ambiental muy complejo. La distribución de los contaminantes orgánicos se encuentra condicionada por estas características, pudiéndose encontrar adsorbidos



sobre la materia orgánica (principalmente aquellos compuestos de elevada hidrofobicidad como los HAP), en disolución o en fase de vapor. Al igual que en los medios acuáticos, los contaminantes orgánicos que se encuentran en la superficie pueden sufrir evaporación o fotooxidación. De este modo en el suelo, los contaminantes orgánicos susceptibles pueden ser transformados fisicoquímicamente o sufrir biodegradación (Viñas, 2005).

3.4 *Azospirillum lipoferum*

3.4.1 Características generales

Azospirillum sp. es una bacteria con morfología de vibrio que vive en forma libre en el suelo o bien, en la rizosfera o en el espacio intracelular de las raíces (endofíticas) de una gran variedad de plantas (Bashan *et al.*, 1997; Atlas y Bartha, 2002). Las características útiles para la identificación son la forma vibrioide, el pleomorfismo y su movilidad en espiral.

Son bacterias gram negativas, contienen cantidades elevadas de poli-2- β -hidroxibutirato (PHB) que se observa como gránulos refringentes, son heterotróficas, fijadoras de nitrógeno, pertenecientes a la subclase α de las proteobacterias. Se han descrito 10 especies: *A. brasilense*, *A. lipoferum*, *A. amazonense*, *A. halopraeferans*, *A. irakense*, *A. largimobil*, *A. dobereineriae*, *A. orizae* (Xie y Yakota, 2005), *A. melinis* (Peng *et al.*, 2006) y *A. canadense* (Aguilar *et al.*, 2008). En medio líquido produce un solo flagelo, mientras que en medio sólido, se inducen varios, siendo diferente la cantidad y posición de éstos para cada una de las especies del género. La presencia de flagelos proporciona la movilidad necesaria para dirigirse a lugares donde la presencia de nutrimentos sea más favorable.

En regiones templadas y tropicales del mundo es considerada una bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV), por el beneficio obtenido posterior a la inoculación de la bacteria, en una amplia variedad de plantas: maíz, arroz, caña de azúcar, sorgo y otras plantas de interés agronómico (Dobbelaere *et al.*, 2001).



3.4.2 Distribución

Esta bacteria muestra una amplia distribución geográfica alrededor del mundo. Aún cuando son más abundantes en las regiones tropicales, también se les encuentra en las regiones templadas, frías y desérticas.

El pH del suelo juega un papel importante en la presencia de las especies del género *Azospirillum*, las especies de *A. brasilense* y *A. lipoferum* se encuentran en mayor abundancia en suelos con valores cercanos a la neutralidad, con un pH igual a 5 se les encuentra en forma esporádica mientras que en suelos con un pH menor a 4.5 no se logra su aislamiento.

Los estudios iniciales estuvieron enfocados a su aislamiento a partir de raíces de gramíneas (maíz, trigo, arroz, sorgos, pastos forrajeros), tiempo después se descubrió que esta bacteria es habitante natural de las raíces de plantas no gramíneas tales como cactáceas, henequén, soya, alfalfa y frijol (Bashan y Holguín, 1997; Camarillo, 2006).

3.4.3 Asociación *Azospirillum* sp. - planta

La adaptación de *Azospirillum* sp. al ambiente rizosférico probablemente se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. Posteriormente, la exudación de compuestos será a través de las raíces durante el desarrollo de la planta. Aún cuando las especies de *Azospirillum* difieren en su capacidad para utilizar diferentes compuestos como fuentes de carbono y nitrógeno, estas bacterias usan para su crecimiento mono y disacáridos así como alcoholes polihidroxilados, y principalmente diversos ácidos orgánicos tales como málico, succínico y algunos aminoácidos.

La riqueza en compuestos orgánicos en la rizosfera conduce a intensas actividades e interacciones microbianas. Algunos estudios indican que la quimiotaxis a los exudados de raíz es uno de los factores que influyen en la llegada de los



microorganismos a la rizosfera. Tanto en *A. lipoferum* como en *A. brasilense* se demostró una fuerte actividad quimiotáctica hacia diversos azúcares, ácidos orgánicos y aminoácidos, así como hacia compuestos aromáticos y exudados radicales (Caballero, 2006).

Zonas de baja concentración en oxígeno son las preferidas por *Azospirillum* para su crecimiento y multiplicación. La aerotaxia parece ser especialmente importante bajo condiciones de fijación de nitrógeno, permitiéndole a estas células alcanzar concentraciones de oxígeno lo suficientemente bajas para que se exprese la actividad de la nitrogenasa. Se sugiere que tanto la respuesta quimio y aerotáctica son características que contribuyen en el proceso de colonización de las raíces de las plantas, ya que el consumo de oxígeno durante el crecimiento activo de las raíces enriquece el ambiente con sustratos orgánicos.

La asociación con las raíces solo puede tener éxito si las bacterias son capaces de mantener una población significativa en el entorno rizosférico. La unión de *A. lipoferum* a la planta hospedera es esencial para una asociación eficiente. Mediante ensayos *in vitro* se ha demostrado que la asociación a la raíz consiste en un proceso de dos etapas completamente independientes. En la primera etapa, grupos de células se adsorben a la raíz en forma rápida y reversible, se ha comprobado que el flagelo polar tiene un papel importante ya que la eliminación de este por acción de calor o por tratamiento ácido, provoca una adsorción deficiente en raíces de trigo (Caballero, 2006), esta etapa es dependiente de proteínas de la superficie bacteriana del tipo de las adhesinas. La fase de adsorción es seguida por una fase de anclaje en la que los agregados bacterianos se fijan firmemente y de forma irreversible a la raíz, al parecer esta etapa es dependiente de un polisacárido extracelular de *Azospirillum* (Skvortsov, 1998; Camarillo, 2006).



3.4.4 Promoción del crecimiento vegetal mediado por *Azospirillum sp.*

Los primeros mecanismos propuestos para la promoción bacteriana del crecimiento vegetal han sido relacionados con el metabolismo del nitrógeno, a través de la fijación biológica en condiciones de vida libre o por el incremento de la actividad nitrato reductasa en condiciones endofíticas, pero han tenido una menor significancia agronómica respecto de lo que se esperaba inicialmente. También se ha considerado la promoción del crecimiento de la planta mediante la absorción de minerales pero no existe evidencia de actividad enzimática relacionada con la toma de éstos (Atlas y Bartha, 2002).

En contrapartida, uno de los principales mecanismos propuestos en la actualidad para explicar la promoción del crecimiento vegetal, está relacionado con la capacidad de este microorganismo para producir o metabolizar compuestos del tipo fitohormonas, tales como ácido indol-3-acético, citocininas, giberelinas y etileno (Strzelczyk *et al.*, 1994; Caballero, 2006), así como de otras moléculas reguladoras del crecimiento vegetal, tales como el ácido abscísico (ABA) (Perrig *et al.*, 2007).

3.5 Ácido indol-3-acético

3.5.1 Auxinas

El término auxina (del griego *auxein*, incrementar) designa cualquier hormona perteneciente al grupo auxínico, pero a menudo se usa como sinónimo el ácido indol-3-acético que es la principal auxina natural (Camarillo, 2006). Para tener acción auxínica, una molécula deberá tener un radical ácido o ser fácilmente convertible en él, un anillo aromático y de 1 a 4 carbonos entre el carboxilo y el anillo.

Las fitohormonas son moléculas orgánicas sencillas que regulan la expresión de genes determinados; son sintetizadas en diferentes partes de la planta y pueden ser transportadas a otros sitios; actúan como mensajeros químicos; controlan el crecimiento y desarrollo de la planta; responden a cambios ambientales y regulan la expresión genética de la planta. Son capaces de desencadenar una respuesta



bioquímica, fisiológica y morfológica. Además de la producción endógena de fitohormonas por la planta, está la exógena asociada a microorganismos del suelo. Estos compuestos han sido vinculados a procesos de diferenciación de tejidos vasculares, dominancia apical, iniciación de las raíces laterales y adventicias, estimulación de la división celular y elongación de tallos y raíces (Ross *et al.*, 2000; Leyser, 2006).

La producción y metabolismo bacteriano de auxinas ha captado la atención de los investigadores desde dos puntos de vista: a nivel metabólico, por la capacidad del microorganismo para producir estos compuestos y regular su producción en diferentes condiciones ambientales (Costacurta y Vanderleyden, 1995; Caballero, 2006) y a nivel morfofisiológico por el efecto que ocasiona su producción en asociación con distintas especies vegetales (Cassan *et al.*, 2002).

Varias auxinas de ocurrencia natural han sido descritas en la literatura como producto del metabolismo bacteriano. En cultivos puros de *Azospirillum sp.*, además de la auxina principal, el ácido indol-3-acético (AIA), se han identificado otros compuestos indólicos de interés, tales como el ácido indol-butírico (IBA), indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído, indol etanol e indol metanol, triptamina, antranilato y otros compuestos indólicos no caracterizados aún (Cassan *et al.*, 2002; Camarillo, 2006).

3.5.2 Importancia fisiológica de las auxinas producidas por *Azospirillum*

La fuente primaria de auxinas exógenas en plantas superiores, proviene de la flora microbiana rizosférica, donde casi 80% de los grupos de bacterias establecidos son capaces de producir *in vitro* compuestos del tipo ácido indol-3-acético (IAA) (Cheryl y Glick 1996; Camarillo, 2006). La respuesta de la planta al AIA exógeno puede variar de benéfica a dañina, dependiendo de la concentración incorporada en los tejidos de la planta, en este sentido, Aguilar *et al.*, (2008) consideran que el aumento del contenido endógeno de la hormona por la actividad microbiana de la



rizosfera, podría complementar transitoriamente los niveles sub-óptimos del hospedador y modificar parcialmente el metabolismo celular con la consecuente promoción del crecimiento. Este es el caso de bacterias del género *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Rhizobium* y *Bradyrhizobium*, para las que ha sido descrita la producción de auxinas como parte de la capacidad promotora del crecimiento, fundamentalmente en el desarrollo del sistema radical y en la formación de nódulos. Un aumento excesivo del contenido de auxinas, pondrá en marcha un mecanismo homeostático para reducir la concentración endógena de la hormona, éste mecanismo involucra un rápido catabolismo de auxinas mediado por AIA oxidasas.

La presencia de exudados vegetales, es suficiente para que *Azospirillum* incremente la expresión del gen *ipdC*, el cual codifica la enzima fenil piruvato descarboxilasa, con el consecuente aumento de la síntesis de AIA, siempre que las cantidades de precursores (como el triptófano) sean suficientes (Vande Broek *et al.*, 1999; Aguilar *et al.*, 2008). El resultado, se traducirá en un incremento del contenido endógeno de la hormona bacteriana que dará inicio a la respuesta celular por la interacción de ésta, con sus receptores en la membrana celular, mismos que desencadenarán una cascada de señales que tendrá como sitio primario de actividad la pared celular y el núcleo (Camarillo, 2006). El ácido indol-3-acético ingresa a las células vegetales tanto en forma no disociada por difusión simple, así como en su forma aniónica por transporte activo, se tienen reportadas tres clases de proteínas transmembranales: PIN's (por sus siglas en inglés a plant specific transporter family); MDR's (por sus siglas en inglés multi-drug resistant-like transporters), y KUP's (por sus siglas en inglés potassium transporter like). Estos compuestos producidos en forma continua proveen de una dosis hormonal constante que resulta suplementaria y beneficiosa para el crecimiento vegetal (Leyser, 2006).



3.5.3 Vías de síntesis de AIA en *Azospirillum*

La producción de AIA depende de la especie, las cepas, las condiciones de cultivo, concentración de triptófano (Trp), pH, oxigenación y la fase de crecimiento. La síntesis de AIA es estimulada por factores de estrés como: la limitación de fuente de carbono y condiciones de microaerofilia (Ona *et al.*, 2005). Debido a que la producción se incrementa considerablemente cuando al medio de cultivo se adiciona el Trp, éste es considerado como el precursor de la síntesis de AIA en *Azospirillum*.

Se han propuesto en *Azospirillum* tres vías de síntesis dependientes de triptófano (Trp) anotadas de acuerdo al intermediario de la vía (Figura 3.3). La ruta del ácido indol-3-pirúvico (IPyA), considerada la más importante, la vía de la triptamina (TAM), la ruta del indol-3-acetonitrilo (IAN) o indol-3-acetamida (IAM) y una vía independiente del Trp, que emplearía un precursor indólico del Trp; sin embargo, ninguna de ellas está completamente dilucidada. Estudios bioquímicos mostraron actividad enzimática de aromático aminotransferasas (AATs) en *A. brasilense* y *A. lipoferum*, las cuales podrían estar involucradas en la síntesis del IPyA.

La mayor parte de las bacterias promotoras del crecimiento, tales como *Azospirillum sp.* o *Bacillus sp.* sintetizan AIA de manera inducible a través de la vía del ácido indol-3-pirúvico.

La magnitud de expresión de cada vía depende fundamentalmente de las condiciones de crecimiento bacteriano y en general se considera que la síntesis mayoritaria depende de la disponibilidad del Trp. En este sentido, la evidencia establece que si el aminoácido se encuentra disponible, la vía predominante es la del ácido indol-3-pirúvico (IPyA) y de manera secundaria la vía de la indol-3-acetamida (IAM).

La vía del ácido indol-3-pirúvico parece tener gran homología a la descrita en plantas superiores (Cassan *et al.*, 2002) y su secuencia comienza con la conversión del Trp a ácido indol-3-pirúvico por una amino transferasa de aminoácidos aromáticos,



seguida por descarboxilación del producto a indol-3-acetaldehído (Iald) a cargo de una indol piruvato decarboxilasa y posterior oxidación a AIA por una aldehído oxidasa (Costacurta *et al.*, 1994; Cassan *et al.*, 2002).

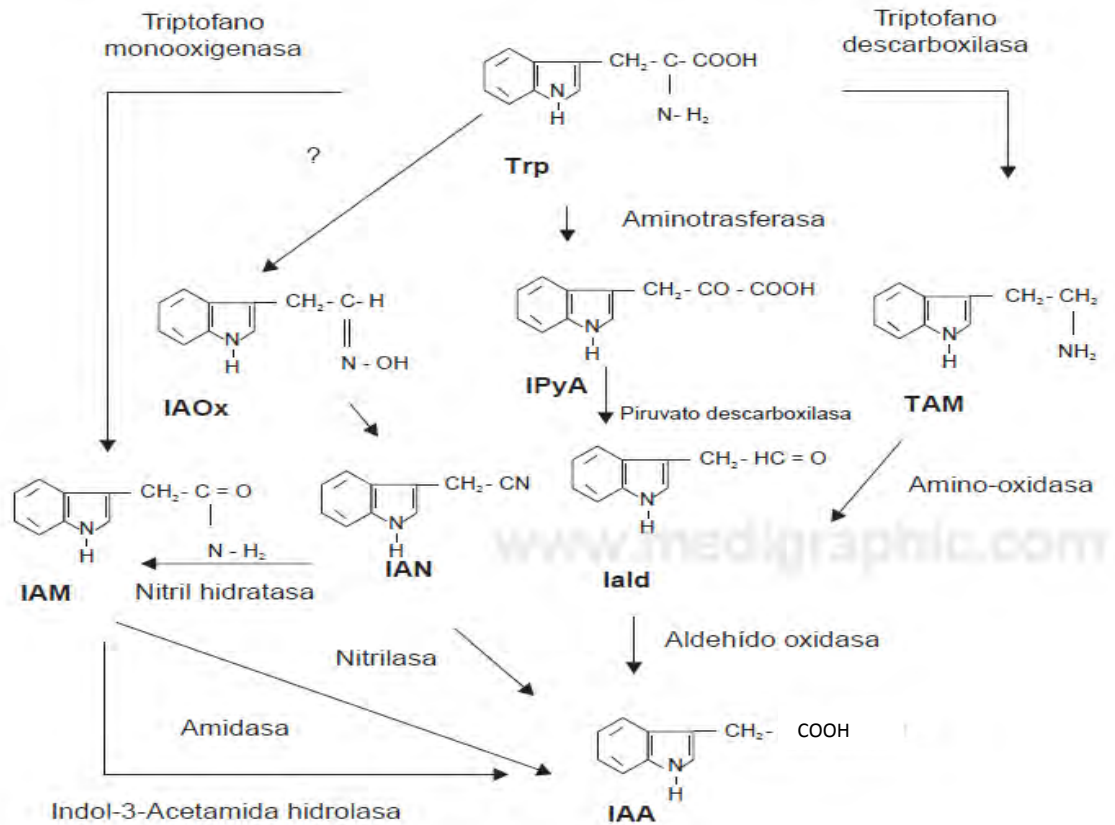


Figura 3.4. Vías de producción de AIA dependientes de triptófano (Aguilar *et al.*, 2008).

Por otra parte, la vía de la indol-3-acetamida (IAM) ha sido una de las más estudiadas en bacterias fundamentalmente fitopatogénicas e involucra la acción consecutiva de dos grupos de enzimas: Trp-monooxigenasas, responsables de la oxidación del Trp a indol 3-acetamida (IAM) e IAM-hidrolasas, responsables de la subsecuente hidrólisis del precursor a AIA. La existencia de esta vía en *A. brasilense* fue sugerida en los trabajos de Prinsen *et al.*, (1993).

Una tercera vía de menor importancia ha sido descrita para este género, la vía de la triptamina (TAM), en la que los eventos bioquímicos involucran la conversión inicial



del Trp a triptamina, catalizada por enzimas tipo Trp descarboxilasas dependientes de piroxidal fosfato, seguida de la conversión a indolacetaldehído (Iald) por amino-oxidasas. Aunque esta vía está presente en plantas y hongos se ha puesto muy poca atención en bacterias y solo fue sugerida para dos especies en particular *Bacillus cereus* y *Azospirillum brasilense* (Cassan *et al.*, 2002).

Finalmente, se ha descrito una vía independiente del Trp que emplearía un precursor indólico del triptófano; sin embargo, esta vía ha sido desestimada recientemente para éste microorganismo y solo se consideran aquellas dependientes del Trp (Aguilar *et al.*, 2008).



CAPÍTULO 4

***“...Nadie mira a la rosa que nació en el desierto;
más ella, ufana, erguida, muestra el cáliz abierto,
cual si mandara un ósculo perenne a la extensión.***

***Nadie sembró la espiga al borde del camino,
ni nadie la recoge; mas ella, con divino
silencio, dará granos al hambriento gorrión...”***

Reyes Alfonso, 2001. “Antología de Amado Nervo poesía y prosa”



4. Diseño experimental y metodología

A efecto de alcanzar los objetivos propuestos, a continuación se describen los materiales usados y las condiciones en que se mantuvieron las unidades experimentales, así como las variables de respuesta medidas. Se hace referencia también a las técnicas analíticas empleadas.

4.1 Experimentación relacionada con suelo

4.1.1 Obtención y caracterización fisicoquímica del suelo natural

Las muestras de suelo natural fueron colectadas en Tierra Blanca, Veracruz; el muestreo fue realizado por investigadores del Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química.

Debido a que el suelo natural contenía restos de plaguicidas se procedió a la conformación de suelo artificial.

La caracterización fisicoquímica incluyó las siguientes variables, determinación de carbono, fósforo, humedad, materia orgánica, nitrógeno total, pH y textura; éstas determinaciones se apegaron a los procedimientos descritos en la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.

4.1.2 Preparación del suelo artificial y caracterización fisicoquímica

La preparación del suelo artificial se incluye en Hernández (2010). Las características del suelo artificial se igualaron a los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica del suelo natural de manera que ambos no tuvieran diferencias considerables, lo que se corroboró al realizar la caracterización fisicoquímica posterior a su conformación de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000.



4.1.3 Hidrocarburo contaminante

4.1.3.1 Obtención de la muestra de diesel

El diesel empleado se obtuvo comercialmente en un lote único.

4.1.3.2 Contaminación de suelo artificial

Experimentos preliminares mostraron que a concentraciones de diesel mayores de 20 000 mg Kg⁻¹ el crecimiento de rye grass anual (*Lolium multiflorum*) se inhibía (Carranza, 2010), así que la concentración experimental se estableció en 18,000 mg Kg⁻¹.

Para permitir la pérdida de diesel por volatilización durante el proceso de contaminación del suelo, la concentración de diesel excedió 2 000 mg Kg⁻¹ a la concentración inicial establecida. Antes de la adición del diesel al suelo, éste se dejó secar a temperatura ambiente, se molió en un mortero, se tamizó con un tamiz número 10 y se mezcló regularmente para mejorar la evaporación de agua hasta que el contenido fue menor de 1% (p p⁻¹).

Con objeto de obtener una mezcla homogénea del suelo durante el proceso de contaminación, el diesel fue gradualmente asperjado y mezclado para evitar la formación de agregados.

Posteriormente, se dejó estabilizar por dos semanas, mezclando en intervalos de cuatro días para inducir la pérdida de diesel mediante volatilización. Seguido de la estabilización, la concentración de diesel fue ajustada a 18 000 mg Kg⁻¹ mediante la adición de suelo no contaminado, para tal efecto se empleó el método gravimétrico descrito por Villalobos *et al.*, (2008).



4.2 Determinaciones analíticas en suelo durante la etapa de saneamiento

4.2.1 Determinación de fósforo soluble en bicarbonato de sodio usando ácido ascórbico como agente reductor

La determinación analítica de fósforo soluble en bicarbonato de sodio consistió en el seguimiento del método de Olsen para fósforo disponible (Shimada, 2000). Este método se basó en la determinación de fósforo en disolución, el fósforo (en forma de fosfato) se hace reaccionar con molibdato de amonio en medio ácido, formando ácido fosfomolibdico. El ácido ascórbico reduce el ácido fosfomolibdico para dar un complejo de color azul. La sal de antimonio actúa como catalizador, acelerando la formación de un complejo coloreado. La cuantificación se llevó a cabo por colorimetría empleando un espectrofotómetro Ultrospec 3000.

Las determinaciones se llevaron a cabo en cada uno de los bloques a los días 0,10, 20, 30, 40 y 60, cada muestra fue tratada por triplicado.

Las muestras de suelo se dejaron secar al aire a temperatura ambiente y fueron tamizadas (<2 mm). Se realizó la extracción con 2.5 gramos de suelo y 50 mililitros de solución extractora (bicarbonato de sodio 0.5 M pH 8.5) en un matraz Erlenmeyer de 250 mililitros, se agitaron durante 30 minutos e inmediatamente se filtraron a través de papel Whatman No 40.

Para el desarrollo de color se colocaron alícuotas de tres mililitros de los extractos de las muestras en tubos de ensaye, lentamente se agregaron tres mililitros de la mezcla reactiva (200 mL de agua destilada, 50 mL de ácido sulfúrico 4M, 15 mL de molibdato de amonio 4%, 30 mL de ácido ascórbico 1.75% y 5 mL de tartrato de potasio y antimonio 0.275%) y se agitaron. Se dejaron reposar durante una hora para el desarrollo de una coloración azul y se midió la absorbancia en espectrofotómetro a 720 nanómetros. Paralelamente se trabajaron blancos de reactivos.



A partir de una solución estándar de fósforo de 4 mg L^{-1} se preparó una serie de estándares de concentraciones 0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6 y 2.0 mg P L^{-1} . Con los que se construyó una curva de calibración para determinar las concentraciones de fósforo en las muestras.

Finalmente, la cantidad de fósforo se calculó empleando la siguiente fórmula:

$$P (\text{mg Kg}^{-1}) = (a-b) \times (\text{volumen del extractante/peso de la muestra}) \times d \times \text{fch}$$

Donde:

a = mg P L^{-1} obtenidos en la muestra,

b = mg P L^{-1} obtenidos en el blanco,

d = factor de dilución (en caso de que se haya diluido el extracto),

fch = factor de corrección de humedad.

El factor de corrección de humedad se calculó por la diferencia de peso entre una misma muestra húmeda, y después de haberse secado en la estufa a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ 12 horas.



Figura 4.1. Determinación de fósforo en el suelo experimental. A) Filtración de suelo, B) Obtención del filtrado, C) Formación del complejo coloreado.



4.2.2 Cuantificación de nitrógeno total (Kjeldahl)

La determinación de nitrógeno total se realizó con el método Kjeldahl. Este método comprende tres fases fundamentales:

1) Digestión de la muestra. La muestra de suelo se somete a una digestión por calentamiento con ácido sulfúrico y con una mezcla de sales que aceleran y facilitan tanto la oxidación de la materia orgánica como la conversión de todas las formas de nitrógeno en N^{+3} , que en medio ácido se encuentran en forma de radical amonio (NH_4^+); es decir, se llevan las formas orgánicas a formas minerales de nitrógeno.

2) Destilación. Una vez transformado el nitrógeno en NH_4^+ , se expone a una base fuerte como el hidróxido de sodio para formar hidróxido de amonio, que por la acción del calor se descompone en amoníaco (NH_3) y agua.

3) Valoración. El amoníaco desprendido en el paso anterior se recoge en un volumen conocido de solución valorada de ácido bórico y por comparación con un blanco se determina la cantidad de ácido que reaccionó con el NH_3 .

Las determinaciones se realizaron en cada uno de los bloques a los días 0, 10, 20, 30, 40 y 60. El procedimiento se realizó en un equipo BÜCHI constituido por las unidades K-437, B-414 y K-350.

La concentración de nitrógeno se calculó, sustituyendo en la siguiente fórmula (NOM-021-SEMARNAT-2000):

$$\% N = \frac{(T - B) \times N \times 0.014 \times 100}{S}$$

Donde:

T = mililitros de ácido clorhídrico valorado gastados en la muestra,

B = mililitros de ácido clorhídrico valorado gastados en el blanco,

N = normalidad exacta del ácido clorhídrico,

S = peso de la muestra de suelo,

0.014 = mili equivalentes de nitrógeno,

100 = Factor de porcentaje





Figura 4.2. Cuantificación de nitrógeno. A) Digestión de la muestra, B) Destilación, C) Muestras valoradas.

4.2.3 Evaluación de hidrocarburos fracción media

Los hidrocarburos fracción media contenidos en el suelo experimental fueron cuantificados de acuerdo al método gravimétrico publicado por Villalobos *et al.*, (2008). El suelo fue molido y secado a 105 °C por 12 horas. En matraces redondos previamente secos (105°C) y a peso constante se colocaron diez gramos de sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4), diez gramos de suelo y 35 mililitros de n-hexano. Para llevar a cabo la extracción, se colocaron los matraces en un baño ultrasónico de 260 W marca BRANSON 3510 durante 60 minutos. Los extractos se filtraron a través de columnas empacadas con fibra de vidrio previamente lavada con acetona y hexano. Los extractos se lavaron con 25 mililitros de hexano para completar 60 mililitros de volumen final. El hexano se evaporó y recuperó en un rotaevaporador marca BÜCHI R-124 empleando un baño de agua a 40 °C y 70 rpm, posteriormente los matraces se colocaron en un desecador con vacío durante 30 minutos. Los matraces se pesaron en una balanza analítica y por diferencia de peso se calculó la fracción media de hidrocarburos.



4.3 Experimentación asociada con *Azospirillum lipoferum*

4.3.1 Cepas de *Azospirillum lipoferum* (AZm1, AZm3 y AZm5)

Al inicio del proyecto se contó con tres cepas de la especie *A. lipoferum* (AZm1, AZm3 y AZm5) obtenidas de la colección de cepas del Laboratorio de Microbiología Experimental (LME), aisladas por Esquivel (2002), con las cuales se realizó una selección a efecto de determinar el tipo de cepa más adecuada para el proyecto.

4.3.2 Verificación de pureza de las cepas

La verificación se realizó mediante preparaciones en fresco sin colorante y con cristal violeta para aumentar el contraste de las células. Asimismo se realizaron preparaciones fijas teñidas con la técnica de Gram para corroborar las características típicas de las cepas. Dichas preparaciones se examinaron con objetivos de 10x, 40x y 100x en un microscopio óptico de campo claro.

4.3.3 Tolerancia al diesel de AZm1, AZm3 y AZm5

Para comprobar si las cepas con las que se trabajó eran capaces de tolerar y desarrollarse en presencia de diesel, se prepararon cajas Petri con medio Nfb sólido y agar nutritivo. A continuación se sembró cada una de las cepas mediante extensión superficial con una varilla de vidrio en forma de “L” estéril.

Una vez absorbido el inóculo en el agar, en cada caja Petri se colocó 1 mililitro de diesel estéril y se incubaron 24 horas a 35°C. Pasado el tiempo de incubación se identificó el crecimiento bacteriano y las características típicas de la cepa en el agar nutritivo, así como en el medio Nfb. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado.



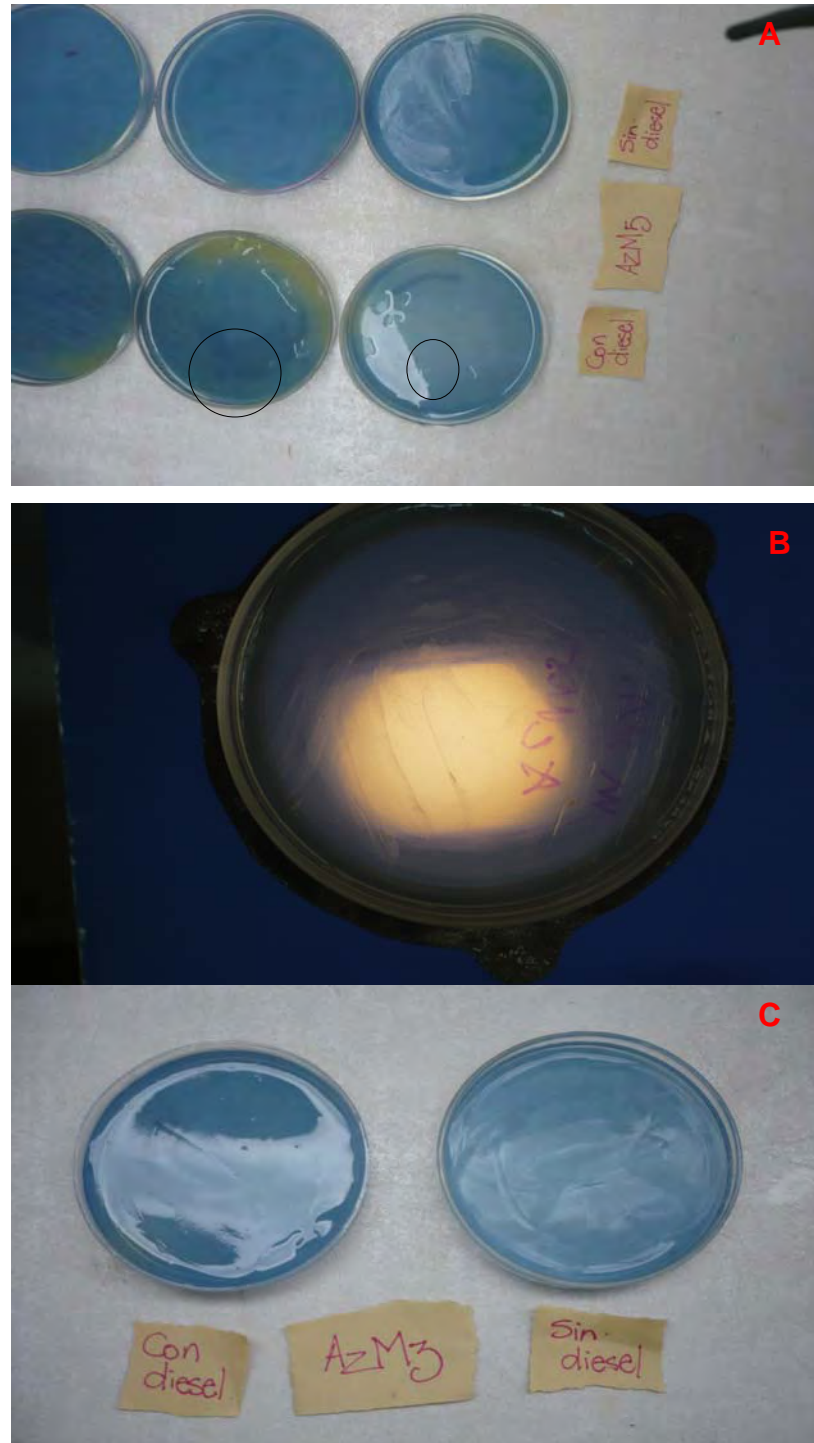


Figura 4.3. Tolerancia de *A. lipoferum* al diesel. A) AZm5 en medio Nfb, B) AZm5 en agar nutritivo, C) AZm3 en medio Nfb.



4.3.4 Selección de especie vegetal (*Medicago sativa*, *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*) y cepa de *Azospirillum lipoferum* (AZm1, AZm3 y AZm5)

Con el propósito de conocer el tipo de planta (*Medicago sativa*, *Lolium multiflorum*, *Lolium perenne*) y cepa (AZm1, AZm2, AZm3) con las cuales se obtendrían mejores resultados durante el proceso de fitorremediación asistida, se implementaron diversas actividades, las cuales serán detalladas a continuación.

Se realizó una selección de sistema planta-cepa con mejor colonización bacteriana, para tal efecto se procedió a la estandarización del inóculo a 20 Unidades Klett (UK) en un matraz nefelométrico y se efectuó la cuantificación de UFC por mililitro mediante diluciones seriadas empleando una asa calibrada (Ramírez *et al.*, 2006). Para tal propósito se siguió el procedimiento mostrado en la Figura 4.4.

Para la cuantificación de UFC por semilla, el procedimiento empleado se muestra en la Figura 4.5., se empleó el método de diluciones seriadas recurriendo a una asa calibrada (Ramírez *et al.*, 2006). Este procedimiento se realizó con las tres cepas, es decir, AZm1 en combinación con las semillas de las tres plantas, AZm3 y AZm5 respectivamente.



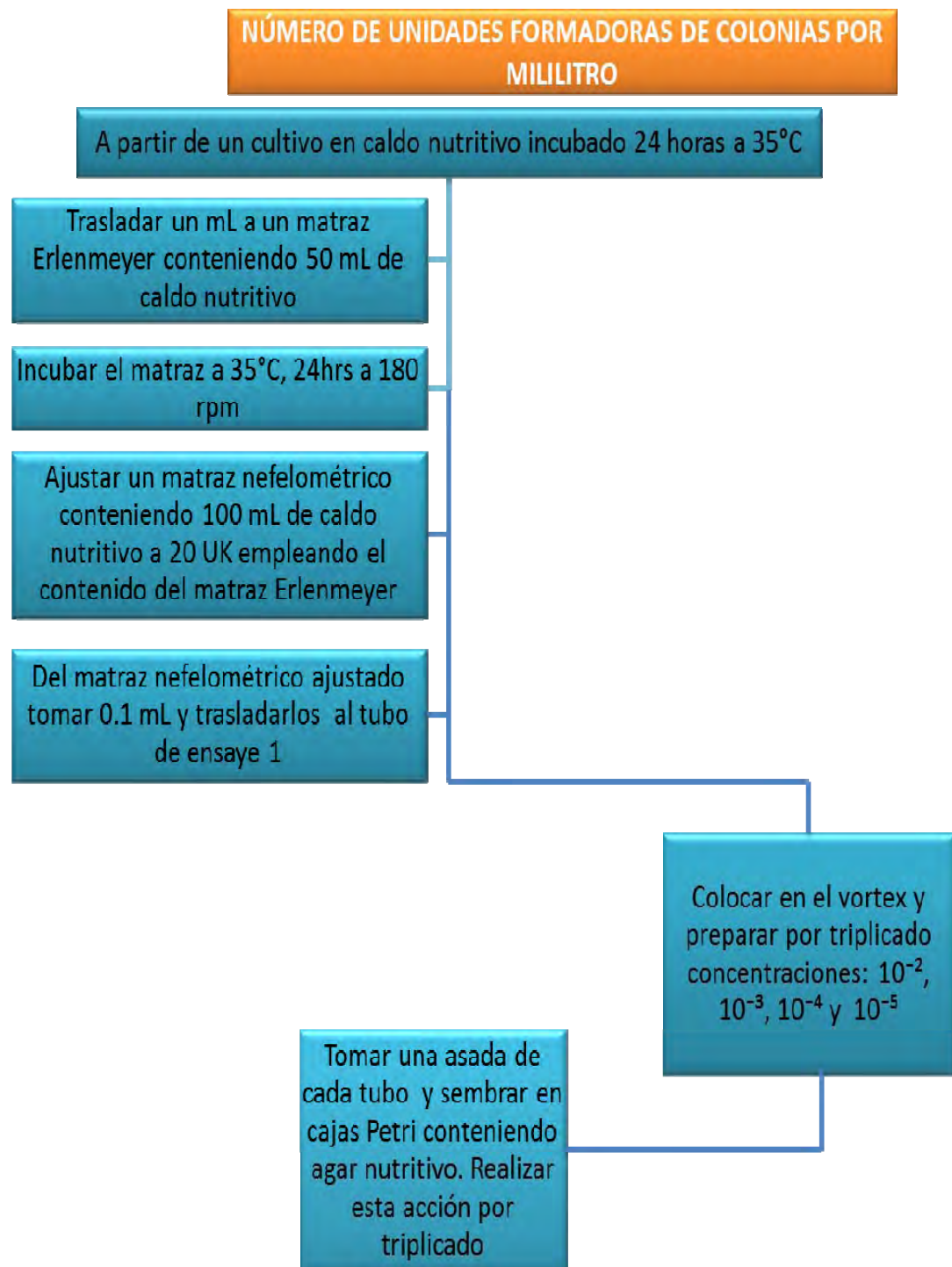


Figura 4.4. Cuenta de UFC por mililitro de acuerdo al método de diluciones seriadas.



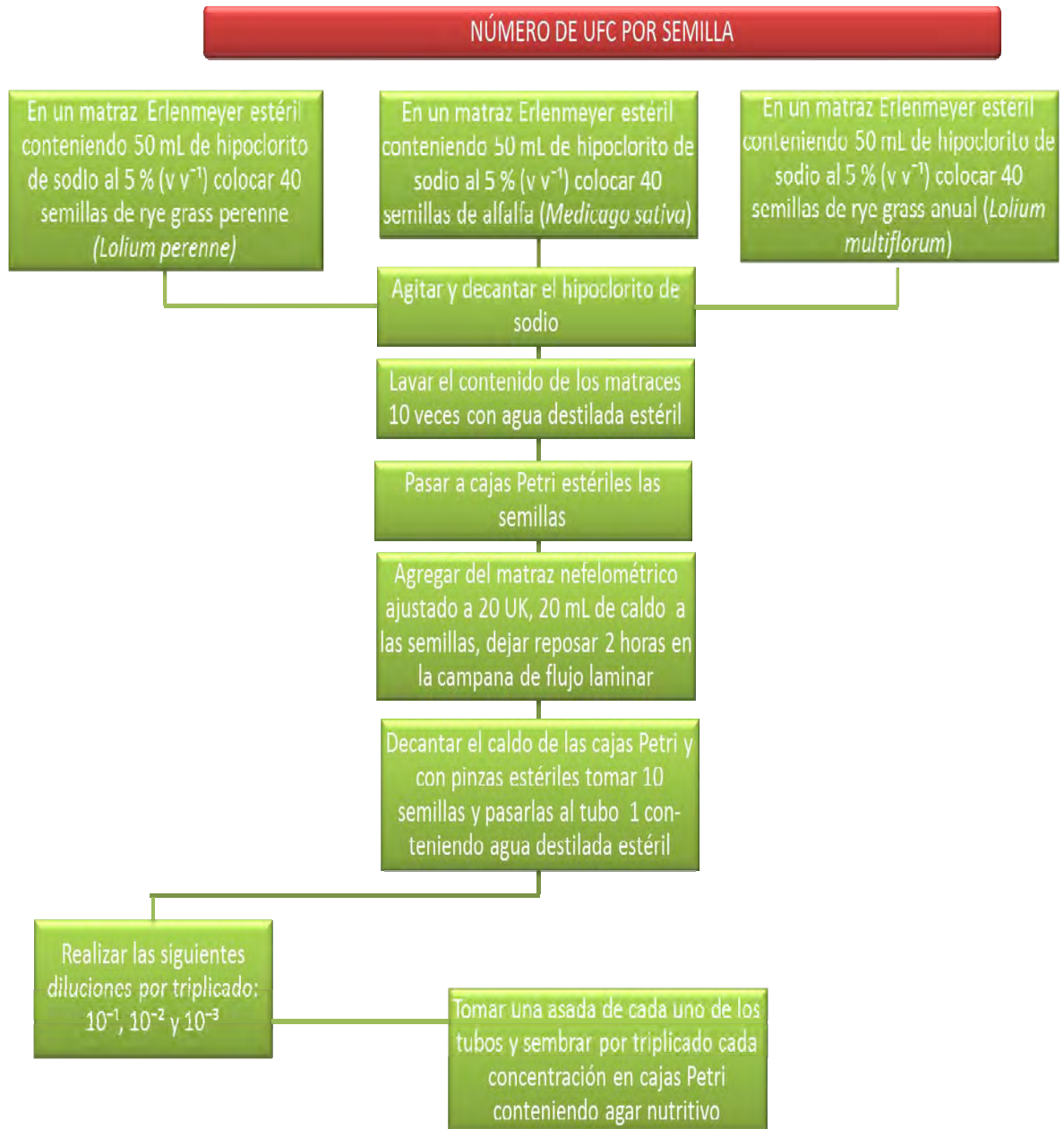


Figura 4.5. Cuenta de UFC de las cepas AZm1, AZm3 y AZm5 adsorbidas a las semillas de alfalfa (*Medicago sativa*), rye grass anual (*Lolium multiflorum*) y rye grass perenne (*Lolium perenne*)



4.4 Diseño experimental

Se propuso un diseño unifactorial, con cuatro niveles del factor:

- fitorremediación convencional
- fitorremediación asistida
- fitorremediación asistida combinada con bioestimulación y
- atenuación natural

Las tecnologías aplicadas se trabajaron con sus respectivos controles.

La experimentación consistió en la creación de diez bloques, cada uno de ellos monitoreado en intervalos de diez días hasta cumplir 60 días. Cada bloque se replicó tres veces, identificándose las unidades experimentales con iniciales de acuerdo a su contenido. Las unidades experimentales consistieron en recipientes de vidrio, de ocho centímetros de diámetro y diez centímetros de altura, sin horadaciones en la base para evitar la pérdida de lixiviados (Figura 4.6). Las determinaciones realizadas durante 60 días se resumen en la Tabla 4.1.

4.4.1 Condiciones de crecimiento y material vegetal

El tipo de planta seleccionada fue rye grass anual (*Lolium multiflorum*). En cada uno de los contenedores se colocaron 180 gramos de suelo y agrolita (8 gramos), esta última para permitir una menor compactación en el suelo.



Figura 4.7. Distribución de las unidades experimentales



Se colocaron 22 semillas en la superficie del suelo de cada unidad experimental. Posteriormente se regaron con 20 mililitros de agua de la llave cada dos días y se colocaron en un cuarto oscuro en una distribución completamente al azar (Figura 4.7.), a una temperatura de 25 °C durante dos semanas para inducir la germinación. Seguido al período de germinación, todos los contenedores se colocaron en el invernadero en una distribución al azar donde recibieron adecuada cantidad de luz para inducir su desarrollo y condiciones de humedad semejantes a las del período de germinación.

4.4.2 Fitorremediación asistida y convencional

En cada uno de los contenedores del bloque correspondiente a fitorremediación convencional se colocaron 22 semillas, mientras que las unidades experimentales del bloque denominado fitorremediación asistida contenían 22 semillas previamente inoculadas con *A. lipoferum*.

4.4.3 Bioestimulación

El ensayo de bioestimulación consistió en la adición de un fertilizante comercial inorgánico líquido (urea: fosfato diamónico = 5: 10) el cual fue agregado al suelo en el bloque correspondiente (Kaimi *et al.*, 2006). Las fuentes enriquecedoras de nitrógeno y fósforo fueron suministradas en cantidades proporcionales a 10 mililitros cada cuatro días durante 60 días.

4.5 Análisis estadístico

El modelo utilizado correspondió a un diseño completamente al azar, aplicando a los datos un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza $\alpha = 0.05$ y la prueba de rangos múltiples de Duncan. Se empleó el software SPSS 15.0.



Tabla 4.1. Determinaciones realizadas de acuerdo al bloque correspondiente.

BLOQUE	NITRÓGENO KJELDAHL	DETERMINACIÓN DE FÓSFORO	AIA	LONGITUD RADICULAR Y AEREA	CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBU- ROS FRACCIÓN MEDIA
SUELO	✓	✓			
ATENUACIÓN NATURAL (S+D)	✓	✓			✓
CONTROL 1 (S+B)	✓	✓	✓		
CONTROL 2 (S+B+D)	✓	✓	✓		✓
TESTIGO (S+P)	✓	✓	✓	✓	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL (S+P+D)	✓	✓	✓	✓	✓
CONTROL 4 (S+P+B)	✓	✓	✓	✓	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA (S+B+P+D)	✓	✓	✓	✓	✓
CONTROL 5 (S+B+P+F)	✓	✓	✓	✓	
BIOESTIMULACIÓN (S+P+B+D+F)	✓	✓	✓	✓	✓

S=suelo, D=diesel, B=*A. lipoferum*, P=*Lolium multiflorum*, F=fertilizantes, AIA=ácido indol-3-acético



DISEÑO EXPERIMENTAL

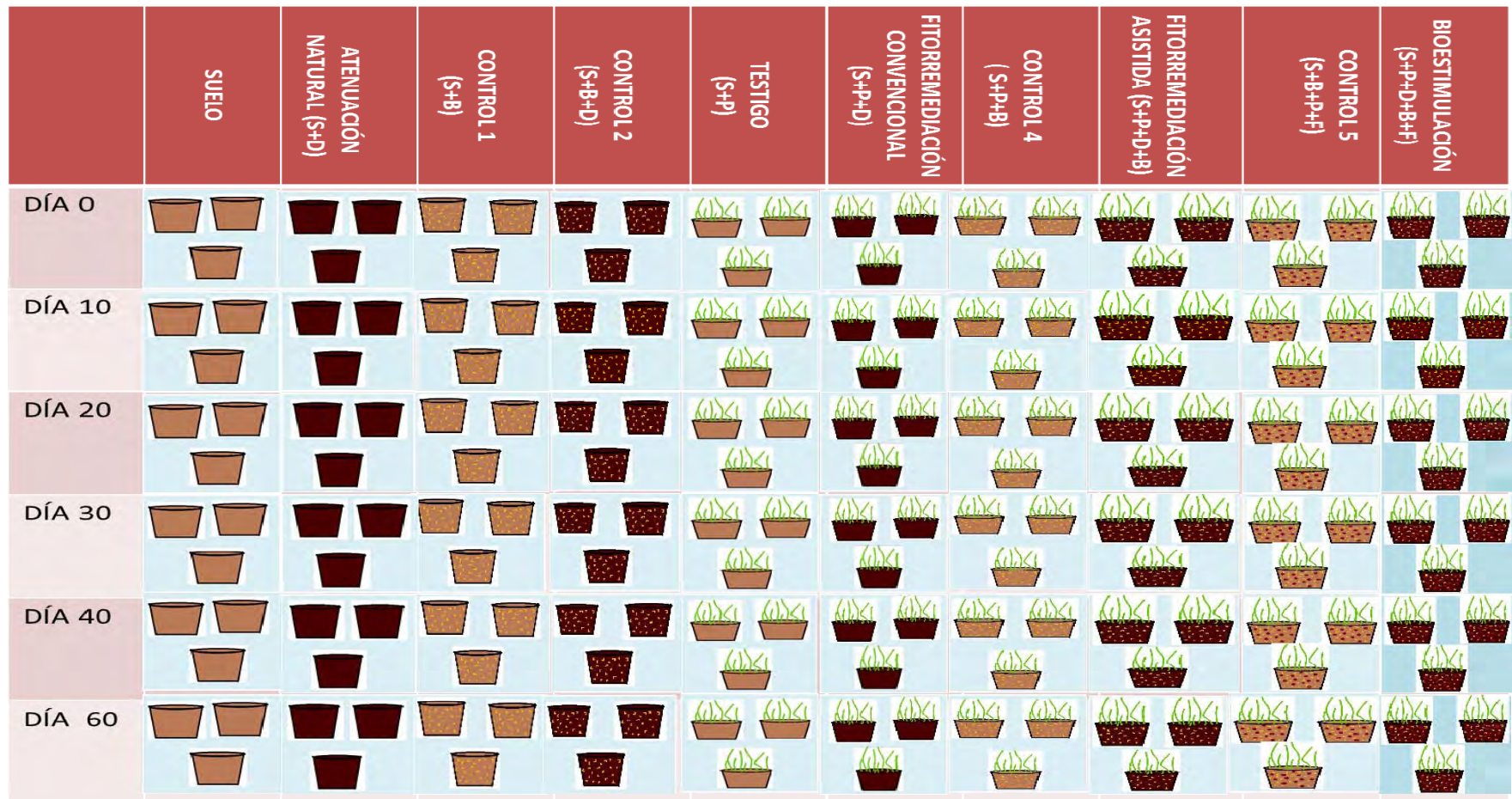


Figura 4.6. Diseño experimental empleado durante la realización del proyecto

S= suelo; D= diesel; B= *A. lipoferum*; P= *Lolium multiflorum*; F= fertilizante



4.6 Análisis al vegetal

Lolium multiflorum es un pasto que se ha empleado en procesos de fitorremediación de suelos contaminados con diesel debido a que su sistema radical forma una masa densa, además es de rápido establecimiento y crecimiento (Adam y Duncan, 2002; Kaimi *et al.*, 2006).

4.6.1 Porcentaje de viabilidad de las semillas

Se determinó el porcentaje de viabilidad para conocer la capacidad de sobrevivencia de las semillas en los diferentes tratamientos (bloques). Para ello se realizó una cuantificación del número de semillas con desarrollo aéreo en las unidades experimentales después de 20 días de haber sido sembradas en los contenedores.

4.6.2 Longitud radical y de parte aérea

Cada diez días se sacrificaban tres unidades experimentales de cada bloque. En las unidades con desarrollo vegetal se extrajeron las partes aéreas (hojas) y radicales de los pastos. Las partes vegetales se separaron con extremo cuidado y se procedió a medir sus longitudes con asistencia de un vernier.

4.6.3 Determinación indirecta de AIA

Como se ha descrito en el marco teórico, la síntesis de ácido indol-3-acético es, desde el punto de vista fisiológico el proceso más importante para la promoción del crecimiento de las plantas. La producción de AIA se cuantificó en el sistema radical. Para la determinación de esta auxina se siguió el procedimiento descrito por Wöhler, (1997) citado por Collados, (2006). Para tal efecto, se tomó un gramo de material vegetal para las determinaciones y en paralelo se trató un blanco. Se añadieron tres mililitros de amortiguador de fosfatos y dos mililitros de triptófano al 1% v v⁻¹ (excepto a los blancos). Se incubó en oscuridad en un baño con agitación a 37 °C durante 20



horas. Pasado este tiempo, se añadieron dos mililitros de triptófano a los blancos. A todas las muestras se les añadió un mililitro de ácido tricloroacético al 5% ($v v^{-1}$) y 0.5 mililitros de cloruro de calcio ($CaCl_2$) 0.5 M. Se centrifugaron las muestras durante diez minutos a 4 000 rpm. Se tomaron tres mililitros del sobrenadante y se añadieron 2 mililitros de solución de Salper (98 mililitros de ácido perclórico 37% ($v v^{-1}$), 2 mililitros de cloruro férrico 0.5 M). Se agitaron en vórtex y se incubaron durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente. La coloración obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro Ultrospec 3000 a 535nm. Con ayuda de una curva de calibración usando como patrón AIA (Tabla 4.2) se conocieron las concentraciones estimadas de AIA en las muestras.

Tabla 4.2. Curva patrón para la estimación de la concentración de AIA

Concentración ($mg\ Kg^{-1}$)	Solución patrón (mL)	H ₂ O destilada (mL)	Tomar mL	Reactivo de Salper (mL)
0	0	10	1	2
10	0.1	9.9	1	2
20	0.2	9.8	1	2
40	0.4	9.6	1	2
60	0.6	9.4	1	2
80	0.8	9.2	1	2



Figura 4.8. Diferente coloración dependiente de la concentración de AIA en las muestras.



La estimación de AIA es indirecta debido a la desventaja de la inespecificidad del reactivo de Salper ya que no solo cuantifica AIA sino que puede reaccionar con otros compuestos indólicos y metabolitos relacionados tales como el ácido indol pirúvico, indol láctico, indol acetamida, indol acetaldehído e indol etanol y producir coloración cuantificable (Costacurta *et al.*, 1994).



CAPÍTULO 5

***“¿Por qué te inquietas y preocupas de los enigmas del universo
si pronto vas a morir y te dará la muerte contestación a todos ellos?
Te dices: tiene que ser esto, o tiene que ser aquello; pero esto es absurdo,
y aquello... también.
Día a día marchas hacia el inmenso misterio, que, como gran estatua negra,
te aguarda inmóvil al final del camino, con los brazos cruzados
y los grandes ojos llameantes de respuestas...”***

Reyes Alfonso, 2001. “Antología de Amado Nervo poesía y prosa”.



5. Análisis y discusión de resultados

Se analizarán primeramente los resultados en forma individual y posteriormente se detallarán las correlaciones entre las diferentes variables de respuesta.

5.1 Cuenta de UFC de *Azospirillum lipoferum* por mililitro

Se observó que la cepa con mayor número de microorganismos presentes en el matraz nefelométrico ajustado a 20 UK correspondió a la cepa AZm5, mientras que el menor número de microorganismos presentes se atribuye a la cepa AZm1, proporcionando de esta forma una idea de la densidad poblacional de cada una de las cepas. Probablemente la diferencia en el número de UFC reportadas fue consecuencia de los errores intrínsecos del método de cuenta empleado.

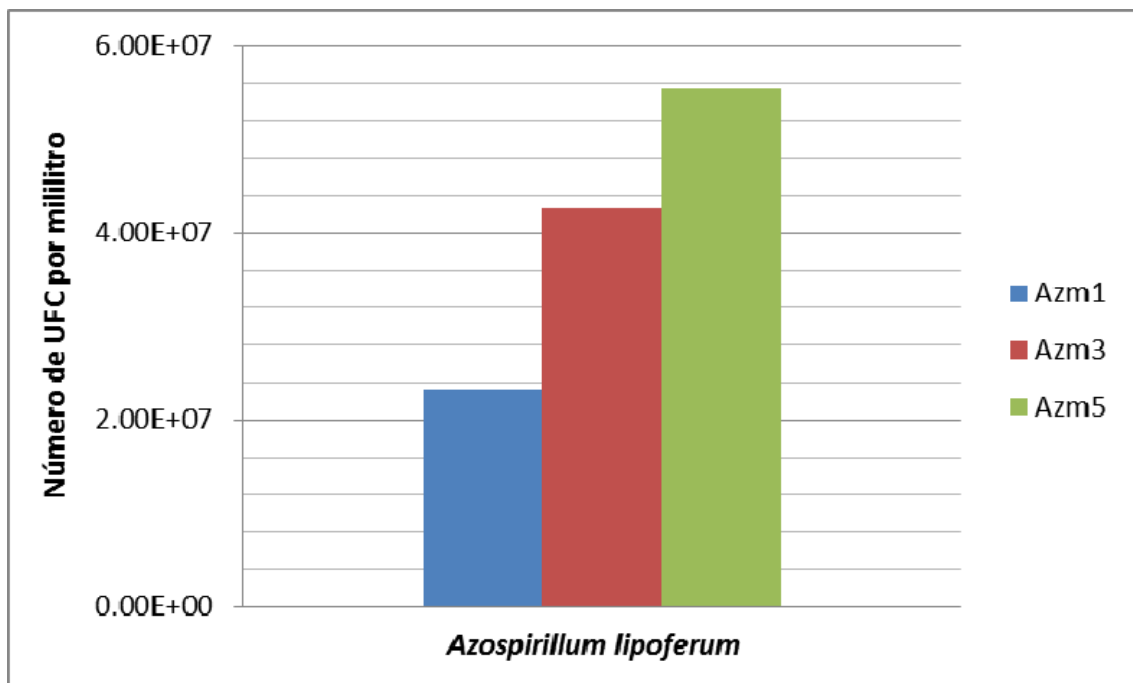


Figura 5.1. Relación del número de UFC por mililitro de las cepas AZm1, AZm3 y AZm5.

5.2 Cuenta de UFC de *Azospirillum lipoferum* adsorbidas en las semillas

El procedimiento empleado corresponde al descrito previamente en la Figura 4.2. Se conoce que el número de células a inocular se torna crítico al tener en



cuenta que un exceso puede ser perjudicial para la germinación de la semilla o crecimiento de la planta. Asimismo, el efecto promotor del crecimiento se ejerce incluso con bajas concentraciones microbianas, además la colonización de la semilla, juega un papel más importante que la persistencia del inóculo en el suelo (Collados, 2006). Por lo anterior, y con el fin de establecer el control del inóculo se determinaron las UFC por mililitro de cultivo, así como la cantidad de células que se adhirieron a las semillas.

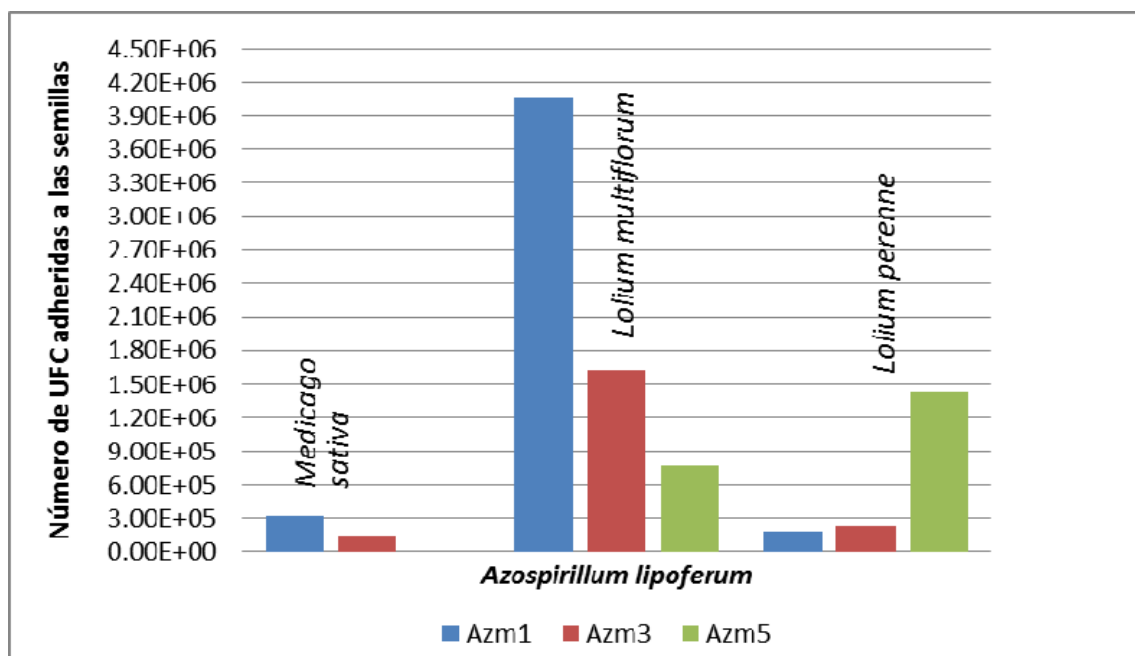


Figura 5.2. Relación de cepas AZm1, AZm3 y AZm5 adheridas a las semillas *Medicago sativa*, *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa con mayor capacidad de adhesión a las diferentes semillas correspondió a AZm1, mientras que la semilla que presentó mayor número de *A. lipoferum* adheridos a su superficie perteneció a *Lolium multiflorum* (Figura 5.2). El número de microorganismos adsorbidos a *Lolium multiflorum* se encontró dentro del intervalo 10^6 , lo que coincide con lo publicado por Chaîneau *et al.*, (2005), los cuales señalan que la aplicación de 10^6 a 10^7 UFC por semilla o planta es óptima.



Es importante señalar que la cepa con menor densidad poblacional (AZm1) fue la que presentó mayor número de células adsorbidas a las diferentes semillas, ésta adsorción se encontró estrechamente ligada con la superficie y tamaño de cada una de las semillas ya que *Lolium multiflorum* posee mayor tamaño y estructura superficial más rugosa con respecto a *Medicago sativa* y *Lolium perenne*.

5.3 Propiedades físicas y químicas del suelo natural y artificial

Los resultados obtenidos se observan en la Tabla 5.1. El fósforo es un macronutriente esencial para las plantas y los microorganismos, puede ser un nutriente limitante, ya que es un componente de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos (Fernández *et al.*, 2006). El valor obtenido en la caracterización fisicoquímica correspondió a una categoría baja de acuerdo a la NOM-021-SEMARNAT (2002).

La materia orgánica del suelo es la fracción orgánica que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición; tejidos y células de organismos que viven en el suelo; y sustancias producidas y vertidas por esos organismos (Fernández *et al.*, 2006). El contenido de materia orgánica en el suelo natural es clasificado por la NOM-021-SEMARNAT (2002) como de clase media.

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

Determinación	Resultado	Unidad	Desviación Estándar
Fósforo	1.02	mg Kg ⁻¹	0.12
Humedad	18.63	%	0.16
Materia orgánica	2.51	%	0.51
N_{TK}	0.17	%	0.02
pH	7.75		0.01
Textura	Franco arcillosa-Arenosa		

El pH es una propiedad química del suelo que tiene un efecto importante en el desarrollo de los seres vivos, la concentración de iones hidrógeno es fundamental en



los procesos físicos, químicos y biológicos del suelo (Fernández *et al.*, 2006). El pH obtenido correspondió a 7.75 por lo que es clasificado por la NOM-021-SEMARNAT (2002) como medianamente alcalino.

La textura del suelo es la proporción relativa de partículas de arena, limo y arcilla; las cuales al combinarse permiten categorizar al suelo en una de las 12 clases texturales incluidas en el triángulo de clasificación de texturas. Los resultados mostraron una clasificación franco arcillosa-arenosa (Tabla 5.2).

Tabla 5.2. Resultados de textura del suelo de Tierra Blanca, Veracruz.

	% de arena	% de arcilla	% de limo
Promedio	42.09	27.91	28.00
Desviación estándar	1.15	1.15	1.15

Una vez conocidas las características fisicoquímicas del suelo natural, éstas se emplearon para la elaboración del suelo artificial con características semejantes, lo que se corroboró con la caracterización fisicoquímica posterior a la conformación del suelo (Tabla 5.3).

Tabla 5.3. Caracterización fisicoquímica del suelo artificial.

Determinación	Resultado suelo artificial	Unidad	Desviación estándar
Fósforo	0.7	mg Kg ⁻¹	0.09
Humedad	23.12	%	0.43
Materia orgánica	2.54	%	0.51
N_{TK}	0.12	%	0.30
pH	7.60		0.01
Textura	Franco arcillosa arenosa		



5.4 Efectos de la adición de *Azospirillum lipoferum* sobre *Lolium multiflorum* en el proceso de fitorremediación asistida.

Considerando la capacidad de *Azospirillum* para asociarse con plantas de interés agrícola se han diseñado experimentos para evaluar el efecto de su inoculación en procesos de fitorremediación asistida (Tang, 2010). La adaptación de *Azospirillum* al ambiente rizosférico se inicia con la germinación de la semilla, la cual exuda infinidad de compuestos orgánicos. De acuerdo con Huang *et al.* (2004), la adición de una BPCV mejora la sobrevivencia de las plantas en suelos contaminados con compuestos orgánicos.

El bloque correspondiente a fitorremediación convencional obtuvo el mayor porcentaje de sobrevivencia de plantas, seguido por los bloques de fitorremediación asistida y bioestimulación respectivamente (Figura 5.3).

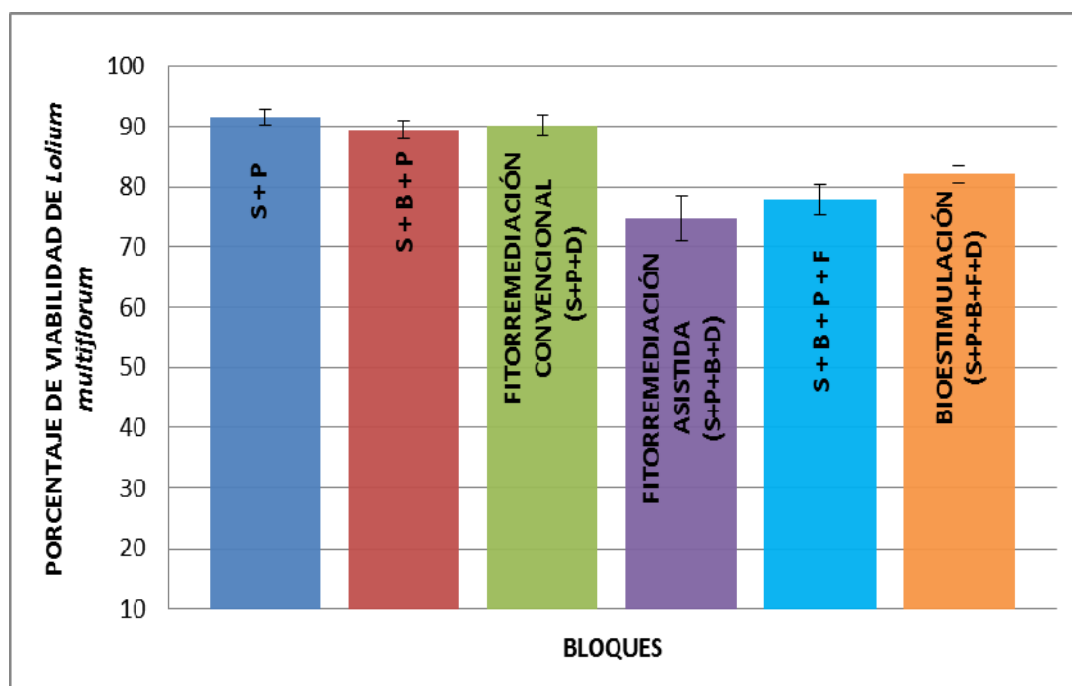


Figura 5.3. Comparación de los porcentajes de sobrevivencia durante el proceso de saneamiento. Las barras de error indican la D. S=suelo; B= *A. lipoferum*; P= rye grass anual; F= fertilizante.



Los bloques de fitorremediación asistida y bioestimulación mostraron una disminución en el porcentaje de sobrevivencia respecto a los controles, probablemente debido a la presencia del diesel ya que este tiene la capacidad de retrasar la germinación de la semilla así como disminuir el porcentaje de sobrevivencia, lo anterior como consecuencia de la toxicidad aguda causada por la presencia de la fracción ligera del diesel. Otro factor que influye en el proceso de viabilidad en suelos contaminados con diesel corresponde a la barrera física que el diesel forma alrededor de las semillas, acarreado como consecuencia la falta de agua y oxígeno dentro de éstas (Gillian y Duncan, 2002).

El bloque correspondiente a fitorremediación asistida obtuvo un porcentaje de viabilidad igual a 75%, mientras que el bloque de fitorremediación convencional presentó un porcentaje equivalente a 90%, no obstante, se observó que al incluir en el bloque de fitorremediación asistida la variable fertilizante (bioestimulación), el porcentaje de viabilidad se incrementó 7.1%, lo que indica que la adición de fertilizantes incrementó la viabilidad de las plantas.

Los resultados del presente trabajo de tesis determinaron que no existen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en los porcentajes de viabilidad entre los diferentes tratamientos, lo cual no se esperaba ya que se pretendía que con la adición de *A. lipoferum* existiera una mejora en la viabilidad de las semillas. Tales efectos podrían ser consecuencia de la influencia de factores abióticos como capacidad de retención de agua, Hyun *et al.*, (2008) señalaron que la presencia de diesel en suelos contaminados afectó directamente el transporte de agua debido a sus propiedades hidrofóbicas, induciendo una disminución en el contenido de humedad del suelo; asimismo Martínez y López (2001) demostraron un incremento en el contenido de arena y arcilla debido a la contaminación con 20 000 mg Kg⁻¹ de diesel; en tanto que el contenido de materia orgánica aumentó como consecuencia de la oxidación del material petrogénico, provocando un riesgo ecotóxico por la presencia de HAP.



Se ha probado que este género perteneciente a las BPCV produce resultados diversos posteriores a su inoculación. En diversos casos se han detectado incrementos sustanciales en cosechas bajo condiciones de campo e incluso se han obtenido mejores resultados bajo condiciones de invernadero (Dobbeleare *et al.*, 2001). A pesar de los numerosos resultados positivos descritos, la inoculación con *Azospirillum* se asocia con resultados impredecibles. Los factores responsables de este tipo de respuestas irregulares generalmente se atribuyen a la variabilidad de los factores ecológicos y medioambientales, a las características genéticas de la cepa y cultivos empleados, así como a la competencia con la microbiota nativa para establecerse en la rizosfera (Compant *et al.*, 2010). La riqueza en compuestos orgánicos de la rizosfera conduce a intensas actividades e interacciones microbianas. Collados (2006) indicó que la quimiotaxis hacia los exudados de la raíces, es uno de los factores que influyen en la proliferación de los microorganismos en la rizosfera.

De acuerdo con Camarillo (2006) la inoculación con *Azospirillum* mejora el desarrollo del sistema radical de las plantas, así como el rendimiento de los cultivos. Al igual que el sistema radical de las plantas causa un efecto directo sobre la microbiota colindante, los microorganismos de la rizosfera ejercen una marcada influencia en el crecimiento de las plantas. A continuación se analizan con detalle los efectos provocados con respecto a longitud aérea y radical de los diferentes tratamientos empleados.

De acuerdo a la Figura 5.4 se observa que los bloques S+P y S+P+B (controles) presentaron longitudes de raíz mayores que los bloques correspondientes a fitorremediación convencional y asistida, lo que indica que el diesel ejerció un efecto negativo en cuanto al desarrollo radical; sin embargo, se detectó que en la bioestimulación el desarrollo de la raíz aumentó con respecto a la fitorremediación asistida y convencional, lo que es más, el bloque de bioestimulación mantuvo un desarrollo parecido al bloque S+B+P (control), lo cual indicó que la adición de



fertilizantes en combinación con *A. lipoferum* conduce a una mejora en cuanto al desarrollo radical. Sin embargo, el análisis estadístico (ANOVA) indicó diferencias significativas al día 40, mientras que el resto de los días carecieron de diferencias, por lo que las medias de los tratamientos a los días 10, 20, 30 y 60 fueron similares. Al día 40, los resultados del análisis de rangos múltiples (Duncan) mostraron equivalencia estadística entre fitorremediación asistida y bioestimulación.

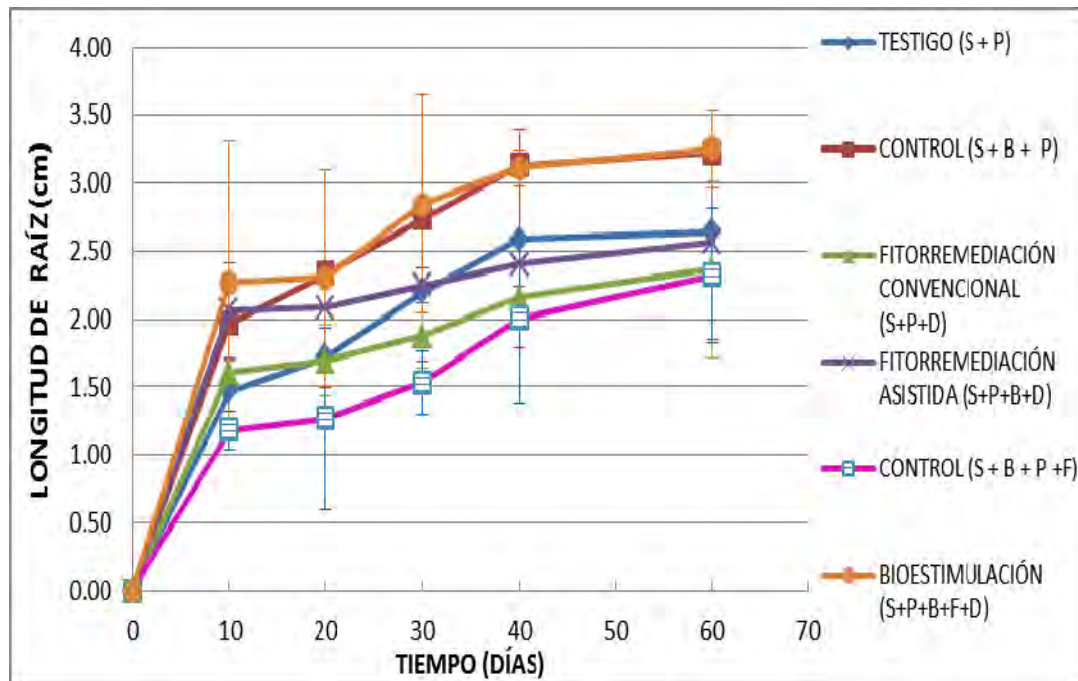


Figura 5.4. Longitudes radicales durante 60 días. S=suelo; B= *A. lipoferum*; P= rye grass anual; D= diesel; F= fertilizante; las barras de error indican la D.S.

Respecto a la aplicación de *A. lipoferum* como una BPCV, se determinó que con la inoculación previa se mejoró el desarrollo radical de rye grass (Figura 5.4), lo que coincide con lo publicado por Pacovsky *et al.*, (1995); sin embargo, no se debe descartar que solo existió diferencia significativa al día 40.

En cuanto a la longitud de hojas, se observó que la presencia de *A. lipoferum* incrementó el desarrollo aéreo de los pastos (Figura 5.5). El análisis estadístico mostró diferencias significativas a los días 20, 30 y 40; sin embargo, la prueba de rangos múltiples de Duncan demostró que la fitorremediación convencional y



asistida fueron estadísticamente iguales y diferentes al tratamiento de bioestimulación.

El testigo S+P obtuvo la mayor longitud aérea durante los 60 días de tratamiento, mientras que la fitorremediación convencional mostró una disminución relacionada con la longitud aérea como consecuencia de la adición de diesel y la carencia de *A. lipoferum*, lo que coincide con lo publicado por López *et al.*, (2005), los cuales demostraron una disminución en el desarrollo vegetal y germinación así como necrosis provocados como efecto de la contaminación de hidrocarburos.

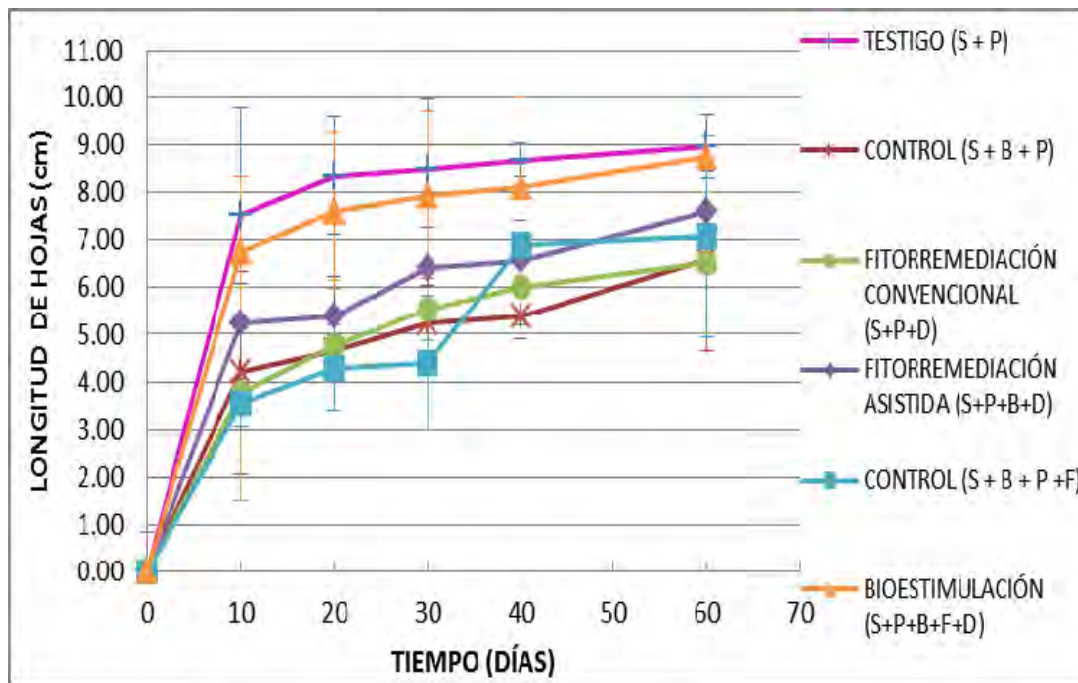


Figura 5.5. Longitudes aéreas de rye grass anual durante 60 días de transcurso experimental de los diferentes bloques. S=suelo; B= *A. lipoferum*; P= rye grass anual; D= diesel; F= fertilizante; las barras de error indican la D.S.

A pesar de la adición de diesel en la fitorremediación asistida y bioestimulación, los desarrollos aéreos fueron mayores comparando con sus respectivos controles (S+B+P+F y S+B+P) y con la fitorremediación convencional, lo que demostró que la presencia de *A. lipoferum* ejerció un efecto positivo relacionado con el desarrollo aéreo de *Lolium multiflorum*. Además, es importante señalar la capacidad de *A.*



lipoferum para sostener el crecimiento vegetal (López *et al.*, 2005; Compant *et al.*, 2010) en las tecnologías de fitorremediación asistida y bioestimulación.

Es significativo señalar que en los resultados de longitud radical y aérea, los mayores valores obtenidos corresponden a los bloques de bioestimulación, fitorremediación asistida y fitorremediación convencional, respectivamente.

Entre los mecanismos relacionados con la promoción del crecimiento vegetal mediados por BPCV se encuentra la disponibilidad de fósforo, ya que su aprovechamiento está restringido por su tendencia a precipitar en presencia de metales bivalentes tales como calcio (Ca^{2+}) y magnesio (Mg^{2+}). La mayor parte de las transformaciones del fósforo mediadas por microorganismos se consideran como una transformación de fosfato orgánico a inorgánico (mineralización) y la solubilidad de fósforo precipitado, facilitando de esta forma su asimilación (Atlas y Bartha, 2002).

La Figura 5.6 muestra que el testigo (S+P) y el control (S+B+P) tuvieron mayores cantidades de fósforo comparando con fitorremediación convencional y asistida, esta disminución en las tecnologías de saneamiento probablemente fue consecuencia del estrés inducido por la adición de diesel, ya que presentaron mayor demanda en el uso de fósforo disponible.

Aunque el análisis estadístico demostró diferencias significativas entre los tratamientos a los días 10, 30, 40 y 60, el aumento en la concentración de fósforo se atribuyó al menos en parte, al agua con la que se regó ya que podría contener sales disueltas; también se consideraron las células muertas provenientes de la cofia de la raíz, así como los restos de semillas que no germinaron y quedaron dentro de la matriz experimental.



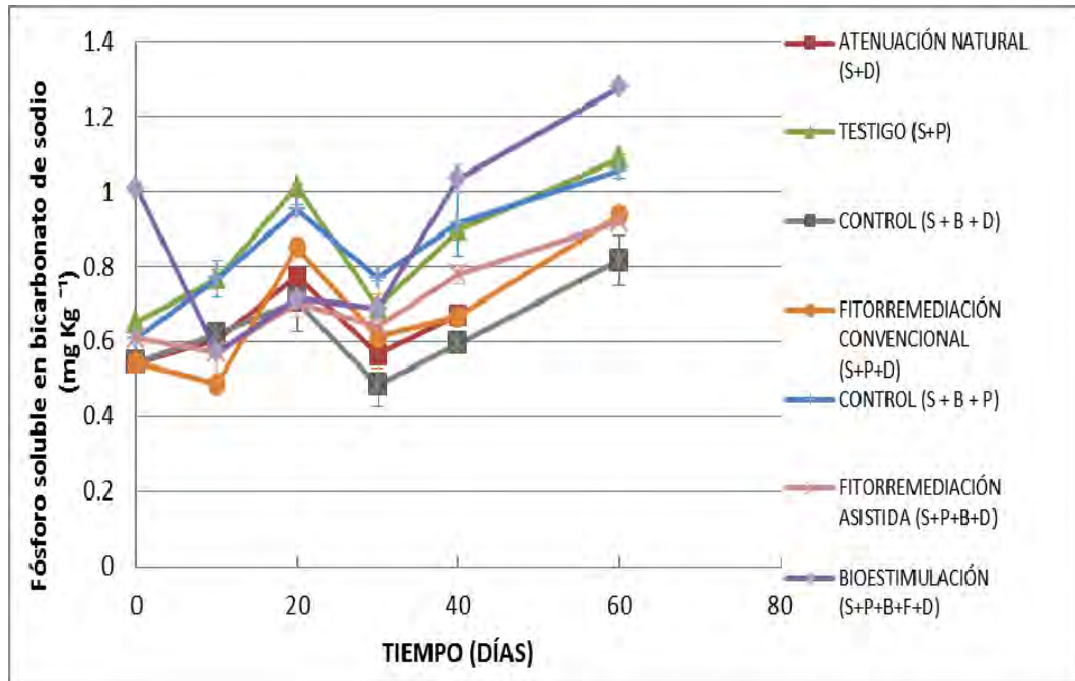


Figura 5.6. Cambios en la concentración de fósforo en suelo con las tecnologías de saneamiento empleadas. S= suelo; B= *A. lipoferum*; P= rye grass anual; las barras de error indican la D.S.

La adición de fosfato diamónico como fuente enriquecedora de fósforo en la tecnología de bioestimulación condujo al día 60 una cuantificación de fósforo mayor; sin embargo, en el lapso de los días 10-30, a pesar de la adición de una fuente externa de fósforo la concentración permaneció menor comparado con el respectivo control, lo anterior probablemente como consecuencia de una alta demanda de fósforo por parte de *A. lipoferum* y rye grass anual.

La disponibilidad de los compuestos orgánicos procedentes de los exudados radicales contribuyen a mejorar la eficacia de la transferencia de nitrógeno mediada por bacterias asociadas a la rizosfera (Atlas y Bartha, 2002). La Figura 5.7 muestra que la adición de *A. lipoferum* en los bloques de fitorremediación asistida y el control (S+B+P) produjo un aumento en la cantidad de nitrógeno detectable.



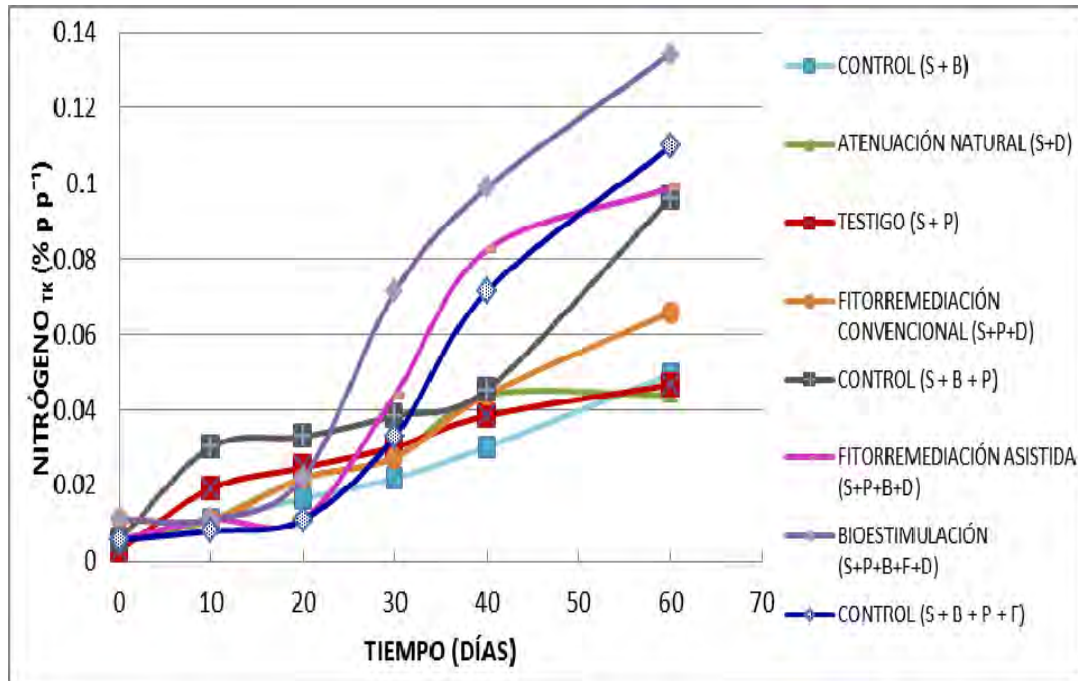


Figura 5.7. Comparación de los niveles de nitrógeno cuantificado durante el período de saneamiento. S= suelo; B= *A. lipoferum*; P= *Lolium multiflorum*; las barras de error indican la D.S.

En el control (S+B) se observó una concentración final menor de nitrógeno contrastando con el control (S+B+P), lo cual indica la importancia del establecimiento de la asociación entre la bacteria y la planta para una eficiente fijación de nitrógeno. La posible cuantificación de nitrógeno presente en el contaminante orgánico fue mínima por lo que no se consideró como un factor que pudiera interferir en la cuantificación de nitrógeno en las diferentes tecnologías de saneamiento.

Las tecnologías de fitorremediación asistida, convencional y bioestimulación superaron a sus respectivos controles en la cantidad de nitrógeno cuantificado. No obstante, el análisis estadístico demostró que no existieron diferencias significativas entre los diferentes tratamientos.

Es importante señalar que al inicio de los tratamientos el suelo correspondió a una clasificación extremadamente pobre en nitrógeno, mientras que al final de los



tratamientos el suelo del bloque de fitorremediación asistida se clasificó como clase media y el bloque de bioestimulación como medianamente rico (NOM-021-SEMARNAT-2002).

5.5 Estimación del efecto de fitorremediación

Estudios recientes han demostrado que algunas plantas incrementan la biodegradación de moléculas orgánicas en suelos contaminados, pero en presencia de BPCV el efecto se potencializa (Compant *et al.*, 2010; Tang *et al.*, 2010; López *et al.*, 2005). Conociendo que la velocidad de acumulación es mayor a la capacidad que tienen las plantas para remover los compuestos orgánicos contaminantes surgió el interés por colaborar con la naturaleza para revertir el efecto de los contaminantes en el suelo.

Los resultados relacionados con la disipación de diesel obtenidos durante el proceso experimental se muestran en la Figura 5.8. Después de 60 días bajo condiciones de invernadero la concentración inicial de 18 706 mg Kg⁻¹ fue reducida a diferentes concentraciones dependiendo del tipo de tecnología aplicada.

El bloque de atenuación natural presentó una concentración final de hidrocarburos fracción media equivalente a 10 930±353.550 mg Kg⁻¹ la cual correspondió a un porcentaje de remoción igual a 43.47%, después del día 40 la concentración de hidrocarburos decreció muy poco mientras que las concentraciones en el resto de los bloques mostraban mayores disminuciones. La atenuación natural se atribuye a procesos abióticos tales como volatilización, procesos de absorción y transformaciones químicas (Kästner *et al.*, 2000). El ensayo de fitorremediación convencional promovió una concentración final de hidrocarburos igual a 6 250±318.198 mg Kg⁻¹ (66.56%) la cual fue mayor comparando con los ensayos de fitorremediación asistida y bioestimulación.



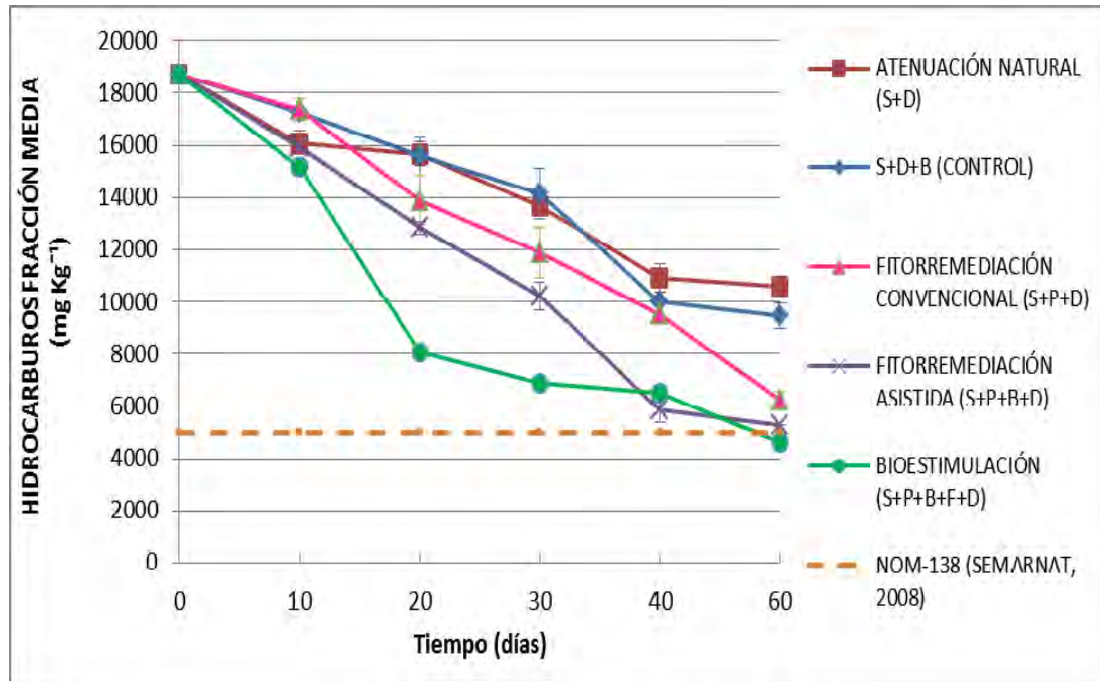


Figura 5.8. Concentración de hidrocarburos fracción media durante 60 días. S=suelo; B= *A. lipoferum*; D= diesel; las barras de error indican la D.S.

De acuerdo a la Figura 5.8., el ensayo de fitorremediación asistida mostró una concentración de hidrocarburos final equivalente a $5\ 260 \pm 1\ 018.234\ \text{mg Kg}^{-1}$ (71.88%), la cual es mayor que la obtenida en el ensayo de bioestimulación $4\ 620 \pm 1\ 209.152\ \text{mg Kg}^{-1}$ (75.33%), estos resultados son similares a los obtenidos por Kaimi *et al.*, (2006), quienes a su vez mencionan que la remoción es estimulada por el crecimiento radical, lo que coincide con la Figura 5.4 ya que el ensayo de bioestimulación presentó mayor longitud radical.

El porcentaje de remoción mayor correspondió al ensayo de bioestimulación seguido por fitorremediación asistida y fitorremediación convencional respectivamente, este comportamiento es una posible consecuencia relacionada con el efecto rizosférico sobre *A. lipoferum*, ya que las remociones óptimas correspondieron a longitudes aéreas y radicales mayores. Además, en la bioestimulación al día 20 la concentración de hidrocarburos correspondió a $8\ 050\ \text{mg Kg}^{-1}$ mientras que el resto de las tecnologías permanecieron aproximadamente en $14\ 000\ \text{mg Kg}^{-1}$.



Para tener una mejor apreciación relacionada con los porcentajes de remoción de hidrocarburos a continuación se presenta una tabla:

Tabla 5.4. Porcentajes de remoción de hidrocarburos fracción media.

TECNOLOGÍA	PORCENTAJE DE REMOCIÓN AL DÍA 20	D.S.	PORCENTAJE DE REMOCIÓN FINAL	D.S.
ATENUACIÓN NATURAL	16.20%	2.63	43.46%	1.98
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	25.67%	5.22	66.56%	1.77
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	31.31%	1.34	71.88%	5.66
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA COMBINADA CON BIOESTIMULACIÓN	56.97%	0.78	75.33%	6.72

El análisis estadístico (ANOVA) indicó la existencia de diferencias significativas entre los tratamientos a partir del día 10 y hasta el día 60. En los días 20 y 30 la media (Duncan) del tratamiento de bioestimulación fue estadísticamente diferente a las medias de fitorremediación asistida y convencional; no así en los días 40 y 60 donde las medias de los tres tratamientos resultaron ser estadísticamente iguales.

La NOM-138 (SEMARNAT, 2008) señala que el límite máximo permisible de HFM para un suelo remediado con fines comerciales e industriales corresponde a 5 000 mg Kg⁻¹, cabe destacar que la tecnología de bioestimulación al día 20 presentó 8 050 mg Kg⁻¹ de HFM lo cual equivalió a 56.97% de remoción, por lo que quedó demostrado que en un periodo de 20 días se removió la mitad de la concentración inicial de diesel; posterior a este tiempo, se podría aplicar un tratamiento fisicoquímico a efecto de alcanzar el límite máximo permisible. Con la aplicación de la tecnología de bioestimulación y el posterior uso de un tratamiento fisicoquímico se podría abatir satisfactoriamente el periodo de tratamiento.



Reynolds *et al.*, (1997) realizaron experimentos en suelos contaminados con diesel a una concentración de 8 000 mg Kg⁻¹ empleando fitorremediación convencional y las especies vegetales *Lolium multiflorum* y *Festuca rubra* durante 10 meses y mostraron una degradación de hidrocarburos equivalente a 73% más que el control. Cabe destacar que el ensayo de bioestimulación en el presente proyecto logró una remoción de hidrocarburos igual a 75.33% con respecto al control, esta disipación de hidrocarburos se logró en un tiempo relativamente menor el cual consistió en 60 días, por lo que la interacción rizosfera-*A.lipoferum*-fertilizante-hidrocarburo resultó beneficiosa para la remoción del contaminante orgánico.

En un ensayo de fitorremediación convencional realizado por Kaimi *et al.*, (2006) en un suelo contaminado con diesel a una concentración de 18 000 mg Kg⁻¹ y empleando rye grass, el porcentaje de remoción fue igual a 55% comparando con el control en un período de 152 días. Se enfatiza que en la presente tesis el porcentaje de remoción obtenido por la tecnología de bioestimulación fue mayor y se logró en un tiempo más breve.

5.6 Estimación de AIA radical

Las BPCV son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, solubilizar fósforo, además producen fitohormonas como las auxinas incidiendo directamente en el metabolismo de las plantas, adicionalmente mejoran la tolerancia de éstas al estrés (Camarillo, 2006).

La inoculación con *Azospirillum* modifica el sistema radical por un mecanismo o mecanismos aún no establecidos completamente; sin embargo, este se atribuye al menos en parte, a la producción por la bacteria, de sustancias que regulan el crecimiento vegetal (Aguilar *et al.*, 2008).

Uno de los principales mecanismos de la promoción vegetal mediado por BPCV consiste en la producción de fitohormonas como el ácido indol-3-acético (AIA) principal compuesto auxínico. Se sabe que el AIA producido por las bacterias



puede modificar el contenido de fitohormonas de las plantas conduciendo a la estimulación del crecimiento de las mismas (Bar y Okon, 1992).

De acuerdo a la Figura 5.9, el control (S+P+B) obtuvo la máxima concentración de AIA a lo largo del experimento, seguido por el testigo (S+P), lo que indicó que probablemente la aplicación de *Azospirillum lipoferum* como una BPCV indujo efectos positivos relacionados con la producción de AIA, lo que coincide con lo publicado por Collados, (2006).

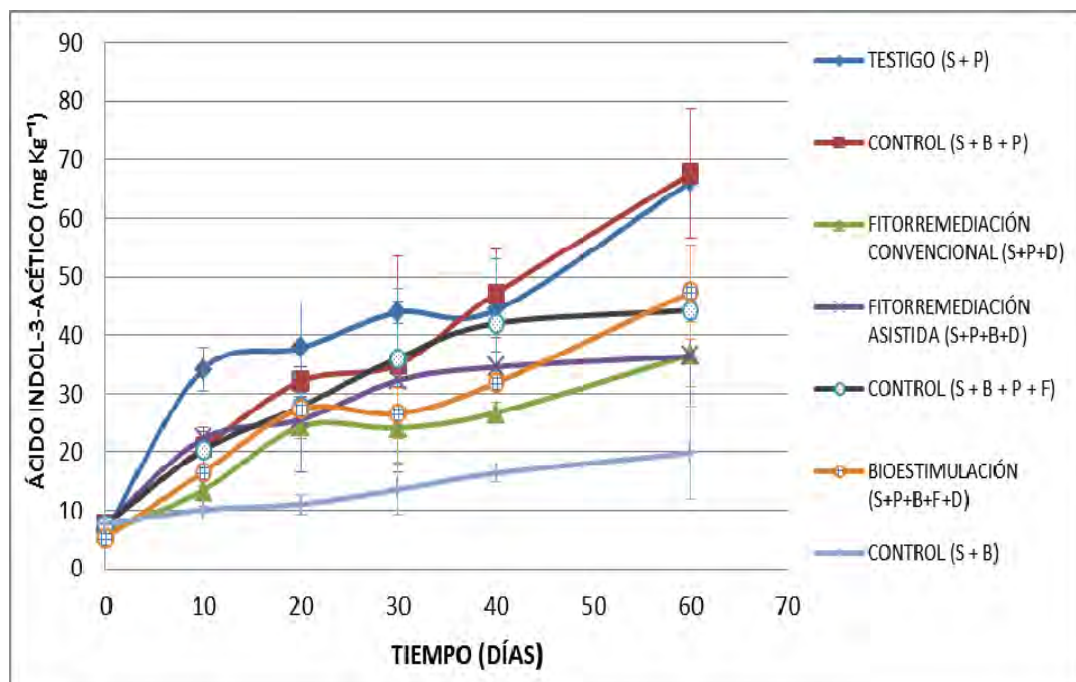


Figura 5.9. Monitoreo de la producción de AIA. Los datos presentados son resultado de tres réplicas; las barras de error indican la D.S.

Los bloques a los cuales se adicionó diesel tuvieron una producción de AIA menor comparando con aquellos que no lo contenían, lo que demostró que el diesel provocó efectos negativos en la producción de AIA debido al estrés inducido por el contaminante.

El ensayo de bioestimulación presentó una concentración mayor de AIA respecto a la fitorremediación asistida y convencional, lo cual demostró que la adición de



fertilizantes resultó beneficiosa para el desarrollo de *A. lipoferum* conduciendo a mayor producción de ésta. El análisis estadístico (ANOVA), demostró diferencia significativa a los días 10, 40 y 60, mientras que los días 20 y 30 carecieron de significancia, lo anterior probablemente fue consecuencia de la presencia de un período de fluctuaciones de factores ambientales como la temperatura y la luz, ya que después del período entre el día 20 y 30 la producción de AIA se incrementó y al día 60 se observó que si se hubiera continuado con el experimento probablemente la producción de AIA seguiría incrementándose con diferencias significativas entre tratamientos hasta llegar a una fase de estabilización.

De acuerdo a la prueba de rangos múltiples (Duncan), al día 10 las medias de fitorremediación convencional, fitorremediación asistida y bioestimulación fueron estadísticamente diferentes; no así a los días 40 y 60 donde las medias de fitorremediación convencional, fitorremediación asistida y bioestimulación fueron estadísticamente iguales.

5.7 Impacto del diesel en la producción de AIA

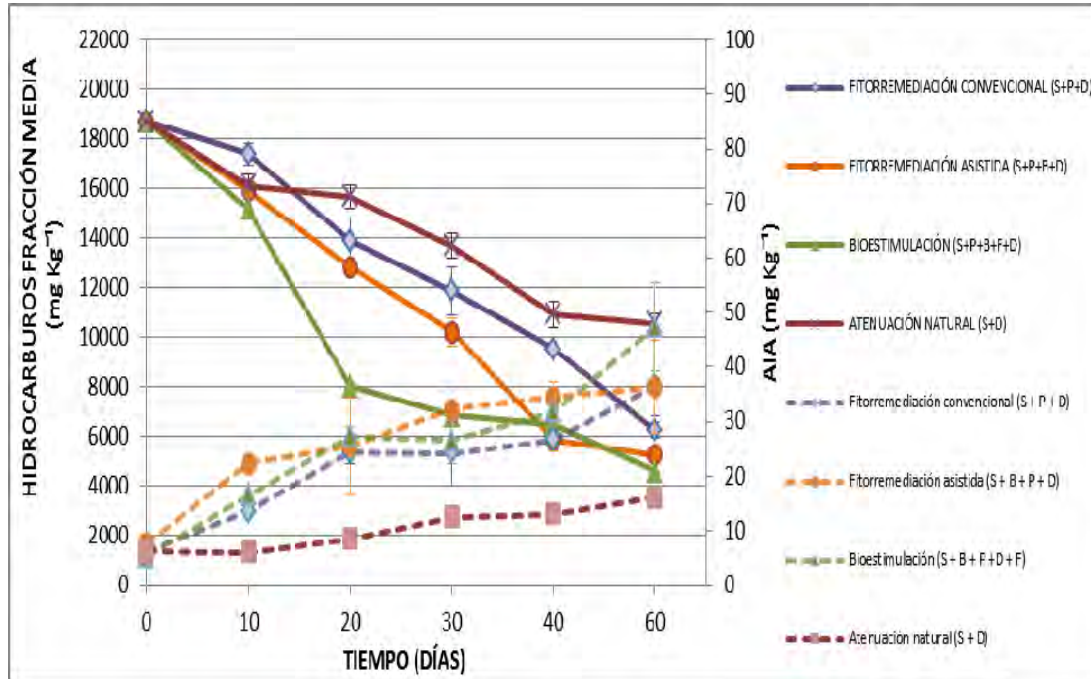
La producción de AIA durante la etapa experimental demostró que a mayor remoción de hidrocarburo se obtuvieron mayores concentraciones de AIA (Figura 5.10), este aumento en la producción de fitohormona está estrechamente relacionado con el crecimiento vegetal ya que conforme aumentó el desarrollo de los pastos, se incrementaron las producciones de AIA y las remociones de diesel.

El uso de *A. lipoferum* como BPCV condujo a un aumento en la producción de AIA durante el transcurso de fitorremediación asistida, resultando la mejor tecnología comparando con la fitorremediación convencional.

Se observó que al día 60 la tecnología de bioestimulación obtuvo la concentración mayor de AIA, seguida por fitorremediación asistida y convencional, lo que coincide con el porcentaje de remoción del diesel, lo que es más, al día 20 la bioestimulación



presentó un incremento en la producción de AIA, lo que coincidió con el mayor porcentaje de remoción en este periodo específico.



-----Cuantificación de AIA;

Cuantificación de HFM.

Figura 5.10. Correlación entre la producción de AIA y disipación de diesel.

5.8 Discusión integral

Desde inicios del siglo XX la fitorremediación fue señalada como una tecnología viable, eficiente y útil para el saneamiento de suelos contaminados con compuestos orgánicos (Zhuang *et al.*, 2007). Los mecanismos propuestos para la transformación de moléculas orgánicas xenobióticas en plantas consisten en: (i) reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis mediadas por aminooxigenasas y (ii) conjugación a carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas donde intervienen transferasas (López *et al.*, 2005). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones no mencionan la participación de fitohormonas las cuales podrían estar relacionadas con la producción de enzimas fitorremediadoras.



Rye grass anual, es empleado en tecnologías de remediación de suelos debido a su sistema radical fibroso, el cual ofrece una superficie para la colonización microbiana, además provee condiciones ideales para los procesos fitorremediadores (Adam y Duncan, 2002).

Uno de los principales mecanismos promotores del crecimiento vegetal mediado por BPCV consiste en la producción de fitohormonas, tales como las auxinas. El principal compuesto auxínico corresponde al ácido indol-3-acético, el cual mejora el crecimiento vegetal mediante la formación de pelos radicales, los cuales optimizan la nutrición y absorción de agua para la planta (Camarillo, 2006). La aplicación de *Azospirillum lipoferum* como BPCV en procesos de fitorremediación asistida ha sido recientemente estudiada (Zhuang *et al.*, 2007; Compant *et al.*, 2010), se conoce el efecto provocado por la inoculación en campos agrícolas; sin embargo, existe muy poca información experimental relacionada con los efectos provocados en procesos de fitorremediación asistida. Es por esto que se decidió realizar un seguimiento de la producción de AIA durante el proceso de saneamiento a efecto de determinar si esta producción se abatía o acrecentaba en presencia de diesel y de esta forma establecer tal producción como un factor trascendente en el proceso de saneamiento debido a que se encuentra estrechamente ligada al incremento radical y a progresos en las remociones de contaminantes orgánicos.

Las concentraciones de AIA mostraron un incremento durante los 60 días del experimento, este aumento podría estar relacionado con la eficiencia de remoción de diesel ya que a mejores remociones se obtuvieron mayores concentraciones de AIA, lo cual es aceptable ya que al final de los tratamientos los pastos se encontraban con menores índices de estrés.

Los resultados indicaron que la contribución de *A. lipoferum* en el proceso de fitorremediación asistida trae como consecuencia una mejor remoción (71.88%) con respecto al proceso de fitorremediación convencional (66.56%); sin embargo, la tecnología de bioestimulación mostró una remoción de 75.33% resultando más



eficiente con respecto a las dos tecnologías anteriores, esto posiblemente sea consecuencia del efecto aditivo de la inoculación de *A. lipoferum* y la adición de fertilizantes.

La remoción del contaminante orgánico se encontró ligada al desarrollo aéreo y radical de los pastos ya que en la bioestimulación las longitudes aéreas fueron mayores con respecto a fitorremediación asistida y convencional, respectivamente. El desarrollo radical mostró un comportamiento semejante.

El testigo S+P obtuvo la mayor longitud aérea durante los 60 días de tratamiento, mientras que la fitorremediación convencional mostró una disminución de la longitud aérea como consecuencia de la adición de diesel y la carencia de *A. lipoferum*. A pesar de la adición de diesel en la fitorremediación asistida y bioestimulación, los desarrollos aéreos fueron mayores comparando con sus respectivos controles (S+B+P+F y S+B+P) y con la fitorremediación convencional, lo que demostró que la presencia de *A. lipoferum* y el estrés inducido por el diesel ejercieron un efecto positivo relacionado con el desarrollo aéreo de *Lolium multiflorum*.

El comportamiento general de la producción de AIA está relacionada con el tamaño aéreo y radicular de los pastos ya que se observó que a mayor tamaño de la planta existió mayor cuantificación de AIA. La atenuación natural presentó el menor porcentaje de remoción y la producción de AIA fue menor que en el resto de las tecnologías, lo cual indica que la producción de ésta fitohormona es un factor trascendente en la asociación planta-*Azospirillum lipoferum*. La fijación de nitrógeno es otro mecanismo de promoción del crecimiento vegetal mediado por *A. lipoferum*, durante el transcurso de la etapa experimental se detectaron incrementos asociados a su cuantificación además se observó que la presencia de la bacteria aumentó la cantidad de nitrógeno con respecto a la tecnología sin previa inoculación de ésta.

Los resultados mostraron que los principales mecanismos promotores del desarrollo vegetal mediados por *A. lipoferum* contribuyeron al progreso del proceso de fitorremediación.



CAPÍTULO 6

“Vale más errar creyendo que errar dudando...si dudas del todo, en todo hallarás el agujón de la pena, porque muchas cosas te acaecerán conforme a tu duda, y lo bueno que te acaezca, a pesar de ella, estará amargado por tu escepticismo anterior.

En cambio si en todo tienes fe, tus propios desengaños te serán gratos, recordando que hasta que no llegaron esperaste...y tus dichas florecerán como rosas plenas después de una estación entera de rosas...”

Alfonso Reyes, 2001. “Antología de Amado Nervo poesía y prosa”.



6. Conclusiones

De manera general puede afirmarse que en suelo artificial contaminado con diesel, es posible evaluar el proceso de fitorremediación asistida por *Azospirillum lipoferum* como bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV), mediante determinación indirecta de ácido indol-3- acético (AIA).

- La cepa AZm1 de *Azospirillum lipoferum* tiene mayor capacidad de adsorción, por lo cual se considera como la más compatible con la semilla rye grass anual (*Lolium multiflorum*).
- La inoculación previa de *Azospirillum lipoferum* no mejora el porcentaje de sobrevivencia en rye grass anual, pero tiene un efecto positivo relacionado con el porcentaje de remoción del diesel obteniendo las concentraciones de fracción media finales siguientes: bioestimulación $4\ 620 \pm 1\ 209.152\ \text{mg Kg}^{-1}$ (75.33%), fitorremediación asistida $5\ 260 \pm 1\ 018.234\ \text{mg Kg}^{-1}$ (71.88%) y fitorremediación convencional $6\ 250 \pm 318.198\ \text{mg Kg}^{-1}$ (66.56%), respectivamente.
- Mediante la bioestimulación es posible alcanzar 56.97% de remoción al día 20, el cual representa un porcentaje superior al resto de las tecnologías.
- La interacción entre la rizosfera de rye grass anual y *Azospirillum lipoferum* produce un aumento en la producción de AIA radical, lo que se traduce en una remoción más eficiente.
- Las óptimas remociones de hidrocarburo corresponden a longitudes aéreas mayores.
- A pesar de la adición de diesel, los desarrollos aéreos de fitorremediación asistida y bioestimulación, son mayores comparando con sus respectivos controles (S+B+P+F y S+B+P) y con la fitorremediación convencional.



- La cuantificación de nitrógeno y producción de AIA exhiben una tendencia de incremento durante la etapa experimental. No obstante, el análisis estadístico (ANOVA) indicó que la cuantificación de nitrógeno no presentó diferencias significativas entre tratamientos.
- Los resultados mostraron que la producción de AIA mediados por *A. lipoferum* y *Lolium multiflorum* contribuyeron al progreso durante el proceso de fitorremediación.



Referencias bibliográficas

- Adam G. y Duncan H. (2002). The effect of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120: 363-370.
- Aguilar P. J. J., Xiqui V. M. L., García G. S. y Baca B. E. (2008). Producción del ácido indol-3-acético en *Azospirillum*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 50 (1-2): 29-37.
- Andria V., Reichenauer T. y Sessitsch A. (2009). Expression of alkane monooxygenase (*alkB*) genes by plant-associated bacteria in the rhizosphere and endosphere of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* L.) grown in diesel contaminated soil. *Environmental Pollution*. 157: 3347-3350.
- Atlas M. R. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Pearson Education 4^a ed. Madrid.
- Bar T. y Okon Y. (1992). Induction of indole-3-acetic acid sintesis and possible toxicity of tryptophan in *Azospirillum brasilense* Sp 7. *Symbiosis*. 7: 191-198.
- Bashan Y. (2005). Plant growth-promoting. *Encyclopedia of soils in the environment*. 1: 103 -115 pp.
- Bashan Y. (1998). Inoculants of plant-growth promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*. 16(4): 729-770.
- Bashan Y. y Holguin G. (1997). *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Canadian Journal of Microbiology*. 43: 103-121.



- Benavides L. J., Quintero G. M., Guevara V. A., Jaimes C. D., Gutiérrez R. S. y Miranda G. S. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA- Publicación científica*. 4(5): 1-16.
- Bizecki D., Knight D., Farrel R. y Germida J. (2003). Ability of cold tolerant plants to grow in hydrocarbon contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 5 (2): 105-123.
- Brack E. A. y Mendiola V. C. Ecología del Perú, programa de las naciones unidas para el desarrollo. Perú. Editorial Bruño, primera edición, 2000.
- Caballero M. J. (2006). El género *Azospirillum*. Programa de ecología molecular y microbiana, Centro sobre fijación de nitrógeno, UNAM, Cuernavaca Morelos, México.
- Camarillo C. A. M. (2006). Determinación de la actividad de la ACC deaminasa en cepas de *Azospirillum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 86 pp.
- Carranza R. M. (2010). Remoción de diesel en un suelo por medio de fitorremediación convencional y asistida por BPCV. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. 150pp.
- Cassan F., Perrig D., Mascianelli O. y Luna V. (2002). Producción de fitohormonas por *Azospirillum lipoferum*. Aspectos fisiológicos y tecnológicos de la promoción del crecimiento. Laboratorio de fisiología vegetal y de la interacción planta-microorganismo. Capítulo 14.
- Centro Nacional de Prevención de Desastres, CENAPRED. <<http://www.cenapred.unam.mx/es/>>. Consultado el 26 de noviembre de 2009.



- Chaîneau C. H., Rougeux G. y Oudot J. (2005). Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biology and Biochemistry*. 37: 1490-1497.
- Cheryl P. y Glick B. (1996). Bacterial biosynthesis of indole-3-acetic acid. *Canadian Journal of Microbiology*. 42: 207-220.
- Clements W. H., Oris J. T. y Wissing T. E. (1994). Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo(a)pyrene in *Chironomus riparius* and *Lepomis macrochirus*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*. 26:261-266.
- Collados C. C. (2006). Impacto de inoculantes basados en *Azospirillum* modificados genéticamente sobre la diversidad y actividad de los hongos de la micorriza arbuscular en rizosfera de trigo y maíz. Tesis doctoral. Facultad de ciencias. Universidad de Granada. 185 pp.
- Compant S., Clément C. y Sessitsch A. (2010). Plant growth-promoting bacteria in the rhizo and endosphere of plants: their role, colonization, mechanisms involved and prospects for utilization. *Soil Biology and Biochemistry*. 42:669-678
- Costacurta A., Keijers V. y Vanderleyden J. (1994). Molecular cloning and sequence analysis of an *Azospirillum brasilense* indole-3-pyruvate decarboxylase. *Molecular and General Genetic*. 243:463-472.
- Costacurta A. y Vanderleyden, J. (1995). Synthesis of phytohormones by plant-associated bacteria. *Crit. Rev. Microbiol*. 21: 1-18.
- Dobbelaere S., Croonenborghs A., Thys A., Ptacek D., Vanderleyden J., Dutto P., Labandera G. C., Caballero M. J., Aguirre J. F., Kapulnik Y., Brener S., Burdman



S., Kadouri D., Sarig S. y Okon Y. (2001). Response of agronomically important crops to inoculation with *Azospirillum*. *Journal Plant Physiology*. 28: 1-9.

Environmental Protection Agency, (EPA). (2000). Introduction to phytoremediation. Editorial EPA. USA. 72 pp.

Environmental Protection Agency, EPA. <http://www.epa.gov>. Consultada el 19 de enero de 2011.

Esquivel C. R. (2002). Selección e identificación de rizobacterias promotoras del desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con aguas residuales y su efecto sobre el desarrollo de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). Tesis de maestría en ciencias. Facultad de ciencias, UNAM. 154 pp.

Fátima B., Flavio A., Oliveira C., Benedict O. y William T. (2003). Bioremediation of soils contaminated with diesel oil. *Brazilian Journal Microbiology*. 34 (1).

Fernández L. L., Rojas A. N., Roldán C. T., Ramírez I. M., Zegarra M. H., Uribe H. R., Reyes Á. R., Flores H. D. y Arce O. M. (2006). Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo, Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. México, D. F. 184 pp.

Fernández, P., Grifoll M., Solanas A. M., Bayona J. M. y Albaigés J. (1992). Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. *Environmental Science Technology*. 26:817-829.

García P. B. (2000). Economía ambiental. Facultad de economía, UNAM. 125pp.

Gillian A. y Duncan H. (2002). Influence of diesel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120:363-370.



- Glick B. R. (2001). Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnology Advances*. 21: 383-393.
- Glick B. R. (2010). Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnology Advances*. 28: 367-374.
- Harvey P., Campanela B., Castro P., Harms H., Lichtfouse E., Schäfner A., Smrcek S. y Werck D. (2002). Phytoremediation of polyaromatic hydrocarbons, anilines and phenols. *Environmental Science Pollution*. 9: 29-47.
- Hernández R. H. (2010). Fito-remediación asistida por BPCV de un suelo contaminado por diesel y evaluación de su toxicidad post-tratamiento. Tesis de maestría. Facultad de Ingeniería. UNAM. 102 pp.
- Hoffman D. J., Rather B. y Cairns J. (2003). Handbook of Ecotoxicology. Ed. Lewis Publishers 2nd ed. USA. 1290 pp.
- Howe-Grant M. (1996). Petroleum. Encyclopedia of chemical technology. 4th ed. Wiley Interscience Publication. New York. 342-430 pp.
- Huang X. D., El-Alawi Y., Penrose D. M., Glick B. R. y Greenberg B. M. (2004). A multiprocess phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*. 130: 465-476.
- Hyun S., Ahn M., Zimmerman A., Kim M. y Kim J. (2008). Implication of hydraulic properties of bioremediated diesel-contaminated soil. *Chemosphere*. 71:1646-1653.
- Instituto Mexicano del Petróleo, IMP. <<http://www.imp.mx>>. Consultada el 13 de octubre de 2009.



- Juárez M. C. H. (2007). Evaluación de fitorremediación en suelos contaminados, utilizando tres especies. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. 113 pp.
- Kaimi E., Mukaidani T., Miyoshi S. y Tamaki M. (2006). Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany* 55: 110-119.
- Kanally R. A. y Harayama S. (2000). Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *Journal of Bacteriology*. 182: 2059-2067.
- Kästner M. (2000). Humification: process or formation of refractory soil organic matter. En J. Klein (Ed), *Biotechnology. Environmental processes II. Soil decontamination*. Wiley-VCH. Weinheim. 89-126 pp.
- Leyser O. (2006). Dynamic integration of auxin transport and signaling. *Current Biology*. 16: 424-433
- López S., Gallegos M. M., Pérez F. L. y Gutiérrez R. M. (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional Contaminación Ambiental*. 21: 91-100.
- Martínez V. y López F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*. 19:9-17.
- McIntyre N. (2000). Phytoremediation of soils contaminated with fuel. <http://www.phytopeg.org>. Consultada el 6 de septiembre de 2009.
- Metting F. B. (1993). *Soil Microbial Ecology: Applications in Agricultural and Environmental Management*. Marcel Dekker, New York.



Nie M., Lu M., Yang Q., Zhang X., Xiao M., Jiang L., Yang J., Fang C., Chen J. y Li B. (2011). Plants' use of different nitrogen forms in response to crude oil contamination. *Environmental Pollution*. 159:157-163.

Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelo. Estudios, muestreos y análisis. Diario Oficial de la Federación, martes 31 de diciembre de 2002.

Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SA1-2008. Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación. Diario Oficial de la Federación, lunes 23 de agosto de 2010.

Ona O., Impe J. V., Prinse E. y Vanderleyden. (2005). Growth and indole-3-acetic acid biosynthesis of *Azospirillum brasilense* Sp245 is environmental controlled. *FEMS Microbiology Letters*. 246:125-132.

Pacovsky, R. S., Paul E. A. y Bethlenfalvay G. J. (1995). Nutrition of sorghum plants fertilized with nitrogen or inoculated with *Azospirillum brasilense*. *Plant Soil* 85:145-148.

Petróleos Mexicanos, PEMEX. < <http://www.pemex.com/>>. Consultada el 12 de agosto de 2009.

Peng G. H., Wang G., Zhang W., Hou Y., Liu E., Wang T. y Tan Z. (2006). *Azospirillum melinis* a group of diazotroph isolated from tropical molasses grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 56: 1263-1271.

Perrig D., Boiero L., Masciarelli O., Penna C., Cassán F. y Luna V. (2007). Plant growth promoting compounds produced by two agronomically important strains of



Azospirillum brasilense, and their implications for inoculant formulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 75: 1143-1150.

Prinsen E., Costacurta A., Michiels K., Vanderleyden J. y Van Onckelen H. (1993). *Azospirillum brasilense* indole-3-acetic acid biosynthesis: evidence for a non-tryptophan dependent pathway. *Molecular Plant Microbe Interactions*. 6: 609-615.

Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, PROFEPA. <<http://www.profepa.gob.mx/>>. Consultada el 3 de agosto de 2010.

Ramírez G. R., Millán L. B., Mejía C. A., Velázquez M. O., Tsuzuki R. G., Vierna G. L., Hernández G. L. y Müggenburg I. (2006). Manual de prácticas de microbiología general. Quinta edición. Facultad de química. UNAM. 147-179 pp.

Reynolds C., Pidgeon L., Perry B., Koenen D., Pelton H., Nichols S. y Wolf D. (1997). In lessons; A. and BC. Alleman (eds). 5th international in-situ and on-site bioremediation Symposium. San Diego California. 6: 33-38.

Ross J., O'Neill D., Smith J., Kerckhoffs y Elliot R. (2000). Evidence that auxin promotes the gibberellin A1 biosynthesis in pea. *Plant Journal*. 21: 547-552.

Shimada M. K. (2000). Determinación de fósforo soluble en bicarbonato de sodio usando ácido ascórbico como agente reductor. Laboratorio de Edafología Ambiental. Instituto de Geología. UNAM.

Skvortsov I. M. e Ignatov V. V. (1998). Extracelular polysaccharides and polysaccharide-containing biopolymers from *Azospirillum* species: properties and the possible role in interaction with plant roots. *FEMS Microbiology Letters*. 165: 223-229.



- Steenhoudt O. y Vanderleyden J. (2000). *Azospirillum*, a free-living nitrogen fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews*. 24: 487-506.
- Stephan O. E. (2003). El agua en la Cuenca de México. Sus problemas históricos y perspectivas de solución. Ed. Progreso. Ciudad de México. 41-49 pp.
- Strzelczyk E., Kamper M. y Li C. (1994). Cytocinin-like-substances and ethylene production by *Azospirillum* in media with different carbon sources. *Microbiological Research*. 149: 55-60.
- Tang J., Wang R., Niu X., Zhou Q. (2010). Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil and Tillage Research*. 110:87-93.
- Ulrici W. (2000). Contaminated soil areas, different countries and contaminants monitoring of contaminants. *Soil Decontamination, Biotechnology*. 11:5-42 pp.
- Vande B. A., Lambrecht M., Kristel E. y Vanderleyden J. (1999). Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *Journal of Bacteriology*. 181: 1338-1342.
- Villalobos M., Avila F. A. y Gutierrez R. M. (2008). An improved gravimetric method to determine total petroleum hydrocarbons in contaminated soils. *Water Air Soil Pollution*. 194: 151-161.
- Viñas C. M. (2005). Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos: caracterización microbiana, química y ecotoxicológica. Tesis de doctorado. Facultad de biología. Universidad de Barcelona. 352 pp.



- Weyens N., Lelie D., Taghavi S., Vangronsveld J. (2009). Phytoremediation: plant-endophyte partnerships take the challenge. *Current Opinion in Biotechnology*. 20: 248-254.
- Wöhler I. (1997). Auxin-indole derivates in soils determined by a colorimetric method. *Microbiological Research*. 152: 349-405.
- Xie C. H. y Yakota A. (2005). *Azospirillum oryzae*, a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55: 1435-1438.
- Zhuang X., Chen J., Shim H. y Bai Z. (2007). New advances in plant growth promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. 33: 406-409.



Anexo A. Resultados monitoreados durante el transcurso experimental

Anexo A.1. Tolerancia de AZm1 al diesel

A efecto de comprobar si la cepa AZm1 era tolerante al diesel, se procedió a su siembra en agar nutritivo y medio Nfb adicionando 1 mililitro de diesel, se realizaron determinaciones por triplicado. Los resultados se muestran en la Tabla A.1.

Tabla A.1. Resultados experimentales de tolerancia al diesel de *Azospirillum lipoferum*.

REPETICIÓN N	RESULTADO DESARROLLO (D) / SIN DESARROLLO (S)		TINCIÓN DE GRAM		PREPARACIÓN EN FRESCO	
	AGAR NUTRITIVO	MEDIO Nfb	(+)	(-)	(+)	(-)
1	D	D	✓		✓	
2	D	D	✓		✓	
3	D	D	✓		✓	

(+): Observación de características típicas de *A. lipoferum*

(-): Sin observación de características típicas de *A. lipoferum*



Anexo A.2. Número de UFC por mililitro

Los resultados obtenidos para AZm1, AZm3 y AZm5 se muestran en la Tabla A.2, la realización experimental consistió en tres réplicas.

Tabla A.2. Número de microorganismos por mililitro de AZm1, AZm3 y AZm5.

	REPETICIÓN	DILUCIÓN			UFC mL ⁻¹
		10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	
AZm1	1	Incontable	33	3	
	2	Incontable	13	1	
	3	Incontable	24	1	
	PROMEDIO COLONIAS	23.333			
	D.S	10.016			
AZm3	1	Incontable	56	12	
	2	Incontable	54	4	
	3	Incontable	18	4	
	PROMEDIO COLONIAS	42.666			
	D.S	21.385			
					4.27x10 ⁰⁷
AZm5	1	Incontable	57	2	
	2	Incontable	54	0	
	3	Incontable	44	0	
	PROMEDIO COLONIAS	51.670			
	D.S	6.806			
					5.17x10 ⁰⁷



Anexo A.3. Selección de semilla y cepa de *Azospirillum lipoferum*

Se presenta en la Tabla A.3 el número de microorganismos adsorbidos a *Lolium multiflorum*.

Tabla A.3. Cuenta de Azm1, AZm3 y AZm5 adsorbidos a *Lolium multiflorum*.

		DILUCIÓN			UFC mL ⁻¹
	REPETICIÓN	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	
AZm1	1	Incontable	Incontable	48	
	2	Incontable	Incontable	41	
	3	Incontable	Incontable	33	
	PROMEDIO COLONIAS	40.666			
	D.S	7.505			
AZm3	1	Incontable	incontable	22	
	2	Incontable	incontable	17	
	3	Incontable	42	10	
	PROMEDIO COLONIAS	16.333			
	D.S	6.027			1.63X10 ⁰⁶
AZm5	1	Incontable	incontable	11	
	2	Incontable	incontable	7	
	3	Incontable	58	5	
	PROMEDIO COLONIAS	7.666			
	D.S	3.055			



Anexo A.4. Porcentajes de viabilidad de *Lolium multiflorum* en las diferentes tecnologías de saneamiento.

En la Tabla A.4 se exponen los datos que se emplearon para obtener los porcentajes de sobrevivencia de *Lolium multiflorum*.

Tabla A.4. Número de plantas viables durante el desarrollo experimental de cada bloque.

TRATAMIENTO	DÍA					PROMEDIO	D.S.
	10	20	30	40	60		
TESTIGO (S+P)	18	16	19	18	16	17.4	1.231
CONTROL (S+B+P)	17	15	18	16	19	17.0	1.581
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	17	19	19	16	15	17.1	1.789
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	14	8	16	18	15	14.2	3.768
CONTROL (S+B+P+F)	12	17	17	12	16	14.8	2.588
BIOESTIMULACIÓN	15	15	15	18	15	15.6	1.342



Anexo A.5. Longitudes aéreas y radicales monitoreadas durante 60 días.

Los datos relacionados a longitudes aéreas y radicales de *Lolium multiflorum* se señalan en la Tabla A.5. Los resultados obtenidos de cada réplica (R) son el promedio de cada unidad experimental.

Tabla A.5. Longitudes aéreas y radicales de *Lolium multiflorum* de acuerdo al bloque y día correspondientes.

	LONGITUDES AÉREAS (cm)			LONGITUDES RADICALES (cm)		
	R1	R2	R3	R1	R2	R3
TESTIGO (S+P)						
DÍA 10	9.281	6.974	8.839	1.300	3.216	1.911
DÍA 20	8.294	8.912	8.881	1.889	3.187	2.962
DÍA 30	9.288	8.200	9.435	2.800	1.435	3.171
DÍA 40	8.310	4.977	9.287	2.975	1.861	3.210
DÍA 60	9.233	9.454	6.788	3.535	3.518	3.262
CONTROL (S+B+P)						
DÍA 10	9.822	6.115	6.575	1.690	1.462	1.800
DÍA 20	8.487	8.764	7.861	1.917	1.490	2.068
DÍA 30	6.730	6.610	8.447	2.723	1.866	1.213
DÍA 40	8.425	5.213	9.018	3.331	2.175	2.450
DÍA 60	9.769	6.233	9.526	3.450	2.521	1.707
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL						
DÍA 10	6.865	6.050	6.350	1.893	2.385	1.745
DÍA 20	6.285	7.047	6.417	2.515	2.553	2.631
DÍA 30	7.061	5.600	7.081	2.835	2.789	2.723
DÍA 40	7.030	3.700	5.026	2.845	3.256	2.733
DÍA 60	5.586	5.700	4.925	3.025	3.761	3.671
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA						
DÍA 10	5.462	4.618	1.200	1.788	1.909	1.667
DÍA 20	6.083	4.972	4.800	2.250	2.273	2.020
DÍA 30	6.100	5.260	4.808	2.269	2.300	2.125
DÍA 40	6.644	5.727	6.669	2.542	2.381	2.223
DÍA 60	6.780	7.500	7.936	3.370	2.440	2.554
CONTROL (S+B+P+F)						
DÍA 10	3.342	3.000	3.950	0.800	0.975	1.316
DÍA 20	3.691	3.850	4.800	1.191	1.040	1.662
DÍA 30	4.677	4.455	4.908	1.266	1.422	1.708
DÍA 40	6.777	8.675	5.275	1.866	1.675	2.030
DÍA 60	8.425	8.730	6.007	1.955	2.850	2.258
BIOESTIMULACIÓN						
DÍA 10	2.416	4.455	3.636	1.583	1.422	1.545
DÍA 20	4.677	5.322	4.457	1.933	1.611	1.669
DÍA 30	4.944	6.080	4.576	1.955	1.692	1.708
DÍA 40	5.221	6.561	4.800	2.242	2.153	2.083
DÍA 60	6.761	8.5	5.916	2.461	2.966	2.085



ANEXO A.6. Producción de AIA monitoreado a lo largo de la etapa experimental.

A continuación se muestra el gráfico correspondiente a la curva de calibración empleado para la obtención de las concentraciones de AIA. El estándar empleado consistió en AIA.

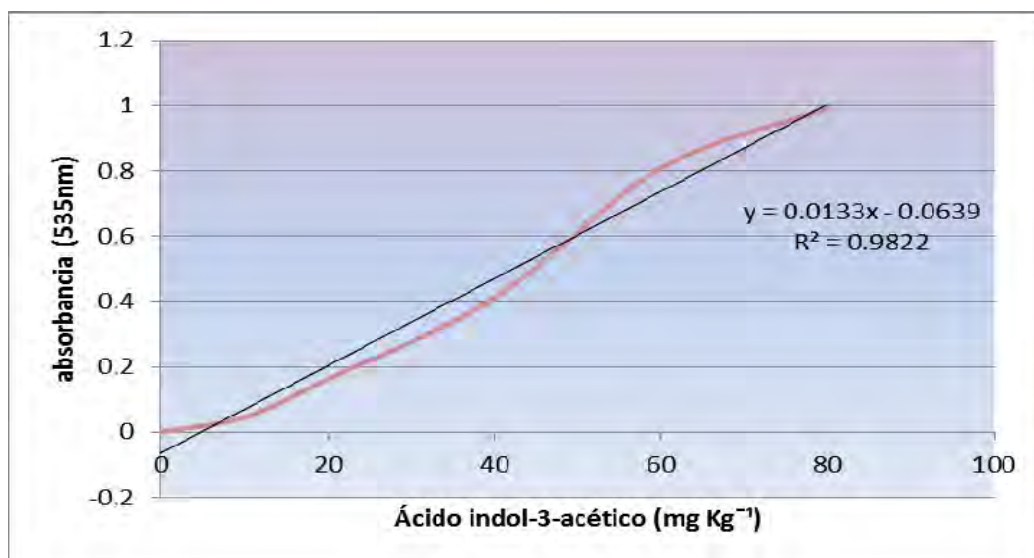


Figura A.6. Curva de calibración de ácido indol-3-acético.

En la Tabla A.6 se muestran las concentraciones de AIA de cada bloque específico.



Tabla A.6. Concentraciones de AIA durante la etapa experimental.

	CONCENTRACIONES AIA (mg Kg ⁻¹)			PROMEDIO	D.S.
	R1	R2	R3		
TESTIGO (S+P)					
DÍA 10	31.797	38.414	32.248	34.153	3.697
DÍA 20	42.549	28.939	41.947	37.812	7.689
DÍA 30	45.707	41.947	44.053	43.902	1.884
DÍA 40	38.564	38.038	56.233	44.278	10.356
DÍA 60	69.842	66.233	67.060	66.258	1.890
CONTROL (S+B+P)					
DÍA 10	24.053	20.819	17.361	20.744	3.347
DÍA 20	34.879	30.218	31.120	32.073	2.472
DÍA 30	23.075	25.406	56.383	34.995	18.594
DÍA 40	55.105	46.008	40.218	47.110	7.504
DÍA 60	78.639	57.661	62.479	66.259	10.988
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL					
DÍA 10	13.376	14.053	13.000	13.476	0.534
DÍA 20	26.233	24.579	22.248	24.353	2.002
DÍA 30	28.789	17.586	26.008	24.128	5.833
DÍA 40	27.887	27.662	24.579	26.709	1.848
DÍA 60	40.819	30.293	38.789	36.634	5.584
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA					
DÍA 10	23.376	22.549	20.969	22.298	1.222
DÍA 20	23.075	18.113	35.406	25.531	8.904
DÍA 30	32.023	33.451	31.271	32.248	1.107
DÍA 40	37.586	33.752	32.248	34.529	2.752
DÍA 60	26.609	40.444	42.098	36.383	8.505



Continúa... **Tabla A.6.** Concentraciones de AIA durante la etapa experimental.

	CONCENTRACIONES AIA (mg Kg ⁻¹)			PROMEDIO	D.S.
	R1	R2	R3		
CONTROL (S+B+P+F)					
DÍA 10	20.669	20.293	19.917	20.293	0.376
DÍA 20	31.571	29.241	22.549	27.787	4.683
DÍA 30	46.759	23.226	38.263	36.083	11.917
DÍA 40	47.737	49.090	29.165	41.997	11.134
DÍA 60	42.549	44.429	45.782	44.253	1.624
BIOESTIMULACIÓN					
DÍA 10	17.211	15.932	16.534	16.559	0.639
DÍA 20	25.632	27.436	28.940	27.336	1.656
DÍA 30	22.398	26.233	31.120	26.584	4.372
DÍA 40	33.526	31.120	33.526	31.797	1.389
DÍA 60	55.782	39.842	46.534	47.386	8.004



ANEXO A.7 Concentraciones de hidrocarburos fracción media

En la Tabla A.7 se señalan las concentraciones de hidrocarburos fracción media obtenidas durante el transcurso experimental mediante método gravimétrico.

Tabla A.7. Concentraciones de hidrocarburos fracción media.

	CONCENTRACIÓN (mg kg⁻¹)			
CONTROL (S+D+B)	R1	R2	PROMEDIO	D.S.
DÍA 10	16 530	18 050	17 290	1 074.802
DÍA 20	15 080	16 080	15 580	707.107
DÍA 30	14 810	13 440	14 125	968.736
DÍA 40	10 960	9 090	10 025	1 322.289
DÍA 60	9 820	9 140	9 480	480.833
ATENUACIÓN NATURAL	R1	R2	PROMEDIO	D.S.
DÍA 10	15 780	16 440	16 110	466.690
DÍA 20	16 010	15 340	15 675	473.762
DÍA 30	13 340	14 040	13 690	494.975
DÍA 40	10 960	10 190	10 575	544.472
DÍA 60	10 680	11 180	10 930	353.553
FITORREMIEDIACIÓN CONVENCIONAL	R1	R2	PROMEDIO	D.S.
DÍA 10	17 700	17 070	17 385	445.477
DÍA 20	13 240	14 570	13 905	940.452
DÍA 30	11 200	12 570	11 885	968.736
DÍA 40	8 560	10 500	9 530	1 371.787
DÍA 60	6 030	6 480	6 255	318.198



Continúa... **Tabla A.7.** Concentraciones de hidrocarburos fracción media.

	CONCENTRACIÓN (mg kg⁻¹)			
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	R1	R2	PROMEDIO	D.S.
DÍA 10	16 000	15 880	15 940	84.853
DÍA 20	13 020	12 680	12 850	240.416
DÍA 30	10 590	9 820	10 205	544.472
DÍA 40	5 520	6 220	5 870	494.975
DÍA 60	5 980	4 540	5 260	1 018.233
BIOESTIMULACIÓN	R1	R2	PROMEDIO	D.S.
DÍA 10	16 080	14 300	15 190	1 004.092
DÍA 20	7 950	8 150	8 050	141.421
DÍA 30	7 850	5 870	6 860	1 400.071
DÍA 40	5 390	7 600	6 495	1 562.706
DÍA 60	3 760	5 470	4 615	1 209.153



Anexo A.8 Determinación de fósforo soluble en bicarbonato de sodio usando ácido ascórbico como agente reductor

La Figura A.8 muestra la curva de calibración empleada para la obtención de las concentraciones de fósforo. La solución estándar correspondió a KH_2PO_4 previamente seco a $105\text{ }^\circ\text{C}$.

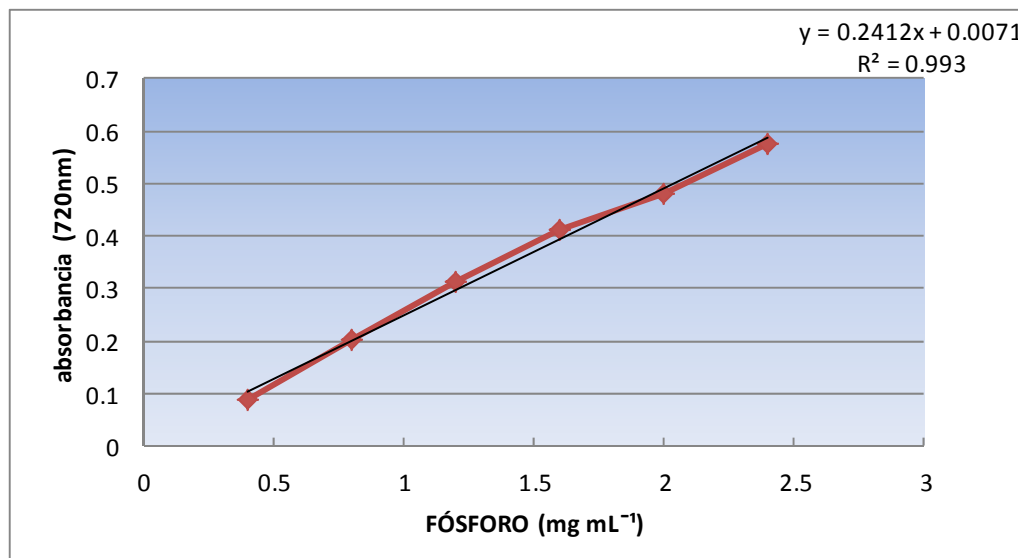


Figura A.8. Curva de calibración empleando KH_2PO_4 como estándar.

La Tabla A.8 resume los valores obtenidos relacionados con el parámetro fósforo.



Tabla A.8. Valores de fósforo de acuerdo al bloque y día correspondientes.

DÍA 10					
CONTROL (S+D)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	TESTIGO (S+P)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	CONTROL (S+B+D)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)
R1	0.602	R1	0.737	R1	0.629
R2	0.599	R2	0.776	R2	0.607
R3	0.618	R3	0.784	R3	0.624
PROMEDIO	0.607	PROMEDIO	0.766	PROMEDIO	0.621
D.S.	0.010	D.S.	0.025	D.S.	0.012
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	CONTROL (S+B+P)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)
R1	0.491	R1	0.712	R1	0.508
R2	0.491	R2	0.779	R2	0.596
R3	0.477	R3	0.806	R3	0.605
PROMEDIO	0.487	PROMEDIO	0.766	PROMEDIO	0.570
D.S.	0.008	D.S.	0.048	D.S.	0.054
BIOESTIMULACIÓN	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)				
R1	0.569				
R2	0.569				
R3	0.574				
PROMEDIO	0.571				
D.S.	0.003				



Continúa... **Tabla A.8.** Valores de fósforo de acuerdo al bloque y día correspondientes.

DÍA 20					
CONTROL (S+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	TESTIGO (S+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.770	R1	1.011	R1	2.072
R2	0.773	R2	1.005	R2	1.044
R3	0.776	R3	1.022	R3	0.779
PROMEDIO	0.774	PROMEDIO	1.013	PROMEDIO	1.299
D.S.	0.003	D.S.	0.008	D.S.	0.683
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.820	R1	0.942	R1	0.740
R2	0.853	R2	0.967	R2	0.668
R3	0.873	R3	0.944	R3	0.696
PROMEDIO	0.849	PROMEDIO	0.951	PROMEDIO	0.702
D.S.	0.027	D.S.	0.013	D.S.	0.036
BIOESTIMULACIÓN	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)				
R1	0.682				
R2	0.734				
R3	0.723				
PROMEDIO	0.714				
D.S.	0.027				



Continúa... **Tabla A.8.** Valores de fósforo de acuerdo al bloque y día correspondientes.

DÍA 30					
CONTROL (S+D)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	TESTIGO (S+P)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	CONTROL (S+B+D)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)
R1	0.605	R1	0.732	R1	0.417
R2	0.546	R2	0.588	R2	0.516
R3	0.541	R3	0.751	R3	0.516
PROMEDIO	0.564	PROMEDIO	0.691	PROMEDIO	0.485
D.S.	0.0356	D.S.	0.089	D.S.	0.057
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	CONTROL (S+B+P)	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)	FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)
R1	0.740	R1	0.781	R1	0.618
R2	0.544	R2	0.762	R2	0.652
R3	0.544	R3	0.765	R3	0.649
PROMEDIO	0.612	PROMEDIO	0.770	PROMEDIO	0.640
D.S.	0.113	D.S.	0.0102	D.S.	0.019
BIOESTIMULACIÓN	FÓSFORO (mg Kg⁻¹)				
R1	0.654				
R2	0.704				
R3	0.699				
PROMEDIO	0.686				
D.S.	0.0275				



Continúa... **Tabla A.8.** Valores de fósforo de acuerdo al bloque y día correspondientes.

DÍA 40					
CONTROL (S+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	TESTIGO (S+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.665	R1	0.889	R1	0.593
R2	0.674	R2	0.889	R2	0.596
R3	0.671	R3	0.909	R3	0.593
PROMEDIO	0.670	PROMEDIO	0.896	PROMEDIO	0.595
D.S.	0.004	D.S.	0.012	D.S.	0.002
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.671	R1	1.005	R1	0.795
R2	0.665	R2	0.903	R2	0.792
R3	0.663	R3	0.834	R3	0.748
PROMEDIO	0.667	PROMEDIO	0.915	PROMEDIO	0.779
D.S.	0.004	D.S.	0.086	D.S.	0.026
BIOESTIMULACIÓN	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)				
R1	0.997				
R2	1.069				
PROMEDIO	1.033				
D.S.	0.036				



Continúa... **Tabla A.8.** Valores de fósforo de acuerdo al bloque y día correspondientes.

DÍA 60					
CONTROL (S+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	TESTIGO (S+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+D)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.839	R1	1.088	R1	0.892
R2	0.834	R2	1.099	R2	0.776
R3	0.812	R3	1.080	R3	0.779
PROMEDIO	0.829	PROMEDIO	1.090	PROMEDIO	0.816
D.S.	0.014	D.S.	0.009	D.S.	0.066
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	CONTROL (S+B+P)	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)	FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)
R1	0.931	R1	1.077	R1	0.909
R2	0.920	R2	1.041	R2	0.925
R3	0.958	R3	1.044	R3	0.920
PROMEDIO	0.937	PROMEDIO	1.055	PROMEDIO	0.918
D.S.	0.019	D.S.	0.019	D.S.	0.008
BIOESTIMULACIÓN	FÓSFORO (mg Kg ⁻¹)				
R1	1.265				
R2	1.279				
R3	1.287				
PROMEDIO	1.278				
D.S.	0.011				



Anexo B. Análisis estadístico

CONCENTRACIONES DE HIDROCARBUROS FRACCIÓN MEDIA (HFM)

ANOVA CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 10

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4984737.500	3	1661579.167	3.310	.139
Within Groups	2007650.000	4	501912.500		
Total	6992387.500	7			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 10

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
BIOESTIMULACIÓN	2	15190.0000	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	2	15940.0000	15940.0000
ATENUACIÓN NATURAL	2	16110.0000	16110.0000
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	2		17385.0000
Sig.		.270	.116

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ANOVA CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 20

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	63844100.000	3	21281366.667	71.733	.001
Within Groups	1186700.000	4	296675.000		
Total	65030800.000	7			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 20

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
BIOESTIMULACIÓN	2	8050.0000		
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	2		12850.0000	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	2		13905.0000	
ATENUACIÓN NATURAL	2			15675.0000
Sig.		1.000	.125	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.



ANOVA CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 30

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	50612537.500	3	16870845.833	19.831	.007
Within Groups	3402850.000	4	850712.500		
Total	54015387.500	7			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 30

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	1
BIOESTIMULACIÓN	2		6860.0000		
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	2			10230.0000	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	2			11885.0000	11885.0000
ATENUACIÓN NATURAL	2				13690.0000
Sig.			1.000	.147	.122

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

ANOVA CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 40

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	31436450.000	3	10478816.667	8.615	.032
Within Groups	4865300.000	4	1216325.000		
Total	36301750.000	7			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 40

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	1
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	2		5870.0000		
BIOESTIMULACIÓN	2		6495.0000	6495.0000	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	2			9530.0000	9530.0000
ATENUACIÓN NATURAL	2				10575.0000
Sig.			.601	.051	.397

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.



ANOVA CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 60

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	48989700.000	3	16329900.000	23.970	.005
Within Groups	2725100.000	4	681275.000		
Total	51714800.000	7			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CONCENTRACIÓN DE HFM AL DÍA 60

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
BIOESTIMULACIÓN	2	4615.0000	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	2	5260.0000	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	2	6255.0000	
ATENUACIÓN NATURAL	2		10930.0000
Sig.		.123	1.000

PORCENTAJES DE SOBREVIVENCIA

ANOVA RELACIONADA CON LOS PORCENTAJES DE SOBREVIVENCIA

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1234.483	5	246.897	1.778	.156
Within Groups	3333.340	24	138.889		
Total	4567.823	29			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN PARA PORCENTAJES DE SOBREVIVENCIA

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05
		1
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	5	74.7200
SBPF	5	77.9200
BIOESTIMULACIÓN	5	82.0600
SBP	5	89.4600
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	5	90.5200
SP	5	90.9400
Sig.		.065

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 5.000.



LONGITUDES RADICALES

ANOVA LONGITUDES RADICALES AL DÍA 10

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.534	5	.507	2.027	.147
Within Groups	3.001	12	.250		
Total	5.535	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 10

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	1.18300	
SP	3	1.46433	1.46433
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	1.60600	1.60600
SBP	3	1.96900	1.96900
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	2.06967	2.06967
BIOESTIMULACIÓN	3		2.27100
Sig.		.071	.096

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA LONGITUDES RADICALES AL DÍA 20

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.576	5	.515	2.029	.146
Within Groups	3.046	12	.254		
Total	5.622	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 20

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	1.26867	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	1.69533	1.69533
SP	3	1.72633	1.72633
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	2.08433	2.08433
BIOESTIMULACIÓN	3		2.30333
SBP	3		2.33733
Sig.		.090	.179

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA LONGITUDES RADICALES AL DÍA 30

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.386	5	.677	2.905	.060
Within Groups	2.797	12	.233		
Total	6.183	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 30

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	2.00467	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	2.16067	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	2.40200	2.40200
SP	3	2.58867	2.58867
BIOESTIMULACIÓN	3		3.11333
SBP	3		3.13367
Sig.		.194	.110

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA LONGITUDES RADICALES AL DÍA 40

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.755	5	.751	4.251	.019
Within Groups	2.120	12	.177		
Total	5.874	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 40

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	1.53500	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	1.87567	
SP	3	2.20200	2.20200
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	2.25233	2.25233
SBP	3		2.74300
BIOESTIMULACIÓN	3		2.84600
Sig.		.076	.107

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA LONGITUDES RADICALES AL DÍA 60

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.568	5	.514	1.668	.217
Within Groups	3.694	12	.308		
Total	6.262	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 60

	N	Subset for alpha = .05
TECNOLOGÍA	1	1
SBPF	3	2.32500
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	2.36567
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	2.56333
SP	3	2.63933
SBP	3	3.22867
BIOESTIMULACIÓN	3	3.25400
Sig.		.089

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



LONGITUDES AÉREAS

ANOVA LONGITUDES AÉREAS AL DÍA 10

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	41.792	5	8.358	2.213	.120
Within Groups	45.314	12	3.776		
Total	87.107	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 10

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	3.54700	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	3.76000	3.76000
SBP	3	4.20467	4.20467
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	4.48767	4.48767
BIOESTIMULACIÓN	3	6.73767	6.73767
SP	3		7.52567
Sig.		.091	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA LONGITUDES AÉREAS AL DÍA 20

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	40.177	5	8.035	6.699	.003
Within Groups	14.394	12	1.200		
Total	54.571	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 20

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	4.28967	
SBP	3	4.64467	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	5.40400	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	6.36000	6.36000
BIOESTIMULACIÓN	3		7.62233
SP	3		8.36467
Sig.		.052	.053

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA LONGITUDES AÉREAS AL DÍA 30

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	38.496	5	7.699	5.381	.008
Within Groups	17.171	12	1.431		
Total	55.666	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 30

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
SBPF	3	4.40033	
SBP	3	5.25267	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	5.53933	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	6.42167	6.42167
BIOESTIMULACIÓN	3		7.95467
SP	3		8.49233
Sig.		.079	.066

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA LONGITUDES AÉREAS AL DÍA 40

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23.630	5	4.726	3.809	.027
Within Groups	14.890	12	1.241		
Total	38.521	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 40

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	3	1
SBP	3	5.39433		
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	6.00967	6.00967	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	6.58300	6.58300	6.58300
SBPF	3	6.90933	6.90933	6.90933
BIOESTIMULACIÓN	3		8.12800	8.12800
SP	3			8.69600
Sig.		.148	.051	.052

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA LONGITUDES AÉREAS AL DÍA 60

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.099	5	3.820	1.937	.161
Within Groups	23.664	12	1.972		
Total	42.763	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN DÍA 60

	N	Subset for alpha = .05
TECNOLOGÍA	1	1
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	6.51733
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	6.58100
SBP	3	6.61300
SBPF	3	7.35433
BIOESTIMULACIÓN	3	8.75667
SP	3	8.97500
Sig.		.077



PRODUCCIÓN DE AIA

ANOVA PRODUCCIÓN DE AIA AL DÍA 10

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	753.578	5	150.716	33.247	.000
Within Groups	54.398	12	4.533		
Total	807.976	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 10

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05			
	1	2	3	4	1
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	13.47633			
BIOESTIMULACIÓN SBPF	3	16.55900	16.55900		
SBP	3		20.29300	20.29300	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3			20.74433	
SP	3			22.29800	
Sig.		.102	.053	.294	34.15300 1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA PRODUCCIÓN DE AIA AL DÍA 20

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	374.447	5	74.889	2.594	.082
Within Groups	346.437	12	28.870		
Total	720.884	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 20

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	24.35333	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	25.53133	
BIOESTIMULACIÓN SBPF	3	27.33600	
SBP	3	27.78700	
SP	3	32.07233	32.07233
Sig.		.134	.215

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000



ANOVA PRODUCCIÓN DE AIA AL DÍA 30

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	757.906	5	151.581	1.667	.217
Within Groups	1091.342	12	90.945		
Total	1849.248	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 30

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05		
	1	2	1	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	24.12767		
BIOESTIMULACIÓN	3	26.58367	26.58367	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	32.24833	32.24833	
SBP	3	34.95467	34.95467	
SBPF	3	36.08267	36.08267	
SP	3		43.90233	
Sig.		.186	.065	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA PRODUCCIÓN DE AIA AL DÍA 40

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	917.067	5	183.413	3.663	.030
Within Groups	600.906	12	50.075		
Total	1517.973	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 40

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05			
	1	2	3	1	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	26.70933			
BIOESTIMULACIÓN	3	32.72400	32.72400		
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	34.52867	34.52867	34.52867	
SBPF	3		41.99733	41.99733	
SP	3		44.27833	44.27833	
SBP	3			47.11033	
Sig.		.222	.088	.066	

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA PRODUCCIÓN DE AIA AL DÍA 60

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2944.895	5	588.979	11.997	.000
Within Groups	589.119	12	49.093		
Total	3534.015	17			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 60

TECNOLOGIA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	36.38367	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	36.63367	
SBPF	3	44.25333	
BIOESTIMULACIÓN	3	47.38600	
SBP	3		66.25800
SP	3		67.71167
Sig.		.099	.804

aUses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

NITRÓGENO TOTAL KJENDAHL

ANOVA CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL KJENDAHL

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.007	6	.001	1.274	.301
Within Groups	.024	28	.001		
Total	.031	34			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN CUANTIFICACIÓN DE NITRÓGENO TOTAL KJENDAHL

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05
	1	1
S+B	5	.025820
ATENUACIÓN NATURAL	5	.029640
S+P	5	.031820
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	5	.034040
S+B+P	5	.048560
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	5	.049400
BIOESTIMULACIÓN	5	.067480
Sig.		.059



CONCENTRACIONES DE FÓSFORO

ANOVA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO AL DÍA 10

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.432	6	.072	79.724	.000
Within Groups	.013	14	.001		
Total	.444	20			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 10

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05			
	1	2	3	4	1
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	.487102			
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3		.570020		
BIOESTIMULACIÓN	3		.570942		
ATENUACIÓN NATURAL	3		.606873		
S+P	3			.766261	
S+B+P	3			.766261	
S+B+D	3				.931039
Sig.		1.000	.175	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO AL DÍA 20

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.801	6	.134	1.989	.136
Within Groups	.940	14	.067		
Total	1.741	20			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 20

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05	
	1	2	1
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3	.701769	
BIOESTIMULACIÓN	3	.713746	
ATENUACIÓN NATURAL	3	.773632	
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3	.849180	.849180
S+B+P	3	.951446	.951446
S+P	3	1.013175	1.013175
S+B+D	3		1.298784
Sig.		.207	.069

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.



ANOVA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO AL DÍA 30

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.158	6	.026	6.938	.001
Within Groups	.053	14	.004		
Total	.211	20			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 30

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	1
S+B+D	3		.483416			
ATENUACIÓN NATURAL	3		.564492	.564492		
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3			.609637	.609637	
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3			.640041	.640041	
BIOESTIMULACIÓN	3				.686107	.686107
S+P	3				.690713	.690713
S+B+P	3					.769947
Sig.			.129	.175	.158	.135

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ANOVA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO AL DÍA 40

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.401	6	.067	45.280	.000
Within Groups	.019	13	.001		
Total	.420	19			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 40

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	1
S+B+D	3		.594896				
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3			.666759			
ATENUACIÓN NATURAL	3			.670444			
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3				.779160		
S+P	3					.896167	
S+B+P	3					.914594	
BIOESTIMULACIÓN	2						1.033444
Sig.			1.000	.911	1.000	.580	1.000



ANOVA CUANTIFICACIÓN DE FÓSFORO AL DÍA 60

	Sum of Squares	Df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.483	6	.081	99.061	.000
Within Groups	.011	14	.001		
Total	.494	20			

PRUEBA DE RANGOS MÚLTIPLES DE DUNCAN AL DÍA 60

TECNOLOGÍA	N	Subset for alpha = .05				
		1	2	3	4	1
S+B+D	3		.816013			
ATENUACIÓN NATURAL	3		.828911			
FITORREMEDIACIÓN ASISTIDA	3			.918279		
FITORREMEDIACIÓN CONVENCIONAL	3			.936705		
S+B+P	3				1.054634	
S+P	3				1.089644	
BIOESTIMULACIÓN	3					1.277594
Sig.			.588	.442	.155	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

