



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA

DE MÉXICO

FACULTAD DE  
CIENCIAS

---

---

**“EVALUACION DE FITORREMEDIACIÓN EN SUELOS  
CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS,  
UTILIZANDO TRES ESPECIES.”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**BIÓLOGO**

**P R E S E N T A :**



**CARLOS HUMBERTO JUAREZ MENDEZ**

**TUTOR**

**M. EN C. JUAN ANTONIO ZERMEÑO EGUIA-LIS**

2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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.

## Resumen.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la eficiencia de degradación de hidrocarburos en suelos contaminados, empleando tres especies de plantas (*Cyperus elegans*, *Cyperus odoratus* y *Paspalum virgatum*) que se han adaptado a las condiciones de contaminación. Se evaluó la tolerancia de las tres plantas en un suelo contaminado con 221,347 ppm de hidrocarburos totales del petróleo (HTP). En el caso de *C. elegans*, para evaluar la dosis de sobrevivencia, se evaluó en un rango de concentración de 297 ppm a 221,347 ppm. Se realizaron diferentes diluciones del suelo contaminado y no contaminado, cuantificando el efecto provocado en las tres especies, durante 14 semanas, usando los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento, longitud de la parte aérea, longitud radical, peso seco y volumen radical. Se determinó (diluciones 5%, 10% y 25%) el efecto de la fitorremediación, a nivel de la rizosfera, sobre los HTP, el pH y los microorganismos degradadores de hidrocarburos. Para el proceso de fitorremediación se realizó un experimento factorial 5 X 3 en una distribución completamente al azar. Los factores fueron diluciones de suelo (0, 5%, 10%, 25% y 50%) y tres tipos de plantas (*C. elegans*, *C. odoratus* y *P. virgatum*), con cuatro repeticiones, se realizó análisis de varianzas para ver diferencias entre tratamientos (ANOVA y prueba de Tukey, software SPSS v. 10). Se utilizó una matriz para establecer la planta más eficiente, utilizando los parámetros antes mencionados. Las plantas fueron afectadas por la presencia de hidrocarburo ( $p < 0.05$ ) en la longitud total de la parte aérea, longitud radical, volumen radical y biomasa en peso seco. *P. virgatum* presentó mayor degradación de hidrocarburos en promedio con un 22.82%, en la dilución 5%. *P. virgatum*, *C. odoratus* y *C. elegans* toleran altas concentraciones de hidrocarburo obteniendo buen crecimiento hasta 22,712 ppm de HTP. La presencia de las plantas favoreció el desarrollo de microorganismos degradadores de hidrocarburo. *C. elegans* presentó un aumento considerable de microorganismos degradadores de hidrocarburos asociados a su rizosfera. *C. elegans* y *P. virgatum* fueron las más eficientes de acuerdo a los resultados de la matriz.

**Palabras clave:** fitorremediación, suelos contaminados, *Cyperus elegans*, *Cyperus odoratus*, *Paspalum virgatum*, hidrocarburos, biorremediación.

## **Agradecimientos.**

Esta tesis fue apoyada por el programa de formación de personal del **Instituto Mexicano del Petróleo** en el proyecto F.20713

### **A mis asesores:**

M. en C. Juan Antonio Zermeño Eguia- Lis  
Dra. Myriam A. Amezcua Allieri  
Dr. Raúl Uribe Hernández  
M. en C. Nelly Diego Pérez  
M. en C. Iván E. Reyes Solis

### **A mis compañeros de laboratorio:**

M. en I. Alejandro Montes de Oca García.  
Dr. Benjamín Chávez  
M. en C. Gloria Avelino y Zapata.  
M. en C. Victor Emigdio Martínez Martínez  
Ing. Jesús Ochoa  
Ing. Alejandro Olvera Cortés  
Dra. Lucia Salazar Coria  
M. en C. Marco Antonio Tenorio  
Dr. Gerardo Martínez Villa.  
Sra. Ruth Pérez  
Sr. José García

### **A la Fac. de Ciencias UNAM:**

Dr. Adolfo Andrade Cetto.  
Biól. Patricia Olguin Santos.  
Dra. Pilar Ortega Larrocea.

### **A la Fac. de Quimica:**

Dra. Carmen Duran de Bazúa.

**Dedicatoria.**

**A mis padres.**

**A mis hermanos y hermanas.**

Guillermo Juárez Méndez  
Chema Juárez Delgado  
Remedios Juárez Delgado  
Fam. Bautista Juárez.  
Fam. Rodríguez Javier.

**A mis maestros y amigos.**

## Índice.

1	Introducción.....	7
1.1	El petróleo.....	8
1.2	Impacto ambiental y contaminación por el uso del petróleo.....	9
1.3	El suelo.....	12
1.4.1	La rizosfera.....	15
1.4.2	Efecto rizosfera.....	15
1.5	La biodegradación.....	17
1.5.1	Principales mecanismos de la biodegradación.....	19
1.5.2	La bioremediación <i>in situ</i> .....	21
1.5.3	La fitorremediación.....	22
1.5.4	La biorremediación <i>ex situ</i> .....	27
2	Antecedentes.....	29
2.1	Estudios de fitorremediación en México.....	31
2.2	Estudios de toxicidad.....	32
3	Objetivo.....	35
3.1	Objetivo general.....	35
3.2	Objetivos particulares.....	35
4	Hipótesis experimental.....	36
5	Material y métodos.....	37
5.1	Obtención de la muestra del suelo.....	37
5.2	Obtención de plantas.....	38
5.3	Preparación de suelo.....	38
5.4	Diseño experimental.....	39
5.4.1	Tolerancia de las plantas seleccionadas.....	39
5.4.2	Fitorremediación de las plantas seleccionadas.....	40
5.5	Análisis de las plantas.....	41
5.6	Análisis del suelo.....	41
5.7	Cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).....	42
a)	Método gravimétrico 3540 de la EPA.....	42
b)	Método IMP-QA-620.....	42
5.8	Cuantificación de microorganismo degradadores de hidrocarburo en suelo por el Numero Más Probable (NMP).....	44

5.9 Descripción de la matriz para evaluar la eficiencia de las plantas.....	46
6 Descripción de las especies vegetales seleccionadas.....	47
7 Resultados y discusión.....	53
7.1 Caracterización fisicoquímica y microbiana de los suelos utilizados.....	55
7.2 Obtención de los índices de germinación de las semillas de las plantas.....	57
7.3 Efecto de los hidrocarburos en el suelo sobre la mortalidad de las plantas.....	58
7.4 Tolerancia de <i>Cyperus elegans</i> a diferentes diluciones de hidrocarburo en suelos contaminados.....	61
7.5 Velocidad de crecimiento y longitud total de las plantas seleccionadas en suelos contaminados a diferentes concentraciones de HTP.....	62
7.6 Longitud radical (LR).....	70
7.7 Volumen radical (VR).....	74
7.8 Peso seco (PS).....	79
7.9 HTP.....	83
7.10 NMP.....	87
7.11 Potencial hidrógeno (pH) .....	91
7.12 Matriz de resultados de las tres plantas.....	95
7.13 Discusión general.....	96
8 Conclusiones.....	100
9 Bibliografía.....	102

## **1. Introducción.**

La industria petrolera, en el ámbito mundial, está considerada como de alto riesgo ambiental. Lo anterior debido a que las actividades de exploración, extracción, transformación y transporte de los hidrocarburos tienen intrínsecamente un riesgo latente de ocurrencias de fugas accidentales o derrames que conllevan a la contaminación del suelo, del aire o de cuerpos de agua (García, 2000).

La contaminación se define como la presencia en el ambiente de uno o más contaminantes o de cualquier combinación de ellos que cause desequilibrio ecológico. Un contaminante es toda materia o energía en cualesquiera de sus estados físicos y formas, que al incorporarse o actuar en la atmósfera, agua, suelo, flora, fauna o cualquier elemento natural, altere o modifique su composición y condición natural (LEGEEPA, 1999).

México posee considerables reservas de petróleo por lo que ocupa el sexto lugar como productor mundial de petróleo crudo y el octavo como productor de gas natural, situación que ha desempeñado un papel crucial en su desarrollo económico (OCDE, 1998).

En los últimos años Petróleos Mexicanos ( PEMEX), la empresa más grande y la principal de México, ha tenido la urgencia de atender demandas sociales y legales en la restauración de sitios contaminados por las mismas actividades como consecuencia de la explotación de los yacimientos (Gallegos *et al.*, 2002).

## 1.1 El petróleo.

El problema de la génesis del petróleo ha sido, por mucho tiempo, un tópico de interés para investigación. Se sabe que la formación del petróleo esta asociada al desarrollo de rocas sedimentarias, depositadas en ambientes marinos o próximos al mar, como resultado de procesos de descomposición de organismos de origen vegetal y animal, que fueron comprimidos por altas presiones y calor, dando origen al petróleo y al gas natural que en tiempos remotos quedaron incorporados en esos depósitos (IMP, 2003).

El petróleo es una mezcla en la que coexisten, las fases: sólida, líquida y gas. El petróleo crudo es de color oscuro, olor fuerte y penetrante, inflamable y viscoso. Sus componentes básicos varían de 82% a 87% de carbono, 12% a 15% de hidrógeno, 0.1% a 5% de azufre y pequeñas cantidades de impurezas (Morrison, 1998). Otros elementos del petróleo son: oxígeno, azufre, nitrógeno y metales (hierro, níquel, vanadio) en pequeñas cantidades (Hoffman *et al.*, 2003). El petróleo crudo varía en composición química, color, viscosidad, peso específico, y otras propiedades físicas. Partiendo de la estructura, los hidrocarburos, se dividen en dos clases principales: alifáticos y aromáticos policíclicos (HAP). Los primeros se subdividen en familias: alcanos, alquenos, alquinos y sus análogos cíclicos (cicloalcanos, cicloalquenos, entre otros). Los alifáticos son de cadena abierta, lineal o ramificada y los cíclicos que se le asemejan. Los compuestos aromáticos se dividen en monoaromáticos como el benceno, tolueno, xileno y los poliaromáticos como el naftaleno, antraceno, fenantreno, benzo(a)pireno, entre otros (Morrison, 1998).

Las principales fracciones que componen al petróleo crudo según Morrison, (1998) se muestran a continuación (tabla 1).

**Tabla 1. Fracciones que componen al petróleo crudo.**

Fracción	Temperatura de destilación °C	Átomos de carbono
Gas	<20°C	C <sub>1</sub> -C <sub>4</sub>
Éter del petróleo	20-60°C	C <sub>5</sub> -C <sub>6</sub>
Nafta ligera	60-100°C	C <sub>6</sub> -C <sub>7</sub>
Gasolina	40-205°C	C <sub>5</sub> -C <sub>10</sub> y cicloalcanos
Queroseno	175-325°C	C <sub>12</sub> -C <sub>18</sub> y aromáticos
Gasóleo	>275°C	C <sub>12</sub> y superiores
Aceites lubricantes	Líquidos no volátiles	De cadenas largas con estructuras cíclicas.
Asfalto o coque del petróleo	Sólidos no volátiles	Estructuras policíclicas.

## 1.2 Impacto ambiental y contaminación por el uso del petróleo.

Se tiene noticia de que en otro tiempo, los árabes y los hebreos empleaban el petróleo con fines medicinales. En México los antiguos pobladores tenían conocimiento de esta sustancia, pues fue empleada de diversas formas entre las cuales se cuenta la reparación de embarcaciones para la navegación por los ríos haciendo uso de sus propiedades impermeabilizantes (IMP, 2003).

El procesamiento del petróleo crudo y del gas asociado se ha incrementado a escala mundial en los últimos años como un resultado del crecimiento de la población que

demanda mayor cantidad de combustibles, lubricantes y del desarrollo de tecnologías que permiten el procesamiento de los hidrocarburos para la generación de productos de alto valor agregado de origen petroquímico (IMP, 2003). La exploración y producción de petróleo y gas natural comenzó hace más de 100 años cuando se encontró un yacimiento en la costa de California. Durante la década de los treinta, y después de la Primera Guerra Mundial, los principales campos de producción estuvieron localizados en Estados Unidos, Venezuela y en Arabia Saudita. El Medio Oriente se encuentran las mayores reservas de petróleo, en una proporción muy inferior se encuentra Norteamérica y Sudamérica, donde el mayor número de reservas lo tiene Venezuela. Se ha encontrado petróleo en todos los continentes excepto en la Antártida (Jiménez, 2001).

El primer pozo petrolero perforado en México fue en 1869, en el norte del estado de Veracruz. La primera perforación marina ocurrió en 1959 junto a la laguna del Carmen en el Estado de Tabasco (Álvarez, 1978).

La obtención de hidrocarburos en México y el deterioro ambiental que le es inherente abarcan grandes extensiones del territorio nacional, concentrándose en los estados de Veracruz, Tabasco, Campeche, sur de Tamaulipas y norte de Chiapas. La producción nacional de petróleo crudo se realiza mayoritariamente en la región marina del Golfo de Campeche, la cual aporta el 71%, seguida de la región sur, con el 24.5% y por la región norte con el 3.7%. En México, el alto consumo del petróleo hace que, paralelamente a la creación de centros de explotación o de refinación, se generen asentamientos humanos con sus correspondientes demandas de servicios y generación de aguas residuales y basura. Al no estar preparada la zona para el alto consumo del petróleo, la alteración del medio va en

aumento junto con las afectaciones generadas por la propia planta industrial (las aguas residuales industriales, humos, descargas gaseosas, mal aspecto y ruido) (Jiménez, 2001).

Un ejemplo del daño ambiental por el petróleo fue la refinería de Minatitlán la cual inició sus operaciones en 1909, en el bajo río Coatzacoalcos el cual sufrió sus impactos debido a procesos de refinación y transporte de los productos petroleros. Amplias zonas pantanosas aledañas a la refinería se utilizaron como trampas de desechos. Tal es el caso del Pantano de Santa Alejandrina, donde durante décadas se vertieron cantidades masivas de hidrocarburos. Accidentes, descuido en las tareas de carga y limpieza de buques y otras operaciones, como la de descargar las aguas de enfriamiento de la refinería en el río, hacen del bajo Coatzacoalcos una zona fuertemente contaminada por una mezcla compleja de petróleo, álcalis, fenoles, sulfitos y otras sustancias tóxicas (Toledo, 1983).

Desde sus comienzos y hasta la década de los años 50, las explotaciones petrolíferas se limitaron a tierra firme; actualmente el 85% de la producción mundial procede de dicha fuente. A principios de los setenta cerca del 35% del petróleo contaminante en el medio ambiente marino, se originó de derrames y descargas relacionadas al transporte marino; el resto viene de producciones de gas y petróleo costa afuera, descargas industriales y municipales, desechos a la atmósfera y filtración natural (Jiménez, 2001).

Los derrames de petróleo provocan daños genéticos y muerte de manglares, pastos marinos, algas intermareales, humedales y plantas terrestres. También incrementan o reducen la biomasa y actividad fotosintética de comunidades del fitoplancton, al reducir la cantidad de luz, alterando el pH, disminuyendo la cantidad de oxígeno, disminuyendo la disponibilidad

de alimento (Hoffman *et al.*, 2003). Algunos de los compuestos del petróleo son solubles en el agua. Los más detectados en aguas subterráneas son el benceno, toluenos y xilenos y en cantidades menores los éteres, alcoholes, naftaleno y etilbenceno (Arizabalo y Díaz, 1991). Los HAP afectan a los organismos a través de la acción tóxica sistémica o carcinogénica. Los mecanismos de toxicidad pueden interferir con las funciones del sistema enzimático de la membrana celular, los HAP no metabolizados completamente en los animales tales como el epóxidos y dihidrodioles al unirse a proteínas de los diferentes organelos celulares o al DNA conduciendo a mutaciones, malformaciones, tumores y cáncer (Hoffman *et al.*, 2003). En las plantas terrestres el contacto de la raíz con hidrocarburos de bajo punto de ebullición disuelve a los lípidos de la membrana celular radical. En general los hidrocarburos disminuyen en orden de toxicidad, conforme disminuye su peso molecular: monoaromáticos > oleofinas > naftalenos > parafinas. Los efectos de los hidrocarburos dependen de la cantidad y estructura química de éstos, el tipo del suelo y de la especie de planta (Wise y Trantolo, 1994).

### **1.3 El suelo**

El suelo es un cuerpo natural con desarrollo constante en espacio y tiempo, situado en la corteza terrestre, constituido por tres fases: líquida (solución del suelo), gaseosa y sólida (materiales minerales y orgánicos); que sustenta vegetación (figura 1) y se forma por la interacción continua y simultánea del material a partir del cual se origina, clima imperante, tipo de vegetación, fauna propia de la región y de las condiciones particulares del relieve (Sommer y Cramer, 1998).



**Figura 1. Perfil de un suelo.**

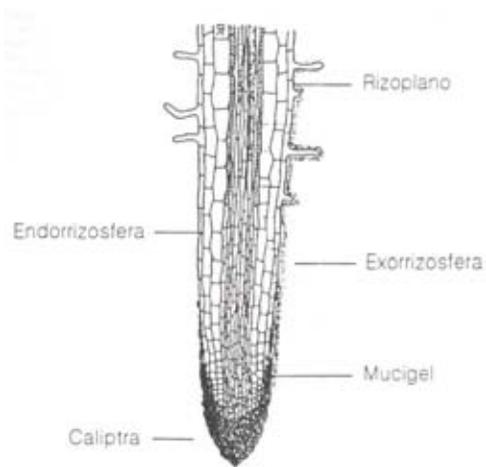
El suelo es un cuerpo tridimensional que conforma el hábitat de bacterias, hongos, levaduras, protozoos, virus, artrópodos y plantas superiores, todos ellos seres y elementos que sirven para la alimentación del hombre y los animales a través de los ciclos tróficos. Las características del suelo ejercen gran influencia sobre la ecología vegetal, edáfica, animal y en el hombre. Las propiedades biofísicoquímicas de los suelos influyen en el fenotipo de las plantas, germinación de las semillas, desarrollo de las plántulas, densidad y distribución, viabilidad de las partes vegetativas y reproductoras, consistencia, profundidad y distribución de la raíz, ciclo vegetativo, contenido de nutrientes, palatabilidad para el hombre, el ganado y fauna silvestre e influye también en los ciclos tróficos. A la fauna le afecta el pH, la salinidad, exceso de agua, compactación, temperatura y profundidad del suelo. La macrofauna y la microfauna están en íntima correlación con los diferentes suelos porque habitan o se alimentan de los productos derivados de los suelos o de los residuos vegetales (Aguilera, 1989; Barea, 1998).

La degradación de ecosistemas naturales, que se manifiesta en la pérdida de la cubierta vegetal o en el descenso de la productividad agrícola, está asociada con cambios importantes en la calidad del suelo. Ello incluye la pérdida de la estructura, incremento de la erosión, carencia de nutrientes asimilables y materia orgánica, así como un descenso en la cantidad, diversidad y actividad de los microorganismos capaces de colonizar la rizosfera. Resulta igualmente importante que se tenga tanta atención a las especies de animales y plantas en peligro de extinción así como a los suelos degradados o alterados, ya que su daño influye negativamente en el desarrollo de las poblaciones de todos los organismos terrestres. Una de las características más importante del suelo es la capacidad de sostener la vida, lo que ha permitido el desarrollo de las actividades agrícolas y la alimentación de la humanidad. El problema principal radica en que no se reconoce o se desestima la contaminación de los suelos y su grado de toxicidad. La contaminación provocada por plaguicidas, residuos industriales con metales pesados, hidrocarburos y lixiviados de los depósitos de residuos domésticos, ha sido poco atendida en comparación con los estudios sobre contaminantes en la atmósfera y el agua (Bautista y Estrada, 1998).

La contaminación de suelos con hidrocarburos afecta algunas propiedades del suelo: al aglutinarse las partículas del suelo se generan estructuras más gruesas que cubren las superficies de las partículas y el espacio poroso, afecta a la aireación del suelo, la película que cubre las partículas es hidrófoba y disminuye la retención de agua, el contenido de materia orgánica se incrementa notablemente, así como la acidificación. Cuando las concentración de hidrocarburo son tóxicas inhiben la microfauna y la mesofauna del suelo (Pérez *et al.*, 2002).

### 1.4.1 La rizosfera.

La rizosfera es definida como el volumen de suelo que esta adyacente e influenciada por la raíz de la planta. El término viene de la palabra griega para la raíz (*rhizo* o *rhiza*) que se refiere al área de influencia y localización física alrededor de la raíz (*sphere*). La rizosfera es la localización física en el suelo donde las plantas y microorganismos interactúan. Ha sido subdividida por algunos investigadores como ectorizosfera o una rizosfera más exterior, la endorizosfera o una rizosfera más interna donde existe la invasión y la colonización de microorganismos del suelo a la raíz en células corticales (figura 2). El límite distintivo de la superficie de la raíz con el suelo ha sido llamado rizoplano (Metting, 1993).



**Figura 2. Regiones que forman la rizosfera (Tomada de Ferrera-Cerrato, 1995).**

### 1.4.2 Efecto rizosfera.

El efecto rizosfera es una estimulación de 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 de las raíces de las plantas puede ser clasificada de la siguiente manera (Rovira, 1979, Stolp, 1988):

1. Exudados: compuestos de bajo peso molecular (por ejemplo azúcares y aminoácidos) que salen de las células.
2. Mucilago de plantas: son heterosacáridos, con alto peso molecular, muy ramificados de consistencia gelatinosa, originados en varias partes de la raíz e incluyen;
  - a) Secreciones por los cuerpos de Golgi de la cofia.
  - b) Hidrolizados de la pared celular primaria localizadas entre la cofia y la epidermis.
  - c) Secreciones de células de la epidermis y pelos radicales con pared primaria.  
Compuestos resultado de la degradación microbiana, células epidérmicas muertas y mucigel, material gelatinoso sobre la superficie de la raíz compuesto de mucílago de la planta, células de bacterias y productos del metabolismo.

El número de bacterias en la rizosfera puede ser de más de 20 veces que la cantidad de microorganismos encontrados en el suelo no rizosférico (Rovira y Davey, 1974; Jodi, 1995; Barea, 1998). En la rizosfera hay una alta proporción de bacterias Gram negativas, formas de bastón y bajas proporciones de bacterias en forma de bastones Gram positivas, cocos y formas pleomórficas más que en suelo libre, hay también una relativa alta proporción de bacterias móviles y de rápido crecimiento, tales como *Pseudomonas spp.* Las Interacciones

entre suelo, microorganismos y raíces de las plantas satisfacen importantes requerimientos nutricionales para ambos. *Azospirillum sp* y *Azotobacter paspali* son bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo regularmente asociadas con la rizosfera de ciertos pastos tropicales de los géneros *Digitaria*, *Panicum* y *Paspalum*. Estas bacterias utilizan los exudados de la raíz como recurso para la fijación de nitrógeno. La extensión real del efecto rizosfera depende de la planta en particular su fisiología y su madurez (Atlas y Bartha 1998).

En la planta de la familia Cyperaceae, *Cyperus laxus* Lam, del trópico mexicano, se encontró la liberación de carbohidratos en sus exudados radicales durante todo su ciclo de vida, representado por azúcares reductores que representan el 21% en promedio. Se encuentran formados principalmente por glucosa, fructuosa y en mayor concentración por la ramnosa (monosacárido residuo de la pared celular). En los exudados de la raíz, las proteínas se encuentran en baja concentración. En la etapa de la reproducción, la cantidad de exudados disminuye y aparece el ácido cítrico (Chacón 2000).

En la última década se han encontrado evidencias científicas de que las raíces de las plantas, asociadas a comunidades microbianas, ofrecen un potencial importante para la estrategia de tratamiento *in situ* de remediación biológica de suelos contaminados por sustancias químicas, orgánicas e inorgánicas (Anderson *et al.*, 1993; Cunningham y Ow, 1996).

## 1.5 La biodegradación.

La biodegradación (figura 3), llamada también biorremediación o biocorrección, es un proceso en el cual los microorganismos (levaduras, hongos o bacterias) descomponen o degradan sustancias peligrosas presentes en agua y suelo, transformándolas en sustancias menos tóxicas o inocuas principalmente dióxido de carbono y agua (EPA, 1996). Las bacterias y hongos tienen un rápido crecimiento y una mayor capacidad adaptativa a medios contaminados (Iturbe *et al.*, 2002). Los microorganismos, transforman y metabolizan sustancias orgánicas, de las cuales se nutren y obtienen energía. Ciertos microorganismos pueden digerir sustancias orgánicas, como combustible o solventes, que son peligrosas para los seres humanos. La biodegradación puede producirse en presencia de oxígeno (en condiciones aerobias) o sin él (en condiciones anaerobias) (EPA, 1996).



**Figura 3. La biodegradación por microorganismos (EPA, 1996).**

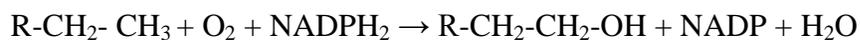
Algunos hidrocarburos son fácilmente degradados, otros son más lentamente degradados o no son biodegradables (recalcitrantes). Generalmente el grado de recalcitrancia aumenta cuando disminuye la solubilidad del compuesto y aumenta el peso molecular. Algunos HAP y alifáticos persisten en el medio ambiente porque no están biodisponibles es decir, en

una forma soluble o con poca afinidad química para los organismos. Un compuesto podría ser recalcitrante si un microorganismo nativo no tiene la capacidad enzimática para degradarlo o no es capaz de tomarlo como fuente de energía (Atlas y Bartha 1998).

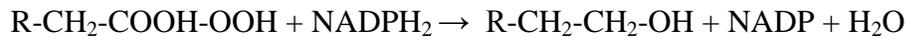
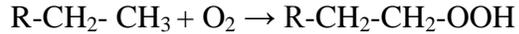
La susceptibilidad para la biodegradación varía con el tipo y tamaño de la molécula de hidrocarburo, los n-alcenos cadenas de longitudes intermedias (C<sub>10</sub> – C<sub>24</sub>) son degradados más rápidamente, las cadenas cortas de alcanos son tóxicas para muchos microorganismos. Las cadenas muy largas de alcanos incrementa la resistencia a la biodegradación, la ramificación en general reduce la tasa de biodegradación. Los hidrocarburos saturados son más fáciles de degradar que los insaturados. Los compuestos aromáticos son frecuentemente capaces de servir como única fuente de carbono para el crecimiento microbiano, pueden ser degradados vía cometabolismo por la actividad microbiana con metabolismos complementarios (Iturbe *et al.*, 2002).

### **1.5.1 Principales mecanismos de la biorremediación.**

Primer caso: Un átomo de oxígeno es incorporado a los alcanos, produciéndose un alcohol primario mas agua y la forma reducida de nicotinamida di nucleótido fosfato.



Segundo caso: Los átomos de oxígeno son transferidos a los alcanos produciendo un hidroperóxido intermedio débil que es subsecuentemente reducido por NADPH<sub>2</sub> a un alcohol y agua.



Tercer caso es más común: Que el grupo metilo terminal sea el primero en ser transformado formando un alcohol primario que es oxidado a un aldehído y un posteriormente a un ácido graso. Una vez formado el ácido graso el catabolismo ocurre por  $\beta$ -oxidación. La cadena de ácido graso es convertida a acetil coenzima A y es transformada por una serie de enzimas separando el acetil coenzima A y el ácido graso perdiendo dos carbonos, esta secuencia se repite sucesivamente. El acetil coenzima A son convertidas a  $\text{CO}_2$  a través del ciclo del ácido tricarboxílico. Los productos finales de los hidrocarburos son  $\text{CO}_2$  y  $\text{H}_2\text{O}$  (Atlas y Bartha 1998).

Los metabolitos intermedios de la biodegradación de hidrocarburos pueden incrementar temporalmente la toxicidad de las plantas como los ácidos grasos, fenoles y terpenoides (Wise y Trantolo 1994).

La  $\omega$ -oxidación y la  $\beta$ -oxidación son procesos bioquímicos ampliamente distribuidos en los microorganismos como *Brevibacterium sp*, *Corynebacterium sp* y *Rhodococcus sp*. (Pineda y Mesta 2001).

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos son oxidados por dioxigenasas a débiles cis, cis-dihidrodiol que son transformados espontáneamente a catecoles. El anillo aromático dihidrodiolizado es abierto por orto desdoblamiento oxidativo resultando en cis-cis ácido

mucónico. Esto es metabolizado a ácido  $\beta$ -cetoadifido, el cual es transformado oxidativamente para entrar al ciclo tricarboxílico, como ácido succínico y acetil coenzima A (Riser-Roberts, 1998).

Muchos de los compuestos orgánicos como el petróleo, pueden ser biodegradados por microorganismos en el suelo. Por ejemplo, con procesos de biodegradación se pueden eliminar eficazmente del suelo y del agua subterránea hidrocarburos tales como gasolina y benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX). La biodegradación también puede descomponer solventes clorados, como tricloroetileno (TCE). Cuando los compuestos clorados se biodegradan, es necesario que la degradación sea completa porque algunos productos de la descomposición pueden ser más tóxicos que los compuestos originales (EPA, 1996).

### **1.5.2 Biorremediación *in situ*.**

Las tecnologías de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos se clasifican en: *in situ*, es decir, en el mismo lugar en que se ha producido la contaminación o *ex situ*, excavando el material contaminado y remediarlo en otro lugar (Colin, 2001; Seoánes, 2002). En la biorremediación *in situ* se utiliza la capacidad de los microorganismos del suelo para degradar hidrocarburos; usando microbios autóctonos o externos. Al utilizar microorganismos autóctonos, se realiza la estimulación de los microorganismos existentes por medio de la adición de una mezcla líquida, que contiene nutrientes, oxígeno y otros

aditivos, que ayudan al incremento de la tasa de biodegradación de hidrocarburos (Lecomte y Mariotti, 1997). Las ventajas y desventajas de este proceso son las siguientes:

Ventajas: Muy útil para suelos contaminados con hidrocarburos y compuestos volátiles no halogenados, de bajo costo que no necesita de condiciones ambientales controladas.

Desventajas. Inconveniente para algunos tipos de contaminantes orgánicos o en el caso de concentraciones muy altas de los mismos, no aplicable o de capacidades limitadas en sitios con altas concentraciones de metales pesados, alta concentración de compuestos clorados o sales inorgánicas. No aplicable o limitado para suelos arenosos y arcillosos con baja permeabilidad.

El tiempo de remediación depende de algunos factores como son: la distribución horizontal y vertical así como la concentración del contaminante en el suelo. La remediación de sitios contaminados con compuestos de vida media corta, puede requerir menos de un año, mientras que compuestos de alto peso molecular necesitan más tiempo para degradarse. El tiempo esperado para la biorremediación *in situ* varía de meses hasta 6 años.

Extracción por vapor del suelo (también llamada venteo del suelo). Es un proceso fisicoquímico *in situ*, el principio es quitar compuestos volátiles de suelos contaminados aplicando un vacío por una red de tubos o pozos. El proceso puede aplicarse usando una inyección de vapor, aire caliente o calor por radio frecuencias, el cual aumenta la movilidad de compuestos volátiles y semivolátiles.

### 1.5.3 Fitorremediación.

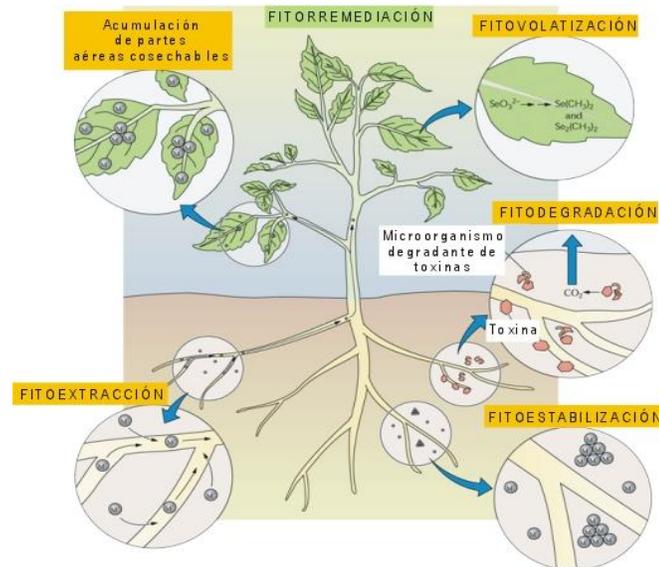
El término fitorremediación (phyto= planta y remediación= corregir lo malo) fue acuñado en 1991 (EPA, 2000). Es una forma de biorremediación *in situ*. Es el uso de plantas para remediar la contaminación, de suelos y agua, con desechos orgánicos o inorgánicos. La fitorremediación es una tecnología emergente que usa varias especies de plantas para degradar, extraer, contener o inmovilizar contaminantes del suelo y agua. Ha sido considerada como una innovación, los costos-beneficios aventajan a tratamientos comúnmente usados en sitios con residuos peligrosos (Anderson *et al.*, 1993; Cunningham y Ow, 1996). En la tabla 2 se presentan las principales ventajas y desventajas de la fitorremediación según McIntyre (2000).

**Tabla 2. Principales ventajas y desventajas de la fitorremediación.**

<b>Ventajas</b>	<b>Desventajas</b>
Incrementa la mineralización de los contaminantes.	Los contaminantes pueden pasar a otras cadenas tróficas.
Bajos costos.	Alcance aproximado de 2-5 mts
Minimiza disturbio a los ecosistemas.	El contaminante puede ser tóxico para las plantas.
Evita la erosión.	Las plantas exóticas pueden ser dañinas a los ecosistemas.
Aumenta la disponibilidad del contaminante.	Proceso lento.
Puede abarcar grandes extensiones de suelos contaminados.	

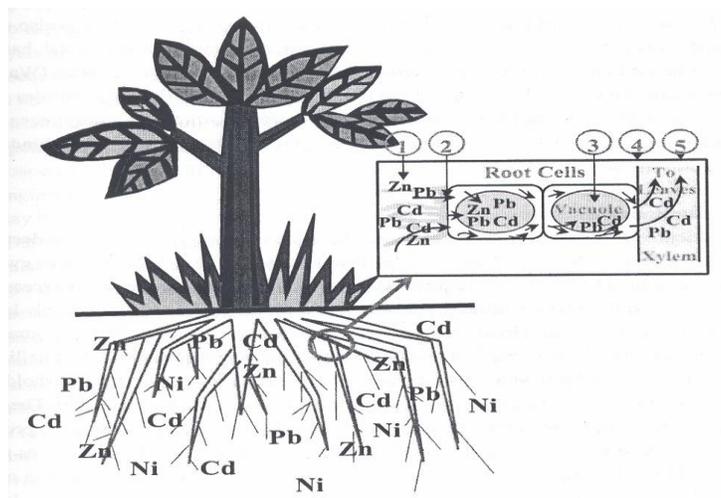
El éxito de la fitorremediación depende de la edad y tipo de la planta, concentraciones de nutrientes en el suelo, características del suelo, tipo y concentración del contaminante (Cunningham y Ow 1996).

Según la Environmental Protection Agency (EPA, 2000) existen diferentes mecanismos de fitorremediación (figura 4). A continuación se detallan cada uno de ellos.



**Figura 4. Principales mecanismos de la fitorremediación.**

Fitoextracción. Es la extracción de metales pesados de suelos contaminados (figura 5), como níquel, zinc y cobre por las raíces de plantas y su traslación al interior de la planta, los cuáles son generalmente removidos al cosecharse las plantas, evitando así la excavación del suelo. Existen cerca de 400 plantas hiperacumuladoras de las familias Brassicaceae, Euphorbiaceae, Asteraceae, Lamiaceae y Scrophulariaceae.



**Figura 5. Los metales cadmio y plomo son traslocados a la parte aérea tallo y hojas (Lasat, 2000).**

Rizofiltración. Es la absorción de metales pesados disueltos en agua por medio de la raíz de la planta. La absorción el contaminante por la planta, su concentración y traslación en ésta, ocurre dependiendo del tipo de contaminante. Los exudados de la planta pueden causar precipitación de algunos metales. La rizofiltración primero resulta en la absorción de los contaminantes, los cuáles son inmovilizados o acumulados sobre o en el interior de la planta y posteriormente son removidos por remoción física de la planta.

Fitoestabilización. 1) Es la inmovilización de un contaminante en el suelo a través de la absorción y acumulación, adsorción o precipitación en la zona de las raíces de las plantas y

2) por el uso de plantas para prevenir la dispersión de contaminantes por el viento y evitar la erosión por agua, la lixiviación hacia los mantos freáticos y dispersión en el suelo.

El pH del suelo puede cambiar por efecto de los exudados de la raíz de las plantas o a través de la producción del CO<sub>2</sub>, afectando la solubilidad y la movilidad de los metales como la disociación de compuestos orgánicos. El término fitolignificación ha sido usado para referirse a la forma de fitoestabilización en el cual los compuestos orgánicos son incorporados en la lignina de las plantas.

Rizodegradación. Es la transformación de algunos compuestos orgánicos del suelo a través de la actividad microbiana que se incrementa por la presencia de la raíz. La biodegradación en la zona de la raíz es el mecanismo para llevar a cabo la rizodegradación, los exudados de la raíz son compuestos producidos y liberados por las plantas, éstos incluyen azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, esteroides, factores de crecimiento, nucleótidos, flavonoides, enzimas, y otros compuestos. La población microbiana y su actividad se incrementan debido a la presencia de exudados y puede por ende aumentar la biodegradación de compuestos orgánicos en el suelo.

Fitodegradación o fitotransformación. Es la transformación del contaminante, por las plantas, a través de procesos metabólicos en su interior o la transformación de contaminantes en el exterior de la planta a través del efecto de enzimas. El principal mecanismo es la absorción por la planta y su metabolismo.

Fitovolatilización. Es la absorción de un contaminante por las raíces de la planta y su liberación a la atmósfera a través de la transpiración de la misma. Por ejemplo el álamo

*Populus sp* que volatiza, por sus hojas, al tricloroetileno del manto freático contaminado. Su alta capacidad de absorber cerca de 30 galones de agua por día hace eficiente la remediación.

Algunas plantas que han sido identificadas como fitorremediadoras no pueden sobrevivir en todas partes del mundo, muchas plantas exóticas son incapaces de tolerar las condiciones de suelo y climáticas de algunos países. Las leyes de muchos países se rehúsan a importar plantas exóticas debido a problemas ecológicos que pueden ocurrir cuando son introducidas. Por lo que cada país necesita identificar plantas nativas para usarse en la fitorremediación (Bizecki *et al.*, 2003).

#### **1.5.4 Biorremediación *ex situ*.**

Estos procesos consisten, principalmente, en la excavación de suelos contaminados con compuestos orgánicos y su tratamiento por medio de sistemas biológicos, por ejemplo;

Landfarming o Biolabranza. En el cual el suelo superficial es excavado y colocado sobre una capa impermeable para ser tratado por la adición de nutrientes y agua.

Composteo. Es un proceso biológico en el cual al suelo se le añade nutrientes agua y/o bacterias y es removido por una máquina para su aireación. Se caracteriza por tener una alta temperatura (>45°C). La adición de un texturizante, que puede ser un residuo vegetal, aumenta la aireación del suelo.

Bioreactores. El suelo es colocado en contenedores con microorganismos externos o autóctonos capaces de degradar hidrocarburos, las condiciones de temperatura, humedad y nutrientes son controladas.

Lavado de suelos: Este tipo de remediación puede ser aplicado *in situ* o *ex situ* y se basa en el principio de la transferencia del contaminante del suelo a una fase líquida. El método *in situ* consiste en la inyección de una mezcla limpiadora (usualmente agua o surfactante) en la superficie y la toma posterior de la solución acuosa más el contaminante por medio de un sistema de extracción. La técnica *ex situ* consiste en el lavado del suelo excavado en una planta móvil o semimóvil con una mezcla extractiva (agua mas surfactante químico o biológico, agentes quelantes o solventes específicos) para remover los contaminantes de la materia sólida, y su posterior separación de la fase líquida para descargar el suelo en el área excavada.

Desorción térmica: Es un proceso térmico *ex situ* mediante el cual el suelo contaminado, después de la excavación, es calentado provocando la volatilización de contaminantes orgánicos. Existen dos diferentes tipos de desorción térmica: desorción de baja temperatura y desorción de alta temperatura. En el primer caso el desecho es calentado entre 100 a 300°C, el segundo opera a una temperatura entre 300 y 550°C. Los contaminantes y el agua son evaporados, recondensados como líquidos y luego reciclados o confinados. Los tratamientos puede realizarse en: un horno rotatorio, cama movediza, reactores rotatorios, sistemas infrarrojos, reactores de pared fluida, un pirolizador eléctrico o un proceso de plasma.

## 2. Antecedentes.

A continuación se describen brevemente algunos estudios que versan sobre la remoción de hidrocarburos del suelo empleando fitorremediación.

Lee y Banks (1993) realizaron experimentos de suelos contaminados con hidrocarburos alifáticos (tetrametilpentadecano, hexadecano) y aromáticos (antraceno, pireno y fenantreno) en una concentración de 100 ppm utilizando plantas de alfalfa *Medicago sativa*, durante 24 semanas y fertilizadas cada dos semanas. Los resultados mostraron un mayor aumento de microorganismos en suelos con plantas que sin plantas, el suelo contaminado con hidrocarburos alifáticos tuvo una mayor cantidad de microorganismos más que los suelos con HAP.

Günther *et al.*, (1996) estudiaron la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por plantas de *Lolium perenne* en laboratorio utilizando columnas de suelo contaminado con una mezcla en 5,000 ppm de HTP, durante 22 semanas y fertilizadas cada ocho semanas. Los resultados fueron los siguientes: Los hidrocarburos alifáticos desaparecieron más rápido en columnas con vegetación. La eliminación del contaminante fue acompañada por un aumento de microorganismos. Los hidrocarburos residuales fueron 112 ppm suelos con plantas, 792 ppm suelos sin plantas y 3,620 ppm de HTP en los controles.

Reynolds *et al.*, (1999) realizaron dos experimentos de fitorremediación, uno en laboratorio con *Paspalum notatum*, de un suelo contaminado con pireno de 0 a 2,000 ppm, durante 10 semanas. La actividad microbiana no influyó en la concentración de pireno pero

sí fue más abundante en la rizosfera que en suelo no rizosférico. El otro experimento realizado en campo con suelos contaminados de diesel a una concentración de 8,000 ppm de HTP, utilizando las plantas; *Lolium multiflorum* y *Festuca rubra*, además de la adición de fertilizantes durante 10 meses. Se observó un aumento significativo de los microorganismos y la degradación de hidrocarburos fue un 73% más que el control.

En una terminal de gasolina en Virginia, Estados Unidos, Banks *et al.*, (1997) hallaron suelos contaminados con rangos de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) de 1,700 a 3,600 ppm. Se utilizaron las plantas de *Cynodon dactylon*, *Festuca arundinacea* y *Trifolium repens*. La concentración de HTP disminuyó significativamente en suelos con vegetación comparados con suelos sin vegetación en 9 meses. Los porcentajes de degradación de hidrocarburos para cada especie de plantas fueron los siguientes: *F. arundinacea* 27%, *T. repens* 24%, *C. dactylon* 23%, sin vegetación 12%. Utilizaron ensayos BIOLOG en el que la fuente principal de carbono son hidrocarburos, *T. repens* degrada 69%, *F. arundinacea* y *C. dactylon* degradan 58% y 49% después de 68 hrs de incubación, los microorganismos de suelos sin plantas solo utiliza 4% del sustrato. Los resultados indican que la composición de la comunidad microbiana es diferente para cada especie de planta evaluada.

Wiltse *et al.*, (1998) evaluaron la capacidad de 20 genotipos de *Medicago sativa* en un suelo contaminado con petróleo crudo a una concentración de 20,000 ppm de HTP, durante doce meses, la degradación obtenida fue hasta 56%. Dos genotipos fueron los que demostraron tener mayor capacidad para la degradación de hidrocarburos.

## 2.1 Estudios de la fitorremediación en México.

En México, hace aproximadamente seis años algunas instituciones como las universidades Nacional Autónoma de México y la Universidad Autónoma Metropolitana (Unidad Iztapalapa), el CINVESTAV del IPN, y el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), realizaron experimentos de biorremediación (Pérez *et al.*, 2002). A continuación se describen los principales hallazgos derivados de estos estudios.

En experimentos de fitorremediación utilizando *Hydrocotyle ranunculoides*, durante 7 semanas en un suelo contaminado de diesel, con las siguientes concentraciones; 0, 5,000 , 10,000, 15,000 y 20,000 ppm de HTP, determinados por gases (GC/FID), cuantificó compuestos alcanos de 10 a 20 carbonos. Los resultados obtenidos demostraron una mayor disminución de alcanos en el suelo influenciado por las raíces que en el suelo sin influencia de esta (Damian, 1999).

En el proceso de fitorremediación se evaluó un suelo contaminado del sur de Veracruz con *Cyperus odoratus* y en la presencia en suelo, de B (k) fluoranteno, B (ghi) perileno, naftaleno y pireno. En 6 meses de tratamiento, *C. odoratus* no influyó significativamente en la reducción de la concentración de HAP (Flores, 2001).

En estudios de fitorremediación de suelos contaminados con queroseno (5,000 ppm) utilizando gramíneas, se encontró un predominio de bacterias libres fijadoras de nitrógeno del género *Azomonas sp* y *Azotobacter nigricans* y se demostró la capacidad de estos microorganismos para degradar hidrocarburos del queroseno en condiciones controladas.

Por otra parte, se observó una estrecha relación entre la actividad degradativa y la fijación de nitrógeno atmosférico (Pérez *et al.*, 2002).

Se evaluó el proceso de fitorremediación en el campo utilizando *Echinocloa crusgalli* y *Cyperus elegans* durante seis meses en zonas contaminadas con hidrocarburo mayores de 60,000 ppm de HTP. Las reducciones fueron para *E. crusgalli* de 28% y para *C. elegans* de 68.39 %. Además se evaluó con ensayos de toxicidad el suelo antes y después del experimento encontrándose una disminución de su toxicidad del 74% (Uribe *et al.*, 2003).

## **2.2 Estudios de toxicidad.**

Con relación a los estudios de toxicidad en la zona de estudio o cercanos a ésta, se hallaron las siguientes investigaciones.

Se evaluó el proceso de germinación y crecimiento de *Phaseolus vulgaris* en un suelo contaminado con 180,000 ppm de HTP en Santa Alejandrina, Ver. Los resultados mostraron que la germinación no fue inhibida, sin embargo ésta se retrasó 7 días en comparación con semillas en un suelo no contaminado. Con lo que concierne al crecimiento del tallo del frijol, éste fue 1.7 veces menor en el suelo contaminado que en el no contaminado. También el peso seco del tallo y la raíz se vieron afectados por la presencia de contaminantes en el suelo, siendo 2.5 veces menores a los obtenidos en el suelo no contaminado. Por otra parte, se llevó a cabo la modificación de la textura del suelo contaminado a través de la adición de agrolita (5, 10 y 15%) y se encontró que el

crecimiento de la planta fue 1.7 veces mayor con respecto al suelo no modificado (Jaimes, 2000).

Se evaluó la toxicidad de un suelo contaminado del Pantano de Santa Alejandrina en Minatitlán, Veracruz, de 37,000 ppm de HTP con *Bacillus cereus* (porcentaje de la inhibición de la deshidrogenada), *Eisenia foetida* (porcentaje de sobrevivencia), *Zea mays*, *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris* (medición de la germinación y primeros estadios de crecimiento). En el cual obtuvo los siguientes resultados de evaluación toxicológica: *E. foetida* < *B. cereus* < *T. aestivum* < *P. vulgaris* < *Z. mays*. Las plantas *P. vulgaris* y *Z. mays*, una leguminosa y una gramínea, resultaron menos afectadas a la exposición al tóxico (Páez, 2000).

El potencial fitotóxico de un suelo del área Pantano de Santa Alejandrina en Minatitlán Veracruz fue evaluado a través de diversos parámetros fisiológicos como: bioensayos de germinación, elongación radicular, crecimiento y contenido de clorofila en plántulas de *Cyperus elegans*. Las plantas se expusieron a diferentes concentraciones de HTP en un intervalo de 25 a 97,376 ppm. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los parámetros mencionados, lo que representa una ventaja para *C. elegans* que puede considerarse en un proceso de fitorremediación del pantano (Ortiz, 2001).

Los resultados de las investigaciones realizadas en invernadero con especies de plantas del Pantano de Santa Alejandrina, muestran que las semillas de *Cyperus laxus*, *Echinocloa colonum* y *Typha dominguensis* pueden germinar y crecer en concentraciones de HTP de 0-200,000 ppm. *C. laxus* fue más eficiente en germinación (68-90%) que *E. colonum* con 32-

52% y *T. dominguensis* con 38-48%. Las tasas de crecimiento de *C. laxus* son más altas que *E. colonum*, sin embargo, en ambas especies, al aumentar la concentración de HTP la tasa de crecimiento disminuye. La edad reproductiva de *C. laxus* fue estimada en dos meses y fue exitosa hasta 20,000 ppm, en concentraciones superiores la floración disminuye, lo que sugiere que esta concentración es el límite para su capacidad reproductiva (Gallegos *et al.*, 2000).

Se evaluó y se comparó el efecto del naftaleno expuesto en forma de solución en concentraciones de 5, 10, 15, 20, 25 y 30 mg/L, en la germinación, producción de biomasa y contenido de clorofila de *Glycine max* y *C. elegans*. En las determinaciones del índice de germinación y de biomasa no hubo respuesta tóxica al naftaleno, en veinte días que duró la prueba. Sin embargo en el parámetro de contenido de clorofila se observó una disminución del 50% en las concentraciones de naftaleno de 25 y 30 mg/L en las plantas expuestas de *Glycine max*, mientras que *C. elegans* resultó ser una especie tolerante al naftaleno a concentraciones de 5 a 30 mg/L en este parámetro (Alonso, 2002).

Se evaluaron diez colectas de tres localidades de la variedad de maíz híbrido Tuxteco recolectados de Minatitlán, Veracruz, en concentraciones de 0, 15,000, 25,000 y 35,000 ppm de petróleo crudo provenientes de varios pozos petroleros. Una de la colecta de maíz presentó valores más altos de emergencia en la germinación en todas las concentraciones de petróleo en el suelo. Con respecto al crecimiento, dos colectas tuvieron mayor potencial para utilizarse en fitorremediación. La concentración de petróleo de 25,000 ppm favoreció al crecimiento de las plántulas de maíz (Quiñoles *et al.*, 2003).

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo general.**

Evaluar la eficiencia de degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con hidrocarburos, empleando tres especies de plantas que se han adaptado a las condiciones de contaminación del Pantano de Santa Alejandrina.

#### **3.2 Objetivos particulares.**

1. Evaluar la tolerancia de tres plantas en un suelo contaminado, de 221,347 ppm de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).
2. Evaluar la tolerancia de la planta *Cyperus elegans* de un rango de concentración de 297 ppm a 221,347 ppm de HTP.
3. Evaluar la fitorremediación por las especies expuestas a diferentes diluciones de suelo contaminado de hidrocarburos.
4. Cuantificar el efecto provocado por las diferentes concentraciones de diferentes diluciones de suelo contaminado de hidrocarburos en las tres especies vegetales, usando los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento, longitud de la parte aérea, longitud radical, peso seco y volumen radical.
5. Cuantificar la fitorremediación sobre el pH y en los microorganismos degradadores de hidrocarburos al nivel de la rizosfera.
6. Evaluar los resultados, a través de una matriz, para encontrar a la planta mas eficiente.

#### **4. Hipótesis experimental.**

1. La tolerancia de las plantas disminuirá al aumentar la concentración de los hidrocarburos en el suelo.
2. El aumento de HTP afectara negativamente la biomasa, altura, longitud, volumen radical, velocidad de crecimiento y los microorganismos del suelo.
3. La eficiencia de la fitorremediación será mayor mientras menos contaminado este el suelo y a una mayor concentración de hidrocarburo expuesto se observará una menor degradación de hidrocarburos
4. La presencia de la vegetación aumentará la cantidad de microorganismos degradadores de hidrocarburo.
5. El pH del suelo, comparado con el control sin plantas, se vera modificado por la presencia de vegetación.

## **5. Material y métodos.**

### **5.1 Obtención de la muestra de suelo.**

Las muestras de suelo fueron colectadas en Minatitlán, Veracruz, en el área conocida como el Pantano de Santa Alejandrina (foto 1). El muestreo fue realizado por personal del IMP, quién eligió varios puntos al azar de un área contaminada con hidrocarburos y conformó una muestra compuesta. Durante el traslado al laboratorio, el suelo no fue refrigerado. En el laboratorio se homogeneizó y conservó en refrigeración a 4°C.

Para la determinación de parámetros físicos, químicos y biológicos, se secó 1 Kg. de suelo a temperatura ambiente y posteriormente se tamizó utilizando una malla de 2 mm de abertura.



**Foto 1. Vista general del Pantano de Santa Alejandrina.**

## **5.2 Obtención de plantas.**

Las semillas de tres plantas diferentes crecidas sobre suelo contaminado con hidrocarburos fueron colectadas por el personal del IMP en terrenos del Pantano.

Se determinó el porcentaje de germinación (índice de germinación), para conocer la viabilidad de las semillas. Para ello se colocaron en cajas Petri sobre arena sílica de diámetro <2 mm, 25 semillas de cada especie, con cuatro repeticiones, las cuales se incubaron a 28°C, durante dos semanas, con períodos de 16 hrs. de luz y 8 hrs. de oscuridad.

Se colocaron aproximadamente 200 semillas de cada especie en unos contenedores de plástico transparente de 20 x 20 cm y 12 cm de altura, con arena sílica de diámetro <2 mm y suelo contaminado 1:2, en la incubadora antes mencionada y a las mismas condiciones, se regaban con agua cada tercer día. A la quinta semana se seleccionaron las plántulas mejor desarrolladas y se transplantaron a los suelos problemáticos. También se seleccionaron plántulas que fueron transplantadas a suelo no contaminado para su identificación taxonómica.

## **5.3 Preparación de suelo.**

Se utilizaron dos suelos uno con una concentración de 297 ppm de HTP, el cual se denominó S1 y otro de una concentración de 221,347 ppm de HTP, el cual se denominó como S2. Se realizaron mezclas del S1 y el S2, en relación peso/peso (diluciones): 0% (es decir, el S1 o “suelo no contaminado”), 5% (95% de S1 con 5% del S2), 10%, 25% y 50%. Antes de realizarse las mezclas el suelo fue secado a temperatura ambiente posteriormente

fue molido en un mortero y tamizado con tamiz del numero 10, finalmente, se homogeneizaron en bolsas de plástico.

#### **5.4. Diseño experimental.**

##### **5.4.1 Tolerancia de las plantas seleccionadas a diferentes concentraciones de HTP.**

Para la evaluación de la tolerancia de las tres plantas al S2, se trasplantaron 25 plántulas de cada especie a macetas con 250 g. de suelo. Durante siete semanas, se colocaron en el invernadero (foto 2) de la Facultad de Ciencias, UNAM. Las plantas fueron regadas, con agua de la llave, cada tercer día al 90% de su capacidad de campo. Se tomaron datos, cada semana, de la longitud de las plantas y de su mortalidad.



**Foto 2. Invernadero de la Facultad de Ciencias UNAM.**

Para la evaluación de la tolerancia de *Cyperus elegans* se colocaron en una incubadora durante cuatro semanas, en almácigos, 25 plántulas en las siguientes diluciones: 0% (S1), 5%, 10%, 25%, 50%, 75% y 100% (S2). Se tomo el porcentaje de mortalidad.

#### **5.4.2 Fitorremediación de las plantas seleccionadas.**

Para el proceso de fitorremediación se realizó un experimento factorial 5 X 3 en una distribución completamente al azar. Los factores fueron diluciones de suelo (0, 5, 10, 25 y 50 por ciento) y tres tipos de plantas (*Cyperus elegans*, *Cyperus odoratus* y *Paspalum virgatum*), con cuatro repeticiones (tabla 3). Se colocaron en macetas con 250 g de las mezclas de suelo antes mencionada con cuatro macetas para cada planta y cuatro macetas control (sin plantas) por cada dilución. Posteriormente se colocaron en el invernadero de la Facultad de Ciencias, UNAM, Las macetas fueron regadas, con agua de la llave, al 90% de su capacidad de campo, cada tercer día. Se tomaron los parámetros de HTP, microorganismos degradadores de hidrocarburos por la técnica del NMP y pH, para las diluciones 5%, 10% y 25%, en donde las plantas tuvieron un mejor desarrollo. De las cuales se realizaron análisis de varianzas para ver diferencias entre tratamientos. El análisis estadístico, ANOVA y prueba de Tukey se realizó en el software SPSS v. 10.

**Tabla 3. Diseño experimental de las tres especies de plantas y sus respectivos controles.**

Mezcla de S1 y S2	<i>Paspalum virgatum</i>	<i>Cyperus odoratus</i>	<i>Cyperus elegans</i>	Controles s/p
0%				
5%				
10%				
25%				
50%				

s/p= sin planta

### 5.5 Análisis de las plantas.

Una vez por semana se midió la altura de las plantas, de la superficie del suelo a la punta. En la semana número catorce (98 días) se sacrificaron las plantas, y fueron divididas en raíz y parte aérea (parte fotosintética más tallo) y se cuantificaron los siguientes parámetros: longitud parte aérea, longitud radical, volumen radical y peso seco total (secados en una estufa a 80°C durante 48 hrs.).

### 5.6 Análisis del suelo.

Los análisis de suelo se realizaron según Rodríguez y Rodríguez (2002). La textura, se realizó por el método de Bouyucos, la densidad real por el método del picnómetro, la densidad aparente por el método de la probeta, pH por el método electrométrico relación

H<sub>2</sub>O 1:2.5 y KCl 1: 2.5, nitrógeno total por el método Kjeldahl y materia orgánica por el método de Walkley y Black.

### **5.7 Cuantificación de Hidrocarburos Totales del Petróleo del suelo.**

a) Método gravimétrico 3540 de la Environmental Protection Agency (EPA).

Se colocó un gramo de suelo seco y un gramo de sulfato de sodio anhidro en un dedal de vidrio, el cual se empacó con fibra de vidrio y se sometió a extracción Soxhlet utilizando 120 mL de tetracloruro de carbono como disolvente durante 5 h y un matraz de bola fondo plano de 250 mL a peso constante. Posteriormente el matraz con el extracto se colocó en un rotavapor marca Büch R-124 para la recuperación del tetracloruro, a 42°C y posteriormente se colocó el matraz en un desecador durante 24 horas. La cantidad de HTP se obtuvo tomando la diferencia de peso del matraz de la siguiente manera:

mg de HTP/Kg de suelo=  $\frac{(1000 \text{ mg de suelo} - \text{mg del suelo después de la extracción Soxhlet})}{1000} \times 1000$

b) Método IMP-QA-620.

Para la cuantificación de hidrocarburos totales del petróleo por espectroscopía de infrarrojo, se utilizó el Método IMP-QA-620, que es un método modificado por el Instituto Mexicano del Petróleo con base en el método EPA 418.1

El método se basa en la extracción con tetracloruro de carbono de los hidrocarburos totales presentes en sedimento o suelos, los cuales se cuantifican por medio de la absorción ( 0.3 a 0.5 nm) que presentan en la zona del infrarrojo de 2,950 y 2,930  $\text{cm}^{-1}$ . Se utilizó un espectrofotómetro de infrarrojo NICOLET modelo Nexus 470 FT-IR ESP.

Se colocaron cinco gramos de suelo seco y un gramo de sulfato de sodio anhidro en un dedal de vidrio, el cual se empacó con fibra de vidrio y se sometió a extracción Soxhlet utilizando 120 mL de tetracloruro de carbono como disolvente durante 5 h y un matraz de bola fondo plano de 250 mL. Posteriormente se evaporó el disolvente hasta tener un volumen aproximado de 3 mL, se aforó en matraz aforado de 5 mL.

Se corrieron los extractos de las muestras, en el espectrofotómetro del infrarrojo en las mismas condiciones que los estándares, aplicando las diluciones necesarias para tener valores de absorbancia entre 0.2 y 0.8, que es el rango en el que se encuentra la curva de calibración.

Cálculos.

El equipo da un valor de absorbancia el cuál se interpola en la curva de calibración estándar para obtener el valor de la concentración de hidrocarburos. El contenido de hidrocarburos totales en la muestra se calcula mediante la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{Hidrocarburos totales (ppm)} = \frac{(C) \times (Ve) \times (F)}{(Gs)}$$

Donde:

C = Concentración en ppm dada por el FT-IR.

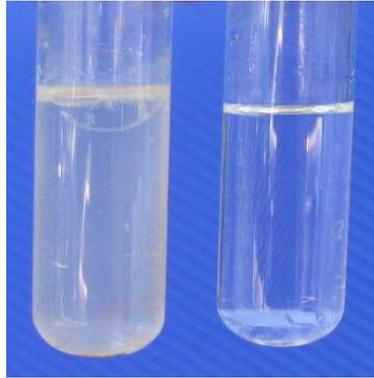
Ve = Volumen del extracto de tetracarburo de carbono.

F = Factor de dilución obtenido al dividir el volumen de dilución entre la alícuota.

Gs = Gramos de suelo.

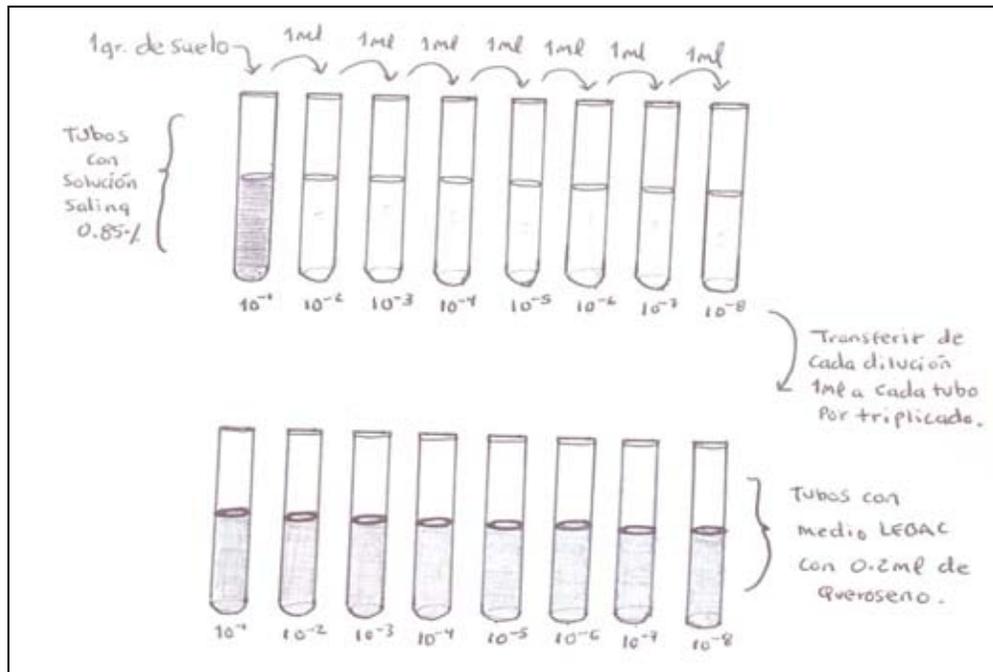
### **5.8 Cuantificación de microorganismos degradadores de hidrocarburo en suelo por Número Más Probable (NMP).**

Se realizaron según Harrigan y McCance, (1974) y NACE, (1987). Este método cuantifica el número más probable (NMP) de microorganismos degradadores de hidrocarburos, en base a una inferencia estadística, para lo cual se realizan diluciones en base 10, cada una de las cuales se utilizó para inocular uno por uno tres tubos de ensaye en medio de cultivo con queroseno como fuente de carbono, correspondientes a cada dilución. Los tubos inoculados son incubados a 30°C durante 72 horas para posteriormente observar los tubos de cada dilución y registrar el número de tubos positivos en cada dilución. Los tubos positivos fueron aquellos en los que se observó turbidez del medio de cultivo y la emulsión del queroseno como indicadores del crecimiento microbiano (foto 3).



**Foto 3. Tubo positivo (izquierda) de microorganismos degradadores de hidrocarburos.**

Experimentalmente se realizó el siguiente procedimiento para obtener el número de microorganismos degradadores de hidrocarburos (figura 6). Se tomó un gramo de suelo seco y tamizado y en condiciones estériles, se transfirió a un tubo de ensayo con 9 mL de solución salina de NaCl al 0.85%, el cual se homogeneizó para transferir un mililitro a otro tubo de ensayo conteniendo 9 ml de solución salina. Las diluciones posteriores se realizaron de la misma manera antes descrita. De cada dilución se transfiere un mililitro a cada uno de los tres tubos de ensayo con 9 mL de medio Lebac y 0.2 ml de queroseno como fuente de carbono. Los tubos se incuban durante 72 horas a 30°C. La composición del Medio Lebac por cada litro es: 7 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 5.7 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2.3 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 2.25g de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  y 0.1 g de extracto de levadura.



**Figura 6. Diagrama esquemático de la cuantificación de microorganismos degradadores de hidrocarburo por NMP.**

Después de incubados los tubos turbios y con emulsión de cada dilución se utilizan para calcular la cantidad de microorganismos por gramo de suelo en las tablas de NMP. Para ello se obtiene un número característico de tres dígitos correspondientes al número de tubos positivos, el primero en la dilución más alta, el segundo en la siguiente y finalmente el tercero en la siguiente dilución. Posteriormente se busca en las tablas el número correspondiente al número característico obtenido de la prueba, el cual se multiplica por el inverso del valor de la dilución en la cual se obtuvo el primero de los dígitos del número característico. El valor resultante corresponde al número más probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos por gramo de suelo.

## **5.9 Descripción de la matriz para evaluar la eficiencia de las plantas.**

Se evaluó la eficiencia de las plantas en suelos contaminados de hidrocarburos tomando en cuenta los resultados obtenidos los siguientes parámetros: germinación, sobrevivencia de las plantas en el S2, altura de la parte aérea en S2, altura de la parte aérea en las diluciones 5, 10, 25 y 50%, volumen radical en las diluciones 5, 10, 25 y 50%, longitud radical en las diluciones 5, 10, 25 y 50%, peso seco en las diluciones 5, 10, 25 y 50%, HTP final degradado, NMP de microorganismos degradadores del petróleo y pH final obtenido. Para la construcción de la matriz se consideraron los siguientes criterios: 0= nada eficiente, 1=poco eficiente, 2=regularmente eficiente, 3= muy eficiente. La planta más eficiente fue la que obtuvo la suma más alta, de los parámetros antes mencionados.

## **6. Descripción de las especies vegetales seleccionadas.**

Las plantas utilizadas son nativas de una zona del sureste de Veracruz, que ha sido contaminada por más de 40 años. Estas plantas tienen una capacidad para crecer y reproducirse, que ha sido adquirida a través del tiempo en que han permanecido en el suelo contaminado con hidrocarburos.

Dos de las tres especies fueron identificadas dentro de la familia Cyperaceae, la otra planta fue identificada como *Paspalum virgatum* que se encuentra dentro del grupo de las gramíneas.

La familia de las Cyperaceae tiene aproximadamente 115 géneros, distribuidos en todo el mundo y en diferentes condiciones ecológicas. El género *Cyperus* tiene de 600 a 900 especies y es el segundo género más grande de la familia, principalmente de los trópicos y subtrópicos del mundo (Diego, 1997).

La descripción de las especies de plantas utilizadas en éste trabajo, es la siguiente:

Reino. Plantae

Subreino. Tracheobionta

Superdivision. Spermatophyta

Division. Magnoliophyta

Clase. Liliopsida

Subclase. Commelinidae

Orden. Cyperales

Familia. Cyperaceae

Genero. *Cyperus* L.

Especie. *Cyperus elegans* L. (foto 4).

Hierbas perennes, cespitosas, verde glauco, de 20 a 75 cm de alto, viscosas. Tallos trígonos o subcilíndricos, de 1.5 a 3.5 mm de ancho en la base, estriados, glabros. Hojas de 3 a 6, septado nodulosas, de 20 a 70 cm de largo y de 1 a 4 mm de ancho, subcoriáceas, márgenes escábridos e involutos; vainas de color verdoso a pardo rojizo, de 1.5 a 18 cm de largo, algunas veces infladas en la base. Inflorescencia en umbelas de espigas capitadas, de 2.5 a 22 cm de largo y 5 a 14 cm de ancho. Aquenios negros, cubiertos por una capa translúcida,

anchamente obovoides, trígono, apiculados, ángulos redondeados, lados cóncavos, estipitados, de 1.4 a 1.8 mm de largo y 0.7 a 1 mm de ancho, viscosos, lisos. Distribución: sur de Estados Unidos, México (Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán), América Central, Antillas y América del Sur. Altitud: de 0 a 100 m. tipos de vegetación: acuática y subacuática, zonas húmedas de las siguientes comunidades: bosque tropical caducifolio, vegetación halófila costera y cultivos. Fenología: florece y fructifica de febrero a noviembre (Diego, 1997).



**Foto 4** *C. elegans*

Reino. Plantae

Subreino. Tracheobionta

Superdivision. Spermatophyta

Division. Magnoliophyta

Clase. Liliopsida

Subclase. Commelinidae

Orden. Cyperales

Familia. Cyperaceae

Genero. *Cyperus* L.

Especie. *Cyperus odoratus* L. (foto 5).

Hierbas anuales o perennes, solitarias o cespitosas, de 40 a 90 cm de largo, bulbosas en la base. Tallos trígonos, de 0.5 a 1 cm de ancho en la base, glabros. Hojas 3 a 8, de 10 a 50 cm de largo y 4 a 10 mm de ancho. Inflorescencia en umbelas o corimbos abiertos de espigas, de 2 a 45 cm de largo y 6 a 20 cm de ancho. Aquenios color pardo a casi negro, elipsoides, desigualmente trígonos, apiculados, ángulos redondeados, lados convexos o aplanados, de 1.4 a 1.9 mm de largo y 0.4 a 0.6 mm de ancho, punticulados. Distribución. Pantropical. En América: Estados Unidos, México (Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, San Luis Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán), América Central, Antillas y América del Sur. Altitud: de 0 a 1,500 m. tipos de vegetación: acuática y subacuática, zonas húmedas de las siguientes comunidades: bosque tropical caducifolio, bosque de *Quercus*, bosques de *Pinus Quercus*, ecotono de bosque de *Quercus* y cultivos. Fenología: florece y fructifica todo el año (Diego, 1997).



**Foto 5 *C. odoratus*.**

Reino. Plantae

Subreino. Tracheobionta

Superdivision. Spermatophyta

Division. Magnoliophyta

Clase. Liliopsida

Orden. Poales

Familia. Poaceae

Genero. Paspalum

Especie. Paspalum virgatum (foto 6).

Las gramíneas representan uno de los grupos vegetales más diversos en el mundo, pues ocupan el tercer lugar en cuanto al número de géneros y el quinto como específico. En el mundo la familia Poaceae o Gramineae incluye 702 géneros y 9,675 especies. Con respecto a México se registran 206 géneros (157 nativos y 49 introducidos) y se estima que existen alrededor de 1,127 especies (Dávila y Sánchez 1996).



**Foto 6 *P. virgatum***

*Paspalum virgatum*, cortadora, corta boca, cabezona o caguazo, es una gramínea perenne con plantas densamente macizas, de hasta 2 m de altura. De crecimiento muy vigoroso en forma de macollas erectas; las hojas se tornan ásperas y con bordes cortantes a medida que la planta tiene más edad. La inflorescencia es una panícula de hasta 25 cm de longitud. Cada panícula de *Paspalum virgatum* produce alrededor de 800 semillas viables y cada planta entre 4 y 8 panículas. Se ha encontrado un 50 por ciento de germinación seis meses después de la maduración de las semillas *P. virgatum* se reproduce mediante semillas y vegetativamente mediante secciones de tallo con raíces. Las semillas son capaces de brotar desde profundidades de 7 cm. Florece dos veces al año y su ahijamiento ocurre al comienzo de la floración, o sea 90 días después de la brotación de la planta, las raíces son profundas que le ayudan a resistir a sequías (Havard, 1969). Se encuentra diseminada en casi todos los países de América Tropical y Australia. Se desarrolla fácilmente en suelos de baja fertilidad. *P. virgatum* es sólo ingerido por el ganado durante los estadios tempranos de desarrollo. Posteriormente, la maleza se hace no comestible debido a sus hojas con márgenes afilados, bajo contenido de nitrógeno y alto contenido de fibra (Sistach y León 1987).

## 7. Resultados y discusión.

### 7.1 Caracterización fisicoquímica y microbiana de los suelos utilizados.

El pH obtenido (tabla 4), en agua destilada relación 1:2.5 de los suelos va de un rango de 4.32 en el S1 a 3.3 en el S2, este último considerado por la SEMARNAT (2002) como fuertemente ácido. Estos valores bajos de pH son comunes en regiones donde las precipitaciones son altas, como es el caso en el sur de Veracruz, provocando la lixiviación de bases intercambiables, lo que origina la escasez de nutrientes minerales como calcio, magnesio y fósforo (Aguilera, 1989). El pH del suelo tiene efectos significativos sobre la disponibilidad de nutrientes y sobre el desarrollo de los microorganismos. El crecimiento de los hongos es favorecido en suelos ácidos (Fernández *et al.*, 1998). A valores bajos de pH, el aluminio, fierro y manganeso así como los metales pesados son solubles y pueden ser tóxicos para las plantas (Spark, 2003). Martínez (2000) contaminó suelos de diferentes texturas con diesel, gasolina y combustóleo, con un rango de concentración de 100 a 150,000 ppm y no encontró diferencias significativas con respecto al pH. Sin embargo las actividades industriales también pueden estar influyendo en el pH del suelo debido a la cercanía de la refinería, ya que el aire contaminado introduce al suelo moléculas como;  $H^+$ ,  $NO_x$ ,  $SO_3^-$  y  $SO_4^-$  (Rusek y Marshall, 2000). El pH está relacionado con la cantidad de hidrocarburos presente en el S2, debido a que en suelos contaminados con hidrocarburos se acumula carbono orgánico y se generan ácidos orgánicos (Murguía y Martínez, 1991).

Las concentraciones de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP) en los suelos experimentales, cuantificadas por el método gravimétrico, van de 8,900 (5%) hasta

221,347 ppm (100%) en el S2. Por el método IMP-QA-620, se determinó la concentración del suelo de referencia (S1), diluciones del suelo 5%, 10% y 25%, con resultados más altos que los obtenidos por el método gravimétrico, que van de 297 a 49,054 ppm (tabla 4).

La NOM-EM-ECOL-2002 que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, establece un límite máximo de 1,000 ppm de HTP, en el cual la mayoría de los suelos sobrepasa este límite a excepción del S1 el que tiene una concentración de 297 ppm de HTP. Es importante recalcar que actualmente se utiliza la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 y la cual no se considera a los HTP como límites máximos permisibles.

**Tabla 4. Caracterización fisicoquímica y biológica de los suelos utilizados.**

	S1 (0%)	5 (5% S2 y 95% S1)	10 (10% S2 y 90% S1)	25 (25% S2 y 85% S1)	50 (50% S2 y 50% S1)	S2 (100%)
pH(A.D. 1:2.5)	4.32	4.3	4.29	4.24	4.2	3.3
pH (KC1 1:2.5)	3.8	n.d	n.d	n.d	n.d	3.03
Concentración de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) (ppm)	n.d.	8,900 <sup>1</sup>	17,200 <sup>1</sup>	45,400 <sup>1</sup>	98,000 <sup>1</sup>	221 347 <sup>1</sup>
	297 <sup>a</sup>	9,002 <sup>a</sup>	22,712 <sup>a</sup>	49,054 <sup>a</sup>	n.d.	n.d.
Materia orgánica (%)	0.81	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	29.03
Carbono (%)	0.46	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	16.28
Nitrógeno (%)	0.037	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0.396
Arena (%)	44	47.6	51.4	59.2	64.8	78.2
Limo (%)	33.6	31.6	29.8	21.8	20.6	14.2
Arcilla (%)	22.4	20.8	18.8	19	14.6	7.6
Textura	Migajón arcilloso	Franco	Migajón arenoso	Migajón arenoso	Migajón arenoso	Arena migajosa
Densidad real (g/cm <sup>3</sup> )	2.42	2.34	2.32	2.05	1.48	1.14
Densidad aparente (g/cm <sup>3</sup> )	1.04	1.04	1.04	1.04	0.98	0.79
Porosidad (%)	56.85%	55.9%	54.8%	50%	34%	30.4%
NMP (microorg/gsuelo)	15	15	25	45	150	4.5x 10 <sup>3</sup>

N.D. no determinado.

<sup>1</sup>Método gravimétrico

<sup>a</sup>Método IMP-QA-620

Conforme aumenta la concentración de hidrocarburos en el suelo, éste se vuelve más hidrofóbico, ya que la incorporación del agua a los suelos contaminados en las diluciones de suelo de 25% y 50 % fue más difícil que a diluciones menores a éstas.

La materia orgánica en el S1 fue de 0.81% y de 29.03% en el S2, por lo que son clasificados por la SEMARNAT (2002) como rico y extremadamente rico respectivamente, el aumento en la materia orgánica se debe a la cantidad de hidrocarburos, y en este caso no significa que sea favorable como se maneja en la literatura, ya que se debe a los hidrocarburos antropogénicos y no a un origen biogénico. Martínez (2000) encontró un aumento de materia orgánica directamente proporcional a la cantidad de diesel, gasolina y combustóleo añadido al suelo.

La cantidad de nitrógeno total se cuantificó a los suelos S1 y S2, cuyos resultados fueron 0.037 y 0.396%, respectivamente. Dichos suelos son considerados por la SEMARNAT (2002) como medianamente pobre y rico, respectivamente. La relación C/N del S1 (12.5) se encuentra en el rango óptimo de suelos fértiles y en el S2 la relación C/N (41) se encuentra muy alta por lo que indica poca descomposición de restos orgánicos y una alta competencia de los microorganismos por el nitrógeno disponible (Porta *et al.*, 1999).

En la textura domina la textura gruesa en todos los suelos, con 44% en el S1 hasta 78.2% en el S2. La textura gruesa en el suelo lo hace ser ligero, falto de cohesión, fácil de trabajar y con frecuencia con tendencia a la aridez (Duchaufour, 1978).

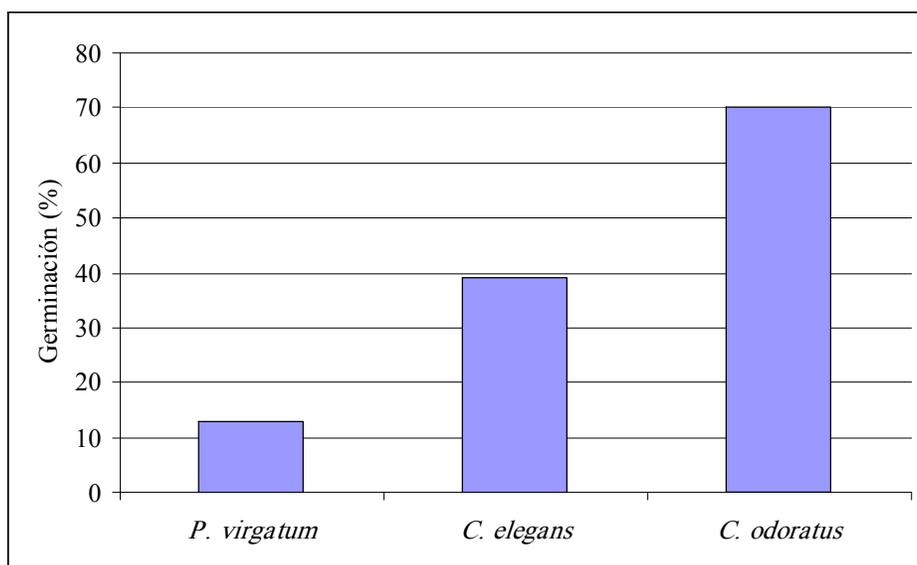
El S1 tiene la mayor cantidad de arcillas con 22.4% disminuyendo hacia el S2 con 7.6%. El limo sigue la misma tendencia, en el S1 tienen mayor proporción con 33.6% y 14.2% en el S2. Martínez (2000) encontró que la adición de combustóleo, diesel y gasolina a suelos a una concentración de 150,000 ppm modifica la lectura de la textura. Por lo que el S2, que se encuentra contaminado e intemperizado es difícil conocer su textura real.

La densidad aparente y la densidad real así como la porosidad disminuyen al aumentar las arenas, obteniéndose 56.85% en el S1 hasta 30.4% en el S2.

La cantidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos aumenta al incrementarse la concentración de hidrocarburos desde  $1.5 \times 10^1$  microorganismos/g en S1 hasta  $4.5 \times 10^3$  microorganismos/g en S2. La mayor cantidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos, es una respuesta típica de suelos contaminados con hidrocarburos (Wise y Trantolo, 1994). En zonas no contaminadas con hidrocarburos generalmente los microorganismos degradadores de hidrocarburo no constituye más del 1% de la comunidad microbiana, sin embargo en suelos contaminados con hidrocarburos los degradadores de hidrocarburo representan el 1 al 10% (Atlas, 1991).

## **7.2 Obtención del índice de germinación de las semillas de las plantas.**

Las especies que más éxito obtuvo en la germinación (gráfica 1) fue *C. odoratus* con un 70% en promedio, seguida de *C. elegans* con un 39% y *P. virgatum* con un porcentaje de 13%. *C. odoratus* y *C. elegans* iniciaron la aparición de la radícula a los siete días y *P. virgatum* a los 15 días.



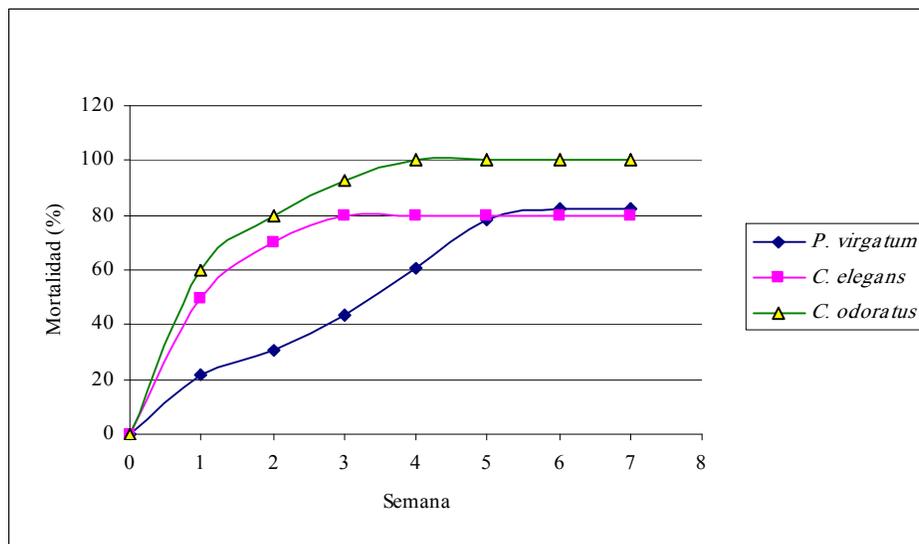
**Gráfica 1 Viabilidad de las semillas de las tres especies de plantas.**

Los porcentajes de germinación son bajos en comparación de los obtenidos para *C. elegans* por Guerrero (2000) del 100%, Alonso (2002) de 86% y Ortiz (2001) del 75%. Tal vez esto se deba a la edad de la semilla, las condiciones medioambientales de almacenamiento o a la presencia de patógenos (Robson *et al.*, 2003). *P. virgatum* obtuvo el menor porcentaje de germinación, lo cual es común en las plantas nativas, por los mecanismos de latencia que aseguran la germinación en el hábitat adecuado y el tiempo oportuno (Robson *et al.*, 2003).

### **7.3 Efecto de los hidrocarburos en el suelo sobre la mortalidad de las plantas.**

A continuación se presentan los resultados obtenidos del uso de las plántulas de cuatro semanas germinadas en suelo contaminado S2 (221,347 ppm de HTP). Los resultados se muestran en la gráfica 2 en donde se observa un porcentaje de mortalidad para *C.*

*odoratus* en la primera semana del 60% y del 100% a partir de la cuarta semana, para *C. elegans* se observó una mortalidad del 52% a partir de la primera semana y del 80% a partir de la tercera semana y para *P. virgatum* se obtuvo una mortalidad del 20% en la primera semana y del 80% a partir de la quinta semana. Obsérvese una marcada resistencia en las primeras cuatro semanas de *P. virgatum*.



**Gráfica 2. Porcentaje de mortalidad de las tres especies de plantas en el suelo contaminado S2.**

Las plantas sobrevivientes de *C. elegans* y de *P. virgatum* redujeron su crecimiento en 90% y 60% respectivamente (tabla 5), por lo que el tratamiento S2 es tóxico para las plantas.

**Tabla 5. Altura de las plantas de *P. virgatum* y *C. elegans* en la semana siete.**

	Altura en S2	Altura en S1	% de reducción del crecimiento
<i>P. virgatum</i>	1.57 cm	4 cm	60%
<i>C. elegans</i>	1.44 cm	15 cm	90%

Algunos factores del S2 que influyen son: la hidrofobicidad del suelo, el pH de 3.3 extremadamente ácido, poca aireación y baja disponibilidad del agua debido a las altas concentraciones de hidrocarburo (más del 22%), además la relación C/N (41) es muy alta existiendo una competencia de las plantas con los microorganismos por el nitrógeno.

La cantidad de HTP presentes en el S2 (221,347 ppm) sobrepasa el límite de la norma; NOM-EM-ECOL-2002 que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, establece un límite máximo de 1,000 ppm de HTP.

Es importante mencionar que el S2 fue homogenizado y tamizado evitando la aglomeración de los hidrocarburos y así aumentado el contacto de éstos con las plantas. Las plantas *C. elegans*, *C. odoratus* y *P. virgatum* se desarrollan en el sureste de México en suelos contaminados de hidrocarburos del petróleo en concentraciones de 100,000 a 434,000 ppm de HTP (Gallegos *et al.*, 2000). El hidrocarburo en estos suelos se encuentra en la parte superficial en los primeros treinta centímetros en un estrato no homogéneo. Esto contradice los resultados de sobrevivencia y crecimiento obtenidos en esta tesis, en la cual a 221,347 ppm de HTP es tóxico para las plantas *C. elegans*, *C. odoratus* y *P. virgatum*. Probablemente porque los hidrocarburos están repartidos de

manera homogénea y no en la superficie; provocando que las raíces no pueden tomar sus nutrientes.

#### **7.4 Tolerancia de *Cyperus elegans* a diferentes concentraciones de hidrocarburos en suelos contaminados.**

De acuerdo con los resultados obtenidos anteriormente se realizaron mezclas del suelo S1 con el S2, (véase tabla 4) las diluciones obtenidas fueron las siguientes:

0 (100 % del S1)

5 (5% del S2 y 95% del S1)

10 (10% del S2 y 90% del S1)

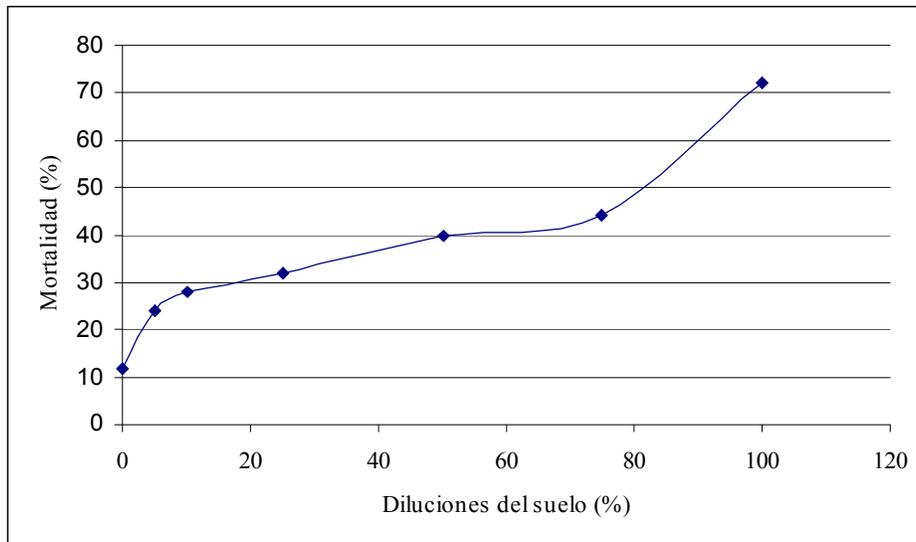
25 (25% del S2 y 75% del S1)

50 (50% del S2 y 50% del S1)

75 (75% del S2 y 25% del S1) y

100 (100% del S2).

Se utilizaron plantas de cuatro semanas, originadas de semillas, de la especie de *C. elegans*, ya que es una de las dos plantas que mostraron menor porcentaje de mortalidad. En la gráfica 3 se observa un aumento de la mortalidad al aumentar la cantidad de hidrocarburos. En la dilución 75% del S2 y 25% del S1, se obtuvo un 42% de mortalidad. *C. odoratus* y *P. virgatum* no fueron evaluadas, por la falta de germoplasma.



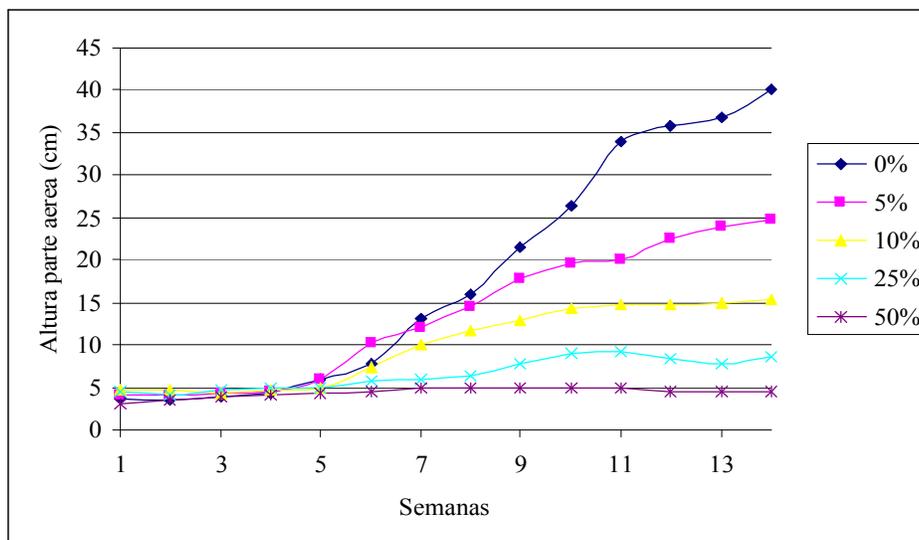
**Gráfica 3. Porcentaje de la mortalidad de *Cyperus elegans* a diferentes diluciones de suelo.**

Con base en estos datos para el estudio de fitorremediación, de las tres especies, se decidió continuar con las diluciones de suelo hasta un 50% del S1 y 50% del S2 (98,000 ppm) en la que se obtuvo 40% de mortalidad para *C. elegans*, con el fin de evitar la mortalidad de las plantas en el experimento posterior.

Una vez mas se muestra que la tolerancia de las plantas a los hidrocarburos del petróleo depende de la especie y la concentración de los mismos en el suelo, lo mismo se observa en el estudio en donde se evaluó la sobrevivencia de 39 especies de plantas en suelos contaminados con 1% de petróleo crudo y solo 18 especies tuvieron 60% o más de sobrevivencia mientras que en el suelo contaminado con 5% de hidrocarburo solo 10 especies presentaron 60% o más de sobrevivencia (Robson *et al.*, 2003).

### 7.5 Velocidad de crecimiento y longitud total de las plantas seleccionadas en suelos contaminados a diferentes diluciones.

En la gráfica 4 de *P. virgatum* observamos una disminución del crecimiento, al aumentar la cantidad de hidrocarburos ( $p < 0.05$ ), es decir las plantas se ven afectadas en su crecimiento al aumentar la concentración de éstos. La diferenciación de las plantas se inició a partir de la semana 5.



**Grafica 4. Crecimiento de *P. virgatum* en suelo contaminado a diferentes diluciones.**

*P. virgatum* obtuvo 40.1 cm en la dilución cero, y la altura menor para esta misma especie fue de 4.4 cm en la dilución del 50% con un 89% de reducción (tabla 6) del crecimiento de la parte aérea.

En la tabla 6 se observa que a partir de las diluciones del 10%, las plantas de las tres especies se ven afectadas en más de un 50 % de su crecimiento de la parte aérea, esta dilución corresponde a la concentración de 22,712 ppm de HTP.

**Tabla 6. Porcentaje de reducción de la parte aérea de las tres especies.**

Por ciento de dilución del suelo contaminado	Longitud de la parte aérea de la planta (cm.)	Porcentaje de reducción del crecimiento de la parte aérea de la planta (%)	Longitud de la parte aérea de la planta (cm.)	Porcentaje de reducción del crecimiento de la parte aérea de la planta (%)	Longitud de la parte aérea de la planta (cm.)	Porcentaje de reducción del crecimiento de la parte aérea de la planta (%)
	<i>P. virgatum</i>		<i>C. elegans</i>		<i>C. odoratus</i>	
0	40.1	N.A.	30.3	N.A.	38.8 cm	N.A.
5	24.8	38.1	20.3	32.9	28.1 cm	27.4
10	15.4	61.7	13.4	55.8	18.6 cm	51.9
25	8.6	78.6	12.8	57.6	9.4 cm	75.8
50	4.4	89.0	2.7	91.2	0.5 cm	98.7

N.A. no aplica.

Nota: el cien porciento es la longitud de la parte aérea en la concentración cero.

De acuerdo a los resultados del análisis estadístico mostrados en la tabla 7, se observa que existe diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el desarrollo de la parte aérea de la planta en el suelo sin hidrocarburos con respecto a los suelos con diferentes diluciones, lo cual indica que la presencia de hidrocarburos en el suelo reduce el crecimiento aéreo de la planta *P. virgatum*. Con respecto a los resultados obtenidos para las diferentes concentraciones de hidrocarburos en el suelo, se observó que entre las diluciones 5% y 10% no hay diferencia estadísticamente significativa al igual que entre las de 10 y 25%. Sin embargo el valor de las diferencias de las medias es menor para las diluciones de suelo de 5% y 10% lo cual significa que el desarrollo de la parte aérea de la planta es mejor en éstas diluciones. *P. virgatum* presentó un buen desarrollo de la parte aérea hasta la dilución 5%. Con un desarrollo menor se encuentra la dilución de 25% aunque no existe diferencia estadísticamente significativa con la dilución de 10%.

**Tabla 7. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la parte aérea de *P. virgatum***

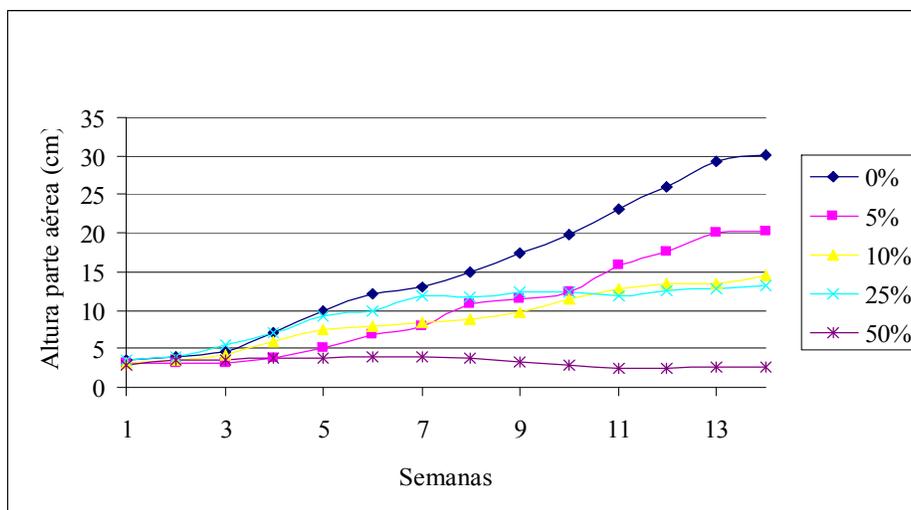
**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: LONGITUD  
HSD de Tukey

(I) CONCENT	(J) CONCENT	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	15.2750*	3.179	.002	5.4599	25.0901
	10.00	24.7250*	3.179	.000	14.9099	34.5401
	25.00	31.5250*	3.179	.000	21.7099	41.3401
	50.00	35.6750*	3.179	.000	25.8599	45.4901
5.00	.00	-15.2750*	3.179	.002	-25.0901	-5.4599
	10.00	9.4500	3.179	.062	-.3651	19.2651
	25.00	16.2500*	3.179	.001	6.4349	26.0651
	50.00	20.4000*	3.179	.000	10.5849	30.2151
10.00	.00	-24.7250*	3.179	.000	-34.5401	-14.9099
	5.00	-9.4500	3.179	.062	-19.2651	.3651
	25.00	6.8000	3.179	.255	-3.0151	16.6151
	50.00	10.9500*	3.179	.025	1.1349	20.7651
25.00	.00	-31.5250*	3.179	.000	-41.3401	-21.7099
	5.00	-16.2500*	3.179	.001	-26.0651	-6.4349
	10.00	-6.8000	3.179	.255	-16.6151	3.0151
	50.00	4.1500	3.179	.692	-5.6651	13.9651
50.00	.00	-35.6750*	3.179	.000	-45.4901	-25.8599
	5.00	-20.4000*	3.179	.000	-30.2151	-10.5849
	10.00	-10.9500*	3.179	.025	-20.7651	-1.1349
	25.00	-4.1500	3.179	.692	-13.9651	5.6651

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

En el caso de *C. elegans* se observó, una disminución del crecimiento de la parte aérea de la planta, al aumentar la dilución de suelos (gráfica 5), es decir las plantas se ven afectadas en su crecimiento aéreo al aumentar la concentración de hidrocarburos. El crecimiento de las plantas inició a diferenciarse a partir de la semana 3.



**Gráfica 5 Crecimiento de *C. elegans* en suelo contaminado a diferentes porcentajes de dilución.**

La altura máxima para *C. elegans* fue de 30.3 cm en el suelo S1 (gráfica 5) y la menor fue de 2.7 cm en la dilución 50%. Para *C. elegans* la altura de las plantas fue similar hasta la tercera semana. La menor reducción de la parte aérea, del 32.9% (tabla 6) se obtuvo en el suelo con la dilución 5% y la mayor del 91.2% en la dilución 50%. Los resultados del análisis estadístico del crecimiento aéreo de las plantas de *C. elegans* (tabla 8), muestran que hay una diferencia significativa del crecimiento de las plantas en los suelos con hidrocarburos con respecto al suelo sin hidrocarburos. Conforme aumenta la dilución de suelo contaminado se reduce el crecimiento de la planta y los efectos mayores se observan en las diluciones mayores al 5%. Entre las diluciones del 10% y 25% (tabla 8), que corresponden a 22,712 ppm y 49,054 ppm de HTP (métodoIMP-QA-620) respectivamente, no hay diferencias significativas y el crecimiento de ambas plantas fue muy similar a partir de la semana diez. Con respecto a la longitud de la parte aérea las plantas se desempeñan bien hasta la dilución del 25 %. Guerrero (2000) encontró para *C. elegans* con suelos contaminados de hidrocarburos a

diferentes diluciones una disminución en el tamaño y en la cantidad de biomasa de las plantas analizadas en comparación con las testigo.

**Tabla 8. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la parte aérea de *C. elegans*.**

**Comparaciones múltiples**

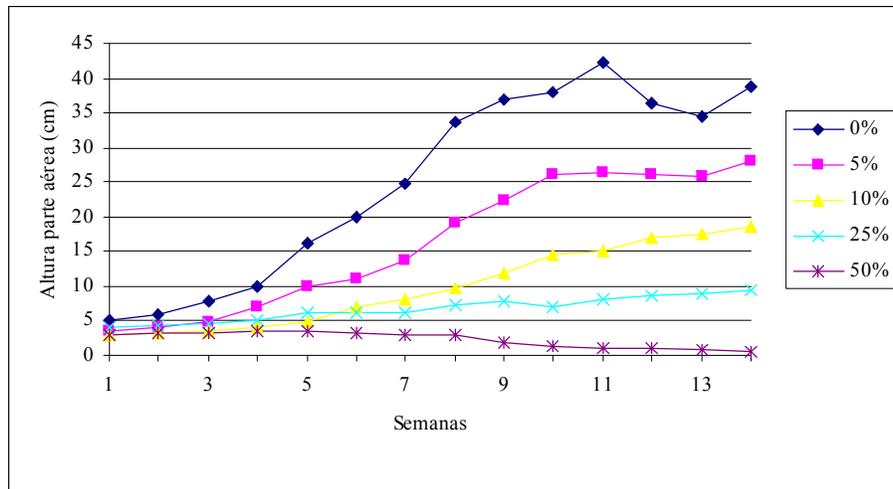
Variable dependiente: LPA  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Limite inferior	Limite superior
.00	5.00	9.3750*	1.537	.000	4.6287	14.1213
	10.00	16.7500*	1.537	.000	12.0037	21.4963
	25.00	18.0000*	1.537	.000	13.2537	22.7463
	50.00	28.6250*	1.537	.000	23.8787	33.3713
5.00	.00	-9.3750*	1.537	.000	-14.1213	-4.6287
	10.00	7.3750*	1.537	.002	2.6287	12.1213
	25.00	8.6250*	1.537	.000	3.8787	13.3713
10.00	50.00	19.2500*	1.537	.000	14.5037	23.9963
	.00	-16.7500*	1.537	.000	-21.4963	-12.0037
	5.00	-7.3750*	1.537	.002	-12.1213	-2.6287
25.00	10.00	1.2500	1.537	.922	-3.4963	5.9963
	50.00	11.8750*	1.537	.000	7.1287	16.6213
	.00	-18.0000*	1.537	.000	-22.7463	-13.2537
50.00	5.00	-8.6250*	1.537	.000	-13.3713	-3.8787
	10.00	-1.2500	1.537	.922	-5.9963	3.4963
	50.00	10.6250*	1.537	.000	5.8787	15.3713
50.00	.00	-28.6250*	1.537	.000	-33.3713	-23.8787
	5.00	-19.2500*	1.537	.000	-23.9963	-14.5037
	10.00	-11.8750*	1.537	.000	-16.6213	-7.1287
	25.00	-10.6250*	1.537	.000	-15.3713	-5.8787

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Para *C. odoratus* en la gráfica 6 se observa una disminución del crecimiento, al aumentar la cantidad hidrocarburos ( $p < 0.05$ ), es decir las plantas se ven afectadas en su crecimiento al aumentar la dilución de éstos.

En el suelo S1 de referencia, la altura máxima de *C. odoratus* se obtuvo en la semana 11. En el suelo con 50% del S1 y 50% del S2 las plantas de *C. odoratus* mueren a partir de la octava semana. La menor reducción de la parte aérea del 27.4%, se obtuvo en la dilución 5%.



**Gráfica 6. Crecimiento de *C. odoratus* en suelo contaminado a diferentes diluciones de suelo.**

La diferencia marcada en el crecimiento a partir de la segunda semana de *C. odoratus* (gráfica 6) con respecto al suelo no contaminado indica que la presencia de hidrocarburo disminuye la madurez más rápido que las otras dos especies. *P. virgatum* se vio afectada hasta la semana 5, siendo más tolerante que *C. elegans* en la cual la diferencia en el crecimiento se inició en la tercera semana.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico de los resultados obtenidos de la longitud aérea de la planta (tabla 9), la presencia de hidrocarburos en el suelo reduce el desarrollo de la parte aérea de la planta, ya que existe diferencia significativa del suelo sin hidrocarburos con respecto a los suelos que si los tienen en diferentes diluciones del suelo. Los suelos contaminados en las diluciones de 5% y 10% no presentan diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ), y son en las que existen las menores diferencias con respecto al suelo no contaminado, S1.

**Tabla 9. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la parte aérea de *C. odoratus*.**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: LPA  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	11.5000*	2.102	.001	5.0104	17.9896
	10.00	17.7500*	2.102	.000	11.2604	24.2396
	25.00	27.7500*	2.102	.000	21.2604	34.2396
	50.00	37.2500*	2.102	.000	30.7604	43.7396
5.00	.00	-11.5000*	2.102	.001	-17.9896	-5.0104
	10.00	6.2500	2.102	.062	-.2396	12.7396
	25.00	16.2500*	2.102	.000	9.7604	22.7396
	50.00	25.7500*	2.102	.000	19.2604	32.2396
10.00	.00	-17.7500*	2.102	.000	-24.2396	-11.2604
	5.00	-6.2500	2.102	.062	-12.7396	.2396
	25.00	10.0000*	2.102	.002	3.5104	16.4896
	50.00	19.5000*	2.102	.000	13.0104	25.9896
25.00	.00	-27.7500*	2.102	.000	-34.2396	-21.2604
	5.00	-16.2500*	2.102	.000	-22.7396	-9.7604
	10.00	-10.0000*	2.102	.002	-16.4896	-3.5104
	50.00	9.5000*	2.102	.003	3.0104	15.9896
50.00	.00	-37.2500*	2.102	.000	-43.7396	-30.7604
	5.00	-25.7500*	2.102	.000	-32.2396	-19.2604
	10.00	-19.5000*	2.102	.000	-25.9896	-13.0104
	25.00	-9.5000*	2.102	.003	-15.9896	-3.0104

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

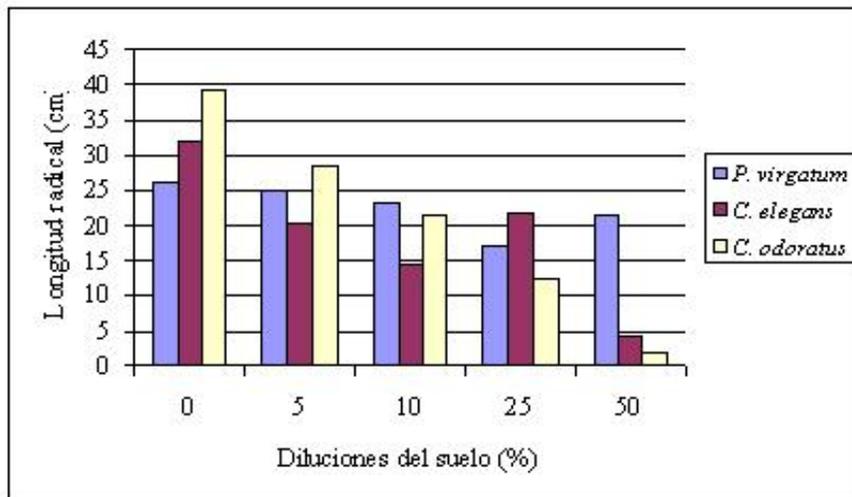
Los resultados anteriores coinciden con los obtenidos en experimentos realizados con plantas de alfalfa crecidas en suelo contaminado con petróleo crudo a una concentración de 20,000 ppm de HTP, los cuales demostraron un crecimiento más lento y mayor tiempo para madurar que aquellas crecidas en el suelo no contaminado (Wiltse *et al.*, 1998). Lo mismo ocurrió con *C. laxus* y *E. colonum* en suelos contaminados con hidrocarburos de 0 a 200,000 ppm de HTP, en donde la tasa de crecimiento disminuye al aumentar la concentración de hidrocarburos (Gallegos *et al.*, 2000).

En plantas de alfalfa crecidas en suelo contaminado con petróleo crudo a una concentración de 20,000 ppm de HTP se encontró una reducción del 8.7% en la altura de las plantas (Wiltse *et al.*, 1998). En esta tesis se encontró una disminución mínima en la dilución 5% de 27.4% en *C. odoratus* (tabla 6).

### 7.6 Longitud radical (LR).

*P. virgatum* fue la que obtuvo la mayor LR de 22.45 cm en promedio en todas las diluciones seguida de *C. odoratus* y *C. elegans*, respectivamente (tabla 10).

En este parámetro hubo mayor diferencia en la fenología de *P. virgatum* (gráfica 7) la mayor reducción en la longitud de la raíz comparada con el suelo S1 fue de 34% en la dilución 25%.



Grafica 7. Longitud radical de las tres especies de plantas a diferentes diluciones.

Tabla 10. Porcentaje de reducción de la longitud radical de *P. virgatum*, *C. elegans* y *C. odoratus*.

N.A. no aplica.

Nota: el cien porciento es la longitud radical en la concentración cero.

% de dilución	<i>P. virgatum</i> (cm)	% de reducción.	<i>C. elegans</i> (cm)	% de reducción.	<i>C. odoratus</i> (cm)	% de reducción.
0	26	N.A.	32	N.A.	39.3	N.A.
5	24.8	4.8	20.1	37.1	28.5	27.4
10	23	11.5	14.5	54.7	21.4	45.5
25	17.2	34.0	21.9	31.6	12.5	68.2
50	21.4	17.8	4.3	86.7	2	94.9

Los resultados estadísticos para *P. virgatum* hubo una disminución de la LR al aumentar la cantidad de hidrocarburos ( $p < 0.05$ ) no se encontraron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las diluciones de 5% con 10% y 5% con 25% (tabla 11), sin embargo la dilución de 5% es la de menor diferencia con respecto al suelo sin hidrocarburos y es donde se encontró el mayor crecimiento radical de las plantas en los suelos con hidrocarburos.

Para *C. elegans*, la longitud radical máxima obtenida fue de 32 cm en el S1 y la menor con 4.3 en dilución 50%. Los resultados del análisis estadístico (tabla 12), muestran diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el suelo sin hidrocarburos y suelos con hidrocarburos, por lo que la presencia de éstos contaminantes en el suelo reducen el crecimiento radical. La menor de las diferencias de la longitud radical con respecto al suelo sin hidrocarburos se encontró en la dilución 5%, no obstante que entre los suelos con diluciones 5%, 10% y 25% no hay diferencias significativas, lo que indique una mayor resistencia de la raíz a los hidrocarburos en esas diluciones.

Tabla 11. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la raíz de *P.*

*virgatum*

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: LR

HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	1.2500	2.350	.983	-6.0056	8.5056
	10.00	3.0000	2.350	.709	-4.2556	10.2556
	25.00	8.8750*	2.350	.013	1.6194	16.1306
	50.00	4.6250	2.350	.326	-2.6306	11.8806
5.00	.00	-1.2500	2.350	.983	-8.5056	6.0056
	10.00	1.7500	2.350	.942	-5.5056	9.0056
	25.00	7.6250*	2.350	.037	.3694	14.8806
	50.00	3.3750	2.350	.615	-3.8806	10.6306
10.00	.00	-3.0000	2.350	.709	-10.2556	4.2556
	5.00	-1.7500	2.350	.942	-9.0056	5.5056
	25.00	5.8750	2.350	.143	-1.3806	13.1306
	50.00	1.6250	2.350	.955	-5.6306	8.8806
25.00	.00	-8.8750*	2.350	.013	-16.1306	-1.6194
	5.00	-7.6250*	2.350	.037	-14.8806	-.3694
	10.00	-5.8750	2.350	.143	-13.1306	1.3806
	50.00	-4.2500	2.350	.404	-11.5056	3.0056
50.00	.00	-4.6250	2.350	.326	-11.8806	2.6306
	5.00	-3.3750	2.350	.615	-10.6306	3.8806
	10.00	-1.6250	2.350	.955	-8.8806	5.6306
	25.00	4.2500	2.350	.404	-3.0056	11.5056

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tabla 12. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la raíz de *C. elegans*.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: LRADICAL  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	11.8750*	2.289	.001	4.8080	18.9420
	10.00	17.5000*	2.289	.000	10.4330	24.5670
	25.00	10.1250*	2.289	.004	3.0580	17.1920
	50.00	27.7500*	2.289	.000	20.6830	34.8170
5.00	.00	-11.8750*	2.289	.001	-18.9420	-4.8080
	10.00	5.6250	2.289	.153	-1.4420	12.6920
	25.00	-1.7500	2.289	.937	-8.8170	5.3170
	50.00	15.8750*	2.289	.000	8.8080	22.9420
10.00	.00	-17.5000*	2.289	.000	-24.5670	-10.4330
	5.00	-5.6250	2.289	.153	-12.6920	1.4420
	25.00	-7.3750*	2.289	.039	-14.4420	-.3080
	50.00	10.2500*	2.289	.003	3.1830	17.3170
25.00	.00	-10.1250*	2.289	.004	-17.1920	-3.0580
	5.00	1.7500	2.289	.937	-5.3170	8.8170
	10.00	7.3750*	2.289	.039	.3080	14.4420
	50.00	17.6250*	2.289	.000	10.5580	24.6920
50.00	.00	-27.7500*	2.289	.000	-34.8170	-20.6830
	5.00	-15.8750*	2.289	.000	-22.9420	-8.8080
	10.00	-10.2500*	2.289	.003	-17.3170	-3.1830
	25.00	-17.6250*	2.289	.000	-24.6920	-10.5580

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Con respecto a los resultados del análisis estadístico de *C. odoratus* (tabla 13), se observa también que existe diferencia significativa entre el suelo sin hidrocarburos y los suelos con diferentes diluciones de éstos. Conforme aumenta la cantidad de hidrocarburos en el suelo, la diferencia entre las medias de la longitud de la raíz son mayores, con respecto al suelo sin hidrocarburos lo que demuestra que al aumentar la cantidad de éstos en el suelo se reduce el crecimiento de la raíz.

Tabla 13. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) de la longitud de la raíz de *C. odoratus*

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: LONGRAD  
HSD de Tukey

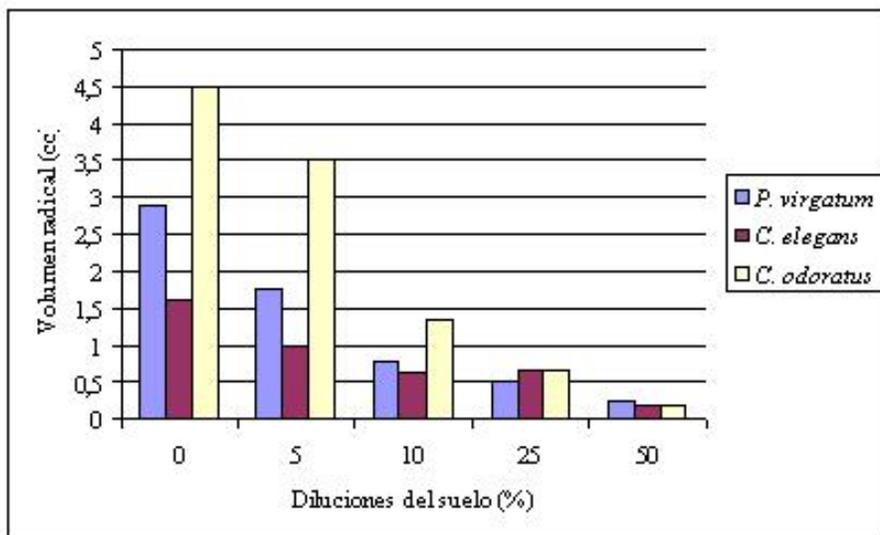
(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	10.7500*	1.790	.000	5.2225	16.2775
	10.00	17.8750*	1.790	.000	12.3475	23.4025
	25.00	26.8750*	1.790	.000	21.3475	32.4025
	50.00	37.2500*	1.790	.000	31.7225	42.7775
5.00	.00	-10.7500*	1.790	.000	-16.2775	-5.2225
	10.00	7.1250*	1.790	.009	1.5975	12.6525
	25.00	16.1250*	1.790	.000	10.5975	21.6525
	50.00	26.5000*	1.790	.000	20.9725	32.0275
10.00	.00	-17.8750*	1.790	.000	-23.4025	-12.3475
	5.00	-7.1250*	1.790	.009	-12.6525	-1.5975
	25.00	9.0000*	1.790	.001	3.4725	14.5275
	50.00	19.3750*	1.790	.000	13.8475	24.9025
25.00	.00	-26.8750*	1.790	.000	-32.4025	-21.3475
	5.00	-16.1250*	1.790	.000	-21.6525	-10.5975
	10.00	-9.0000*	1.790	.001	-14.5275	-3.4725
	50.00	10.3750*	1.790	.000	4.8475	15.9025
50.00	.00	-37.2500*	1.790	.000	-42.7775	-31.7225
	5.00	-26.5000*	1.790	.000	-32.0275	-20.9725
	10.00	-19.3750*	1.790	.000	-24.9025	-13.8475
	25.00	-10.3750*	1.790	.000	-15.9025	-4.8475

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

En otros estudios de fitorremediación se encontró la disminución de la raíces de *Hydrocotyle ranunculoides* en suelos contaminados con diesel con diferencias significativas en las concentraciones de 10,000; 15,000 y 20,000 ppm, a mayor concentración menor longitud de la raíz (Damián, 1999). En la mayor parte de los casos, la contaminación de suelos que origina un pH bajo inhibe el crecimiento de la longitud de la raíz al aumentar la disponibilidad de aluminio (Barceló y Poschenrieder, 1989).

## 7.7 Volumen radical (VR).

De acuerdo con los resultados obtenidos (gráfica 8, tabla14), el volumen radical de las tres especies de plantas se ve afectado a partir de la dilución del 10% de hidrocarburos en el suelo ya que se observa una reducción mayor al 60% del volumen radical con respecto al obtenido en el suelo sin hidrocarburos.



Gráfica 8. Volumen radical de las tres especies a diferentes diluciones.

Tabla 14. Porcentaje de reducción del volumen radical.

Diluciones (%)	<i>P. virgatum</i> Volumen radical (cc)	% de reducción radical	<i>C. elegans</i> Volumen radical (cc)	% de reducción radical	<i>C. odoratus</i> Volumen radical (cc)	% de reducción radical
0	2.88	N.A.	1.6	N.A.	4.5	N.A.
5	1.75	39.1	1	37.5	3.5	22.2
10	0.78	73.0	0.6	60.9	1.4	70.0
25	0.50	82.6	0.7	59.4	0.7	85.0
50	0.25	91.3	0.2	87.5	0.2	95.6

N.A. no aplica.

Nota: el cien porciento es volumen en la concentración cero.

En el caso de *P. virgatum*, se observó (tabla 14, gráfica 8), que la presencia de hidrocarburos en el suelo afecta el volumen radical de la planta, ya que al aumentar la cantidad de hidrocarburos en el suelo, disminuye el volumen radical. Con una probabilidad de  $p < 0.05$ , el volumen radical con menor diferencia con respecto al suelo no contaminado y el mayor de los suelos con hidrocarburos, se observó en el suelo de la dilución 5%. En las diluciones de 10%, 25% y 50%, el volumen radical no presenta diferencias estadísticamente significativas, por lo que al aumentar la concentración de hidrocarburos en el suelo el volumen radical, como índice del desarrollo radical no es afectado de forma significativa (tabla 15).

**Tabla 15. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del volumen radical de *P. virgatum*.**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: VOLRADPA  
HSD de Tukey

(I) CNCNTRAC	(J) CNCNTRAC	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	1.1250*	.270	.006	.2897	1.9603
	10.00	2.1000*	.270	.000	1.2647	2.9353
	25.00	2.3750*	.270	.000	1.5397	3.2103
	50.00	2.6250*	.270	.000	1.7897	3.4603
5.00	.00	-1.1250*	.270	.006	-1.9603	-.2897
	10.00	.9750*	.270	.019	.1397	1.8103
	25.00	1.2500*	.270	.003	.4147	2.0853
	50.00	1.5000*	.270	.000	.6647	2.3353
10.00	.00	-2.1000*	.270	.000	-2.9353	-1.2647
	5.00	-.9750*	.270	.019	-1.8103	-.1397
	25.00	.2750	.270	.844	-.5603	1.1103
	50.00	.5250	.270	.339	-.3103	1.3603
25.00	.00	-2.3750*	.270	.000	-3.2103	-1.5397
	5.00	-1.2500*	.270	.003	-2.0853	-.4147
	10.00	-.2750	.270	.844	-1.1103	.5603
	50.00	.2500	.270	.883	-.5853	1.0853
50.00	.00	-2.6250*	.270	.000	-3.4603	-1.7897
	5.00	-1.5000*	.270	.000	-2.3353	-.6647
	10.00	-.5250	.270	.339	-1.3603	.3103
	25.00	-.2500	.270	.883	-1.0853	.5853

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

En el caso de *C. elegans* (tabla 16), también se observa como en el caso anterior que el volumen radical de la planta crecida en los suelos con hidrocarburos, presenta diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al obtenido en el suelo sin hidrocarburos, lo cual indica que la presencia de hidrocarburos en el suelo afecta el desarrollo radical, conforme aumenta la cantidad de hidrocarburos, el volumen radical disminuye.

El mayor volumen radical en los suelos con hidrocarburos se encontró en la dilución 5% y el desarrollo de la raíz en las de 10% y 25% en donde no se observaron diferencias estadísticamente significativas, lo cual indica que en estas diluciones no hay un efecto importante de los hidrocarburos sobre el volumen radical.

En donde se observan diferencias es en la dilución 50%, lo cual indica que en ésta ya hay una afectación al volumen radical por los hidrocarburos a esa concentración en el suelo.

**Tabla 16. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del volumen radical de *C. elegans*.**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: VOLRADCE  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	.6000*	.186	.039	2.575E-02	1.1743
	10.00	.9750*	.186	.001	.4007	1.5493
	25.00	.9500*	.186	.001	.3757	1.5243
	50.00	1.4000*	.186	.000	.8257	1.9743
5.00	.00	-.6000*	.186	.039	-1.1743	-2.57E-02
	10.00	.3750	.186	.305	-.1993	.9493
	25.00	.3500	.186	.367	-.2243	.9243
	50.00	.8000*	.186	.005	.2257	1.3743
10.00	.00	-.9750*	.186	.001	-1.5493	-.4007
	5.00	-.3750	.186	.305	-.9493	.1993
	25.00	-2.50E-02	.186	1.000	-.5993	.5493
	50.00	.4250	.186	.203	-.1493	.9993
25.00	.00	-.9500*	.186	.001	-1.5243	-.3757
	5.00	-.3500	.186	.367	-.9243	.2243
	10.00	2.500E-02	.186	1.000	-.5493	.5993
	50.00	.4500	.186	.163	-.1243	1.0243
50.00	.00	-1.4000*	.186	.000	-1.9743	-.8257
	5.00	-.8000*	.186	.005	-1.3743	-.2257
	10.00	-.4250	.186	.203	-.9993	.1493
	25.00	-.4500	.186	.163	-1.0243	.1243

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Los resultados obtenidos para *C. odoratus* (tabla 17, gráfica 8), muestran que al aumentar la cantidad de hidrocarburos en el suelo, disminuyó el volumen radical.

De acuerdo con los resultados del análisis estadístico (tabla 17), solo existe diferencia estadísticamente significativa del volumen radical del suelo sin hidrocarburos con los suelos con diluciones superiores al 5%. Lo anterior demuestra que para esta especie de planta no hay un efecto sobre el volumen radical en diluciones inferiores al 5%.

Entre las diluciones 10% y 25% como entre esta última y 50%, no hay diferencias y de acuerdo con las diferencias entre sus medias respectivas con la del suelo sin hidrocarburos, en la dilución 10% se observa el volumen radical intermedio entre las bajas y las altas concentraciones de hidrocarburos.

**Tabla 17. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del volumen radical de *C. odoratus*.**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: VOLRACO  
HSD de Tukey

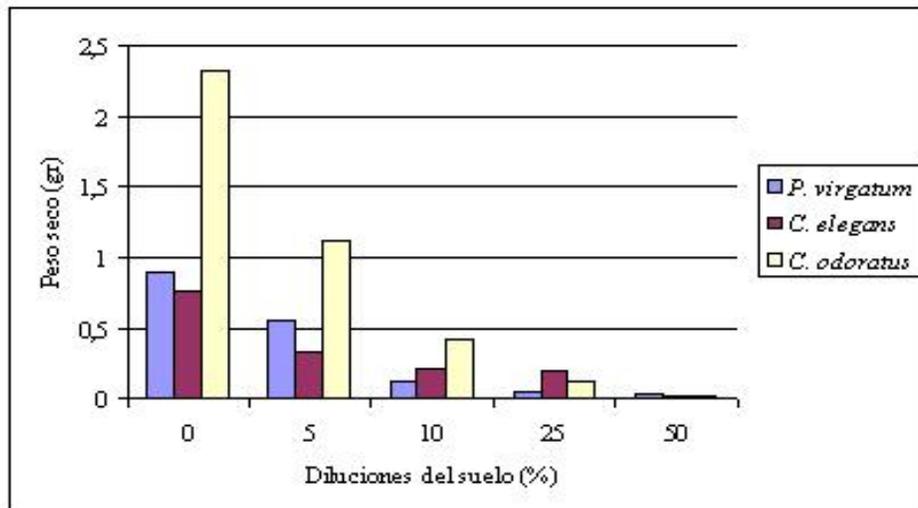
(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Limite inferior	Limite superior
.00	5.00	1.0000	.336	.061	-3.61E-02	2.0361
	10.00	3.1500*	.336	.000	2.1139	4.1861
	25.00	3.8250*	.336	.000	2.7889	4.8611
	50.00	4.3000*	.336	.000	3.2639	5.3361
5.00	.00	-1.0000	.336	.061	-2.0361	3.611E-02
	10.00	2.1500*	.336	.000	1.1139	3.1861
	25.00	2.8250*	.336	.000	1.7889	3.8611
	50.00	3.3000*	.336	.000	2.2639	4.3361
10.00	.00	-3.1500*	.336	.000	-4.1861	-2.1139
	5.00	-2.1500*	.336	.000	-3.1861	-1.1139
	25.00	.6750	.336	.307	-.3611	1.7111
	50.00	1.1500*	.336	.026	.1139	2.1861
25.00	.00	-3.8250*	.336	.000	-4.8611	-2.7889
	5.00	-2.8250*	.336	.000	-3.8611	-1.7889
	10.00	-.6750	.336	.307	-1.7111	.3611
	50.00	.4750	.336	.628	-.5611	1.5111
50.00	.00	-4.3000*	.336	.000	-5.3361	-3.2639
	5.00	-3.3000*	.336	.000	-4.3361	-2.2639
	10.00	-1.1500*	.336	.026	-2.1861	-.1139
	25.00	-.4750	.336	.628	-1.5111	.5611

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Especies de plantas con baja sobrevivencia pero con alta biomasa radical puede ser mas apropiada para la fitorremediación más que aquellos con alta sobrevivencia pero baja biomasa de raíz (Robson *et al.*, 2003) como es en este caso en que *C. odoratus* obtuvo el mayor volumen radical pero con el 100% de mortalidad en el suelo S2 en la semana cuatro y en la dilución 50%, a la semana ocho, obtuvo el 100% de mortalidad.

### 7.8 Peso seco (PS).

Los resultados comparativos entre las tres especies de plantas se observan en la Gráfica 9 y tabla 18. Con relación al peso seco, se observó que el menor porcentaje de reducción en peso de las tres plantas, fue para *P. virgatum* con 38.8% en el suelo a la concentración de 5%, por lo que es la más adaptada. *C. elegans* en las diluciones 10% y 25% los porcentajes de reducción son parecidos lo cual es un comportamiento similar al observado en la longitud radical.



Gráfica 9. Peso seco de las tres especies a diferentes diluciones.

**Tabla 18. Porcentaje de reducción de peso seco de las plantas.**

Dilución (%)	<i>P. virgatum</i> Peso(grs)	% de reducción.	<i>C. elegans</i> Peso(grs)	% de reducción	<i>C. odoratus</i> Peso(grs)	% de reducción
0	0.90	N.A.	0.76	N.A.	2.32	N.A.
5	0.55	38.80	0.33	56.5	1.11	52.3
10	0.12	86.4	0.21	72.3	0.41	82.3
25	0.06	93.9	0.20	73.4	0.13	94.4
50	0.04	95.3	0.03	96.2	0.03	98.8

Nota: el cien porciento es el peso en la concentración cero.  
N.A. no aplica.

En el caso de *P. virgatum*, el peso seco de planta disminuye conforme aumenta la cantidad de hidrocarburos en el suelo. En las diluciones 10% y 25% no hay diferencia significativa y por lo tanto ya no se observa un efecto sobre el peso de la planta a esas diluciones (tabla 19).

Tabla 19. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del peso seco de *P virgatum*.

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: PESOPASP  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	.3572*	.105	.028	3.261E-02	.6817
	10.00	.7742*	.105	.000	.4496	1.0988
	25.00	.8411*	.105	.000	.5165	1.1657
	50.00	.8171*	.105	.000	.4925	1.1416
5.00	.00	-.3572*	.105	.028	-.6817	-3.26E-02
	10.00	.4170*	.105	.009	9.246E-02	.7416
	25.00	.4839*	.105	.003	.1594	.8085
	50.00	.4599*	.105	.004	.1353	.7845
10.00	.00	-.7742*	.105	.000	-1.0988	-.4496
	5.00	-.4170*	.105	.009	-.7416	-9.25E-02
	25.00	6.690E-02	.105	.967	-.2577	.3915
	50.00	4.288E-02	.105	.994	-.2817	.3674
25.00	.00	-.8411*	.105	.000	-1.1657	-.5165
	5.00	-.4839*	.105	.003	-.8085	-.1594
	10.00	-6.69E-02	.105	.967	-.3915	.2577
	50.00	-2.40E-02	.105	.999	-.3486	.3005
50.00	.00	-.8171*	.105	.000	-1.1416	-.4925
	5.00	-.4599*	.105	.004	-.7845	-.1353
	10.00	-4.29E-02	.105	.994	-.3674	.2817
	25.00	2.403E-02	.105	.999	-.3005	.3486

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

En *C. elegans*, también se observó que al aumentar la cantidad de hidrocarburos en el suelo, disminuyó el peso ( $p < 0.05$ ) de la planta y entre las diluciones 10% y 25% no hubo diferencia significativa (tabla 20).

Guerrero (2000) encontró para *C. elegans* con suelos contaminados de hidrocarburos a diferentes diluciones una disminución en el tamaño y en la cantidad de biomasa de las plantas analizadas en comparación con las testigo.

En el caso de *C. odoratus*, al igual que en los dos casos anteriores, que el aumento en la concentración de hidrocarburos en el suelo hasta la dilución 10%, reduce significativamente el peso de las plantas y éste no presenta diferencia significativa con

la dilución 25% (tabla 21), muy probablemente debido a la tolerancia de la planta a esa dilución.

**Tabla 20. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del peso seco de *C. elegans*.**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: PESOSECE  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	.4283*	.064	.000	.2318	.6248
	10.00	.5495*	.064	.000	.3529	.7460
	25.00	.5604*	.064	.000	.3638	.7569
	50.00	.7290*	.064	.000	.5324	.9255
5.00	.00	-.4283*	.064	.000	-.6248	-.2318
	10.00	.1212	.064	.357	-7.54E-02	.3177
	25.00	.1321	.064	.280	-6.45E-02	.3286
	50.00	.3007*	.064	.002	.1041	.4972
10.00	.00	-.5495*	.064	.000	-.7460	-.3529
	5.00	-.1212	.064	.357	-.3177	7.537E-02
	25.00	1.090E-02	.064	1.000	-.1856	.2074
	50.00	.1795	.064	.082	-1.71E-02	.3760
25.00	.00	-.5604*	.064	.000	-.7569	-.3638
	5.00	-.1321	.064	.280	-.3286	6.447E-02
	10.00	-1.09E-02	.064	1.000	-.2074	.1856
	50.00	.1686	.064	.111	-2.80E-02	.3651
50.00	.00	-.7290*	.064	.000	-.9255	-.5324
	5.00	-.3007*	.064	.002	-.4972	-.1041
	10.00	-.1795	.064	.082	-.3760	1.707E-02
	25.00	-.1686	.064	.111	-.3651	2.797E-02

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

La reducción en el peso de la raíz se ha observado con la planta *Lolium perenne* en suelos contaminado con 5,000 ppm de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, durante tres semanas encontraron una reducción del 54% en el peso seco con respecto al control (Günther *et al.*, 1996), y en las plantas de alfalfa se encontró una reducción del 53% en el peso de la raíz cuando ésta creció en suelos contaminados con 20,000 ppm de crudo (Wiltse *et al.*, 1998).

**Tabla 21. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del peso seco de *C. odoratus*.**

**Comparaciones múltiples**

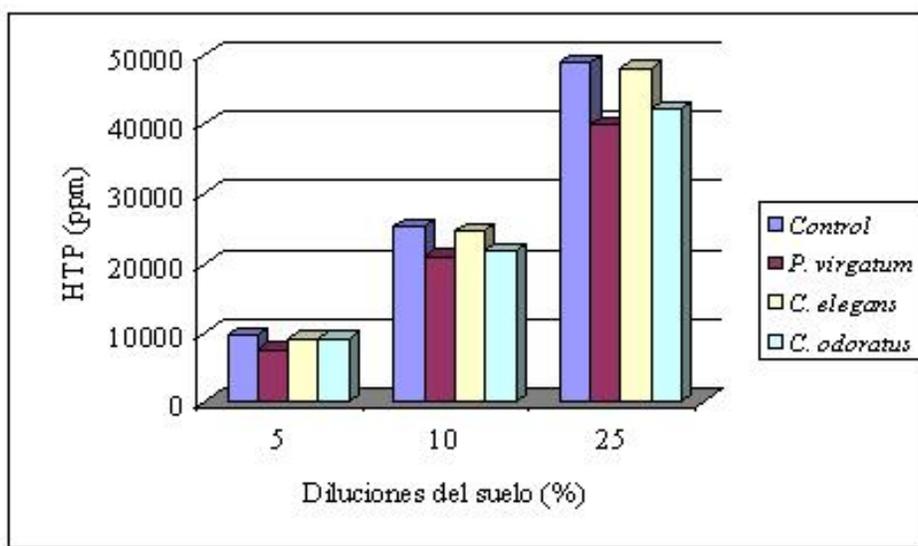
Variable dependiente: PESECO  
HSD de Tukey

(I) CONCENTR	(J) CONCENTR	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
.00	5.00	1.2147*	.137	.000	.7928	1.6365
	10.00	1.9109*	.137	.000	1.4891	2.3327
	25.00	2.1923*	.137	.000	1.7705	2.6141
	50.00	2.2960*	.137	.000	1.8742	2.7178
5.00	.00	-1.2147*	.137	.000	-1.6365	-.7928
	10.00	.6963*	.137	.001	.2745	1.1181
	25.00	.9776*	.137	.000	.5558	1.3994
	50.00	1.0813*	.137	.000	.6595	1.5032
10.00	.00	-1.9109*	.137	.000	-2.3327	-1.4891
	5.00	-.6963*	.137	.001	-1.1181	-.2745
	25.00	.2814	.137	.286	-.1405	.7032
	50.00	.3851	.137	.082	-3.67E-02	.8069
25.00	.00	-2.1923*	.137	.000	-2.6141	-1.7705
	5.00	-.9776*	.137	.000	-1.3994	-.5558
	10.00	-.2814	.137	.286	-.7032	.1405
	50.00	.1037	.137	.938	-.3181	.5255
50.00	.00	-2.2960*	.137	.000	-2.7178	-1.8742
	5.00	-1.0813*	.137	.000	-1.5032	-.6595
	10.00	-.3851	.137	.082	-.8069	3.674E-02
	25.00	-.1037	.137	.938	-.5255	.3181

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

### 7.9 Hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

Con respecto a la reducción de hidrocarburos totales del petróleo al final de las catorce semanas de duración del experimento, no se observaron, con respecto al control sin plantas, diferencias significativas ( $p < 0.05$ ). Sin embargo se observó que de las tres plantas evaluadas, *P. virgatum* obtuvo el mayor porcentaje de reducción de HTP en comparación con cada uno de sus controles respectivos, seguida de *C. odoratus*. *C. elegans* obtuvo la menor reducción con un valor del 1.7% de HTP en la dilución del 25%. La mayor reducción se observó en *P. virgatum* con 22.82% de HTP en la dilución del 5% (tabla 22).



Grafica 10. Hidrocarburos Totales del Petróleo al final del experimento de las tres especies a diferentes diluciones y suelos controles sin planta.

Tabla 22. Porcentaje de hidrocarburo degradado (HTP) comparado con el control sin planta.

Diluci3n (%)	Control	<i>P. virgatum</i> degradado	% degradado	<i>C. elegans</i> degradado	% degradado	<i>C. odoratus</i> degradado	% degradado
5	9,587	7,399	22.8	9,018	5.9	9,134	4
10	25,393	20,891	17.7	24,771	2.4	2,1781	14.2
25	49,054	40,185	18.1	48,206	1.7	42,252	13.9

Los pastos, como en este caso *P. virgatum*, han sido propuestos para fitorremediaci3n de suelos contaminados con hidrocarburos, ya que sus raíces son fibrosas de gran longitud, y más cercanas a la superficie. Las raíces fibrosas proveen gran superficie para la colonizaci3n de microorganismos más que las raíces pivotantes. Esto les permite tener mayor contacto con el contaminante (White *et al.*, 2003).

Guerrero (2000) experimentando con suelos contaminados de hidrocarburos encontró alta actividad de lacasas en las superficie radical de *C. elegans* lo que sugiere que estas enzimas polimerizan o inmovilizan a los contaminantes.

El tiempo utilizado en este experimento fue de catorce semanas la mayoría de los trabajos han sido mayor a este tiempo, no se continuó por más tiempo ya que las macetas eran pequeñas y las plantas, en suelo no contaminado, empezaron a tener, por falta de nutrientes, amarillamiento en las puntas.

En experimentos de Wiltse *et al.*, (1998) con suelos contaminados de petróleo crudo con una concentración de 20,000 ppm de HTP se evaluaron 20 genotipos de la planta *Medicago sativa* y no se encontraron diferencias significativas, en la reducción de hidrocarburos, en seis meses de tratamiento, pero a los 12 meses si las encontraron ( $p < 0.05$ ) degradándose hasta un 56% de hidrocarburos contra 46% en el control sin vegetación. Al final del experimento las plantas mejoraron su desarrollo. Esto fue debido a la disminución de la toxicidad del contaminante por el proceso de la fitorremediación o intemperismo del contaminante. Lo cual no se observo en este trabajo

Los contaminantes presentes en los suelos trabajados, en esta tesis, son en su mayoría compuestos recalcitrantes. En otros estudios se reporta que la composición de los hidrocarburos del petróleo presentes en el suelo de la zona estudiada es la siguiente: alifáticos 40%, asfaltenos 30%, aromáticos 20% y polares 10%. De los aromáticos se

han encontrado: pireno, criseno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno e indeno(1,2,3-c,d)pireno (Uribe *et al.*, 2003).

Experimentos de fitorremediación en laboratorio con *C. odoratus* en suelos contaminados con HAP de la misma zona contaminada de este estudio, durante 6 meses, no mostraron diferencias significativas en la reducción de los HAP (Flores, 2000). Por lo que la degradación de hidrocarburos en este trabajo se debe a hidrocarburos alifáticos que son más fáciles de degradar.

Estudiando la biodegradación de hidrocarburos alifáticos y aromáticos por plantas de *Lolium perenne* utilizando columnas de suelo contaminado con una mezcla en 5,000 ppm de HTP, durante 22 semanas, se obtuvo una degradación de un 85.8% comparado con el control sin planta (Günther *et al.*, 1996).

Experimentos con suelos contaminados de diesel a una concentración de 8,000 ppm de HTP, utilizando las plantas; *Lolium multiflorum* y *Festuca rubra*, durante 10 meses. La degradación de hidrocarburos fue un 73% más que el control (Reynolds *et al.*, 1997).

En suelos contaminados con gasolina con rangos de HTP de 1,700 a 3,600 ppm, se utilizaron las plantas de *Cynodon dactylon*, *Festuca arundinacea* y *Trifolium repens* en 9 meses. Los porcentajes de degradación de hidrocarburos para cada especie de plantas fueron los siguientes: *F. arundinacea* 27%, *T. repens* 24%, *C. dactylon* 23%, sin vegetación 12% (Banks *et al.*, 1997).

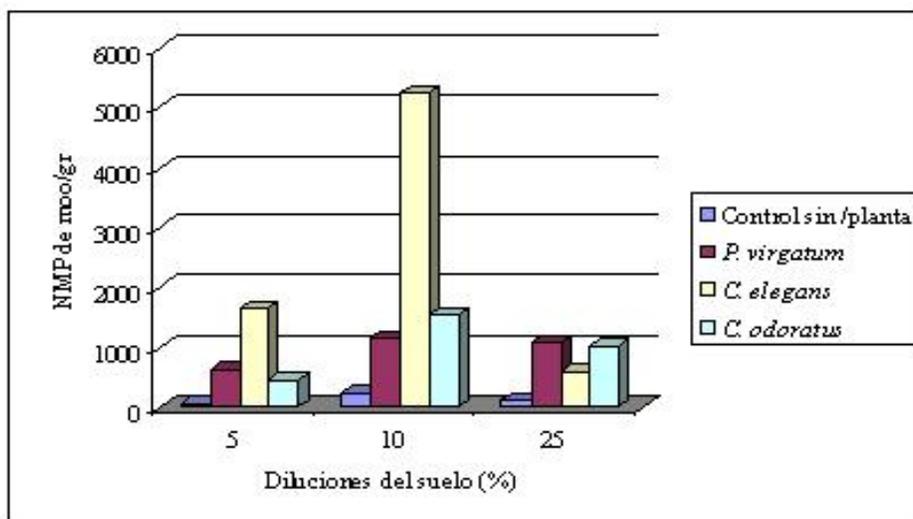
En la mayoría de los trabajos de fitorremediación se utilizan fertilizantes (bioestimulación) para acelerar el proceso de la fitorremediación, en esta tesis no se añadieron fertilizantes. La adición de fertilizantes a los suelos estudiados, incrementaría la degradación de hidrocarburos. La adición de fósforo y nitrógeno permitiría el crecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Sin embargo esto implicaría aumentar el costo de la fitorremediación y si se planea un tratamiento *in situ* se incrementaría la posibilidad de la lixiviación de los nutrientes en zonas tropicales.

#### **7.10 Número más probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos (NMP).**

En la dilución de suelo del 5% hay un aumento en la concentración de microorganismos degradadores de hidrocarburos de *C. elegans*, de dos unidades exponenciales de microorganismos, el mayor, obtenido de las tres plantas (grafica 10, tabla 23). En el resto de las plantas la concentración de microorganismos aumentó de una a dos unidades exponenciales.

En la dilución del 10% se observó un aumento de una unidad exponencial en las tres plantas con respecto al control.

*C. elegans* obtuvo diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) en la dilución 5% (tabla 24) y en la dilución 10% (tabla 25).



s/p suelo sin plantas.

Gráfica 10. Numero Más Probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos de las tres especies a diferentes concentraciones.

Tabla 23. Promedio de Número Más Probable de microorganismos degradadores de hidrocarburo en suelos contaminados.

Dilución (%)	Control sin /planta	Desviación estándar.	<i>P. virgatum</i>	Desviación estándar.	<i>C. elegans</i>	Desviación estándar.	<i>C. odoratus</i>	Desviación estándar.
5	$7.3 \times 10^1$	62	$6.38 \times 10^2$	375	$1.663 \times 10^3$	789	$4.63 \times 10^2$	342
10	$2.5 \times 10^2$	141	$1.133 \times 10^3$	275	$5.250 \times 10^3$	2872	$1.525 \times 10^3$	555
25	$1.09 \times 10^2$	28	$1.075 \times 10^3$	284	$6 \times 10^2$	610	$1.013 \times 10^3$	275

**Tabla 24. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del Número Más Probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos de la dilución 5% .**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: NMP5

HSD de Tukey

(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	2.00	-1590.000*	332.425	.002	-2576.95	-603.0534
	3.00	-390.0000	332.425	.654	-1376.95	596.9466
	4.00	-565.0000	332.425	.365	-1551.95	421.9466
2.00	1.00	1590.0000*	332.425	.002	603.0534	2576.9466
	3.00	1200.0000*	332.425	.016	213.0534	2186.9466
	4.00	1025.0000*	332.425	.041	38.0534	2011.9466
3.00	1.00	390.0000	332.425	.654	-596.9466	1376.9466
	2.00	-1200.000*	332.425	.016	-2186.95	-213.0534
	4.00	-175.0000	332.425	.951	-1161.95	811.9466
4.00	1.00	565.0000	332.425	.365	-421.9466	1551.9466
	2.00	-1025.000*	332.425	.041	-2011.95	-38.0534
	3.00	175.0000	332.425	.951	-811.9466	1161.9466

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tratamiento 1: Suelo sin plantas.

Tratamiento 2: *C elegans*

Tratamiento 3: *C odoratus*.

Tratamiento 4: *P virgatum*

Zermeño *et al.*, (2000) en *C. elegans* encontraron 269 veces más microorganismos degradadores de hidrocarburos en la rizosfera que en el suelo no rizosferico. Dentro de los microorganismos hidrocarbonoclastas fueron identificados los géneros: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Brevibacterium*, *Serratia* y *Candida*.

**Tabla 25. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del Número Más Probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos de la dilución 10% .**

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: NMP10

HSD de Tukey

(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	2.00	-5000.000*	1040.020	.002	-8087.75	-1912.25
	3.00	-1275.000	1040.020	.623	-4362.75	1812.7470
	4.00	-837.5000	1040.020	.851	-3925.25	2250.2470
2.00	1.00	5000.0000*	1040.020	.002	1912.2530	8087.7470
	3.00	3725.0000*	1040.020	.017	637.2530	6812.7470
	4.00	4162.5000*	1040.020	.008	1074.7530	7250.2470
3.00	1.00	1275.0000	1040.020	.623	-1812.75	4362.7470
	2.00	-3725.000*	1040.020	.017	-6812.75	-637.2530
	4.00	437.5000	1040.020	.974	-2650.25	3525.2470
4.00	1.00	837.5000	1040.020	.851	-2250.25	3925.2470
	2.00	-4162.500*	1040.020	.008	-7250.25	-1074.75
	3.00	-437.5000	1040.020	.974	-3525.25	2650.2470

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tratamiento 1: suelo sin planta.

Tratamiento 2: *C. elegans*

Tratamiento 3: *C. odoratus*.

Tratamiento 4: *P. virgatum*

En la dilución del 25%, de *P. virgatum*, hay un aumento de una unidad exponencial, comparado con el control mientras *C. elegans* no hay cambios exponenciales, parece ser afectado por la presencia de hidrocarburos, esto puede que varíe a través del tiempo, también puede estar relacionado con la poca cantidad de hidrocarburos degradados al obtenerse solo 1.7% el más bajo de todos. No existe diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos de la dilución 25%.

En general el número de microorganismos en la rizosfera aumenta con la edad de la planta (Rovira 1979). En trabajos de suelos contaminados con hidrocarburos el patrón de crecimiento fue caracterizado por un sustancial incremento de microorganismos en la semana cinco seguido de una disminución de microorganismos en la semana 22 esto coincide con la rápida disminución de hidrocarburo disponible (Reynols *et al.*, 1997).

El aumento de la actividad microbiana es debido a la presencia de plantas quienes le proporcionan azúcares, hormonas, carbohidratos, etc. a los microorganismos. En el estado de Tabasco se encontró que *P. virgatum* presenta microorganismos con crecimiento abundante de tres cepas de bacterias Gram negativas y los hongos *Aspergillus sp.*, *Paecilomyces sp.*, *Penicillium sp.*, y *Trichoderma spp.*, estos microorganismos toleran y metabolizan al benzo(a)pireno (Rivera-Cruz *et al.*, 2002).

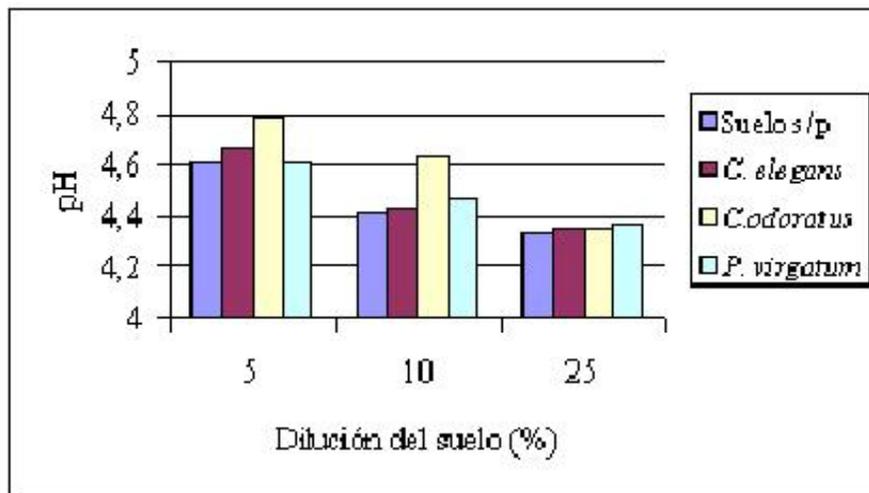
De la diversidad de las comunidades de microorganismos degradadores de hidrocarburo podría sacarse provecho mediante el aislamiento y la identificación de nuevas cepas que sirvieran de inoculantes microbianos (bioaumentación) para siembra de especies vegetales útiles en el proceso de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

#### **7.11 Potencial de hidrógeno (pH).**

*C. odoratus* obtuvo pH mayores que las demás plantas y el control (Grafica 11), también obtuvo el pH mayor en las diluciones 5% y 10% (tabla 26, 27 y 28), con diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ), no se encontraron diferencias estadísticas en la dilución 25% (tabla 29).

Tabla 26. Promedios de los pH de los suelos al final del experimento.

Diluciones (%)	Suelo s/p	desv. estándar	<i>C. elegans</i>	desv. estándar	<i>C.odoratus</i>	desv. estándar	<i>P. virgatum</i>	desv. estándar
5	4.62	0.07	4.67	0.04	4.78	0.01	4.6	0.05
10	4.42	0.02	4.43	0.11	4.64	0.06	4.43	0.05
25	4.34	0.06	4.34	0.05	4.35	0.03	4.31	0.03



s/p = sin planta

Grafica 11. pH de la rizosfera al final del experimento.

Tabla 27. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del pH de la dilución

5%.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PH5

HSD de Tukey

(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	2.00	-4.67E-02	.031	.484	-.1468	5.347E-02
	3.00	-.1633*	.031	.004	-.2635	-6.32E-02
	4.00	5.333E-02	.031	.381	-4.68E-02	.1535
2.00	1.00	4.667E-02	.031	.484	-5.35E-02	.1468
	3.00	-.1167*	.031	.024	-.2168	-1.65E-02
	4.00	.1000	.031	.050	-1.37E-04	.2001
3.00	1.00	.1633*	.031	.004	6.320E-02	.2635
	2.00	.1167*	.031	.024	1.653E-02	.2168
	4.00	.2167*	.031	.001	.1165	.3168
4.00	1.00	-5.33E-02	.031	.381	-.1535	4.680E-02
	2.00	-.1000	.031	.050	-.2001	1.372E-04
	3.00	-.2167*	.031	.001	-.3168	-.1165

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tratamiento 1: Suelo sin plantas.

Tratamiento 2: *C elegans*

Tratamiento 3: *C odoratus*.

Tratamiento 4: *P virgatum*

Tabla 28. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del pH de la dilución

10%.

Comparaciones múltiples

Variable dependiente: PH10

HSD de Tukey

(I) TRATAMIE	(J) TRATAMIE	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
1.00	2.00	-1.00E-02	.064	.999	-.2151	.1951
	3.00	-.2300*	.064	.029	-.4351	-2.49E-02
	4.00	4.667E-02	.064	.883	-.1584	.2517
2.00	1.00	1.000E-02	.064	.999	-.1951	.2151
	3.00	-.2200*	.064	.036	-.4251	-1.49E-02
	4.00	5.667E-02	.064	.813	-.1484	.2617
3.00	1.00	.2300*	.064	.029	2.495E-02	.4351
	2.00	.2200*	.064	.036	1.495E-02	.4251
	4.00	.2767*	.064	.011	7.161E-02	.4817
4.00	1.00	-4.67E-02	.064	.883	-.2517	.1584
	2.00	-5.67E-02	.064	.813	-.2617	.1484
	3.00	-.2767*	.064	.011	-.4817	-7.16E-02

\*. La diferencia entre las medias es significativa al nivel .05.

Tratamiento 1: planta sin plantas.

Tratamiento 2: *C elegans*

Tratamiento 3: *C odoratus*.

Tratamiento 4: *P virgatum*

Tabla 29. Comparación múltiple (ANOVA-Tukey) del pH de la dilución 25%.

		ANOVA				
		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
PH25	Inter-grupos	1.183E-02	3	3.942E-03	2.489	.134
	Intra-grupos	1.267E-02	8	1.583E-03		
	Total	2.449E-02	11			

Sin embargo aunque *C. odoratus* halla obtenido los valores mas altos y con diferencias significativas no es suficiente para decir que *C. odoratus* tiene la capacidad de modificar el pH del suelo. Ya que dependiendo del método de medición del pH en una muestra puede variar de 0.5 a 1.5 unidades, el pH no constituye una medida de precisión para fines utilitarios, un error de  $\pm 0.2$  unidades resulta aceptable (Rodríguez y Rodríguez, 2002).

Martínez, (2000) trabajo con suelos contaminados manualmente con hidrocarburos (gasolina diesel y combustóleo) de 100 a 150,000 ppm de HTP encontró que las diferencias del pH no son significativas y se atribuye la variación obtenida a la metodología del análisis. En un experimento sobre el pH de seis suelos contaminados manualmente con petróleo crudo, después de 12 meses que duró el estudio, el pH no cambió apreciablemente (Salinatro *et al.*, 1997). Los microorganismos de la rizosfera, por su intensa actividad, afectan el pH, oxígeno y concentración de dióxido de carbono (Stolp, 1988).

En estudios de fitorremediación en parcelas con vegetación mostraron ligeramente pH menores comparados con parcelas sin plantas, el cual puede ser debido al nitrógeno no utilizado (Fiorenza *et al.*, 2000). En este trabajo no se vieron cambios en 14 semanas.

## 7.12 Matriz de resultados de las tres plantas.

La planta más eficiente de acuerdo con la suma de los resultados fue *C. elegans* (tabla 30) al tener 46 puntos, seguida de *P. virgatum* con 43 puntos y finalmente *C. odoratus* con 31 puntos. *C. elegans* obtuvo la mayor eficiencia en altura de la parte aérea en la dilución 25%, volumen radical en las diluciones 10, 25 y 50%, longitud radical en la dilución 25%, peso seco en las diluciones 10 y 25% y NMP de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Estas características la hacen idóneas para la fitorremediación para las zonas del trópico mexicano. La diferencia entre la segunda planta, *P. virgatum* es solo de tres puntos. Dentro de las características que *P. virgatum* obtuvo en más eficiente fueron; sobrevivencia en el S2, altura en la parte aérea en S2, altura de parte aérea en la dilución 50%, longitud radical en las diluciones 5, 10 y 50%, peso seco en 5 y 50% y mayor degradación de HTP. Dentro de las características más conspicuas de esta planta es su tolerancia a zonas muy contaminadas y mayor degradación de hidrocarburos de este trabajo. Para *C. odoratus* se encontró muy eficiente en la germinación, altura de la parte aérea en las diluciones 5 y 10% y volumen radical en la dilución 10% lo que la hace muy sensible a la contaminación de la zona de estudio pero muy eficiente en zonas pocas contaminadas hasta un límite menor a 22,712 (dilución 10%).

**Tabla 30. Matriz de los resultados obtenidos de las tres especies evaluadas.**

	<i>P. virgatum</i>	<i>C. elegans</i>	<i>C. odoratus</i>
Germinación	1	2	3
Sobrevivencia en S2	3	2	0
Altura (parte aérea) en S2	3	2	0
Altura (parte aérea) en 5%	1	2	3
Altura (parte aérea) en 10%	1	2	3
Altura (parte aérea) en 25%	1	3	2
Altura (parte aérea) en 50%	3	2	0
Volumen radical en 5%	1	2	3
Volumen radical en 10%	1	3	2
Volumen radical en 25%	2	3	1
Volumen radical en 50%	1	3	0
Longitud radical en 5%	3	1	2
Longitud radical en 10%	3	1	2
Longitud radical en 25%	2	3	1
Longitud radical en 50%	3	2	0
Peso seco en 5%	3	1	2
Peso seco en 10%	1	3	2
Peso seco en 25%	2	3	1
Peso seco en 50%	3	2	0
Degradación de HTP	3	1	2
NMP de m.d.h.	2	3	1
Cambio de pH en suelo	0	0	1
<b>Suma final:</b>	<b>43</b>	<b>46</b>	<b>31</b>

### 7.13 Discusión general.

Conforme aumenta la concentración de hidrocarburos en el suelo, éste se vuelve más hidrofóbico, ya que la incorporación del agua a los suelos contaminados en las diluciones del 25% y 50 % fue más difícil que a diluciones menores a éstas. La textura gruesa, como los suelos de esta tesis, lo hace ser ligero, falta de cohesión, fáciles de trabajar y con frecuencia con tendencia a la aridez. El pH obtenido de los suelos son

considerados por la SEMARNAT (2002) ácidos a fuertemente ácidos (S2), lo que origina la escasez de nutrientes minerales como calcio, magnesio y fósforo (Aguilera, 1989). El S2 resulto ser tóxico para las plantas al disminuir el crecimiento y sobrevivencia de *C. elegans* y *P. virgatum* y es mortal para *C. odoratus*.

Las tres plantas evaluadas en esta tesis fueron tolerantes a suelos contaminados hasta concentraciones de 22,712 ppm de HTP (dilución 10%) a partir de esa dilución la longitud de la parte aérea disminuye mas del 50%.

Para estas plantas evaluadas se realizaron ensayos de germinación en las que *C. odoratus* presento los valores más altos (70.5%) pero en la dilución 50% murieron las plantas a partir de la semana ocho. Por lo que, *C. odoratus*, puede ser utilizado como un indicador biológico, ya que la ausencia de esta planta en el pantano nos señalaría una concentración de HTP, en el suelo, mayores a 50,000 ppm. Sin embargo esta especie fue la que menor reducción en su crecimiento ( $p < 0.05$ ) obtuvo en la dilución 5%, y el mayor volumen radical en la dilución 5%. La maduración marcada en el crecimiento a partir de la segunda semana de *C. odoratus* con respecto al suelo no contaminado indica que la presencia de hidrocarburo disminuye la madurez más que las otras dos especies.

*P. virgatum* fue la planta que mejores resultados obtuvo en el proceso de fitorremediación al obtener la mayor degradación en promedio comparado con el control. *P. virgatum* se vio afectada, en su maduración, en la semana 3 siendo mas tolerante que las otras plantas, en el S2 presentó la mayor resistencia a la mortalidad que

las otras plantas. *P. virgatum* fue la que obtuvo la mayor longitud radical de 22.45 cm en promedio en todas las concentraciones. Aunque obtuvo el menor porcentaje de germinación (12.2%) y la aparición de la radícula a partir de la segunda semana.

El crecimiento de *C. elegans*, no presentó, diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en las concentraciones 10 y 25%, el cual fue similar en ambos casos a partir de la semana diez. Las diluciones 10 y 25 % de suelo, contienen concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo de 22,712 ppm y 49,054 ppm (método IMP-QA-620) respectivamente. Concentraciones que sobrepasa los límites para las normas mexicanas (NOM-138-ECOL-2002) y representa un riesgo ecológico para la salud y el medio ambiente. *C. elegans* presentó un aumento considerable de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la semana catorce en comparación con las otras plantas y control. Esta planta ha sido estudiada a nivel de la rizosfera y se han encontrado lacasas que inmovilizan contaminantes (Guerrero, 2000) y hasta 269 veces más microorganismos degradadores de hidrocarburos que en el suelo no rizosférico (Zermeño *et al.*, 2000).

De acuerdo a la matriz de resultados cada planta tiene ventajas particulares para *C. elegans* la presencia de microorganismos degradadores de hidrocarburos, buen desarrollo de la planta en la dilución 25% (49,054 ppm de HTP); para *P. virgatum* su tolerancia a la contaminación de hasta 98,000 ppm de HTP y buen crecimiento de la longitud radical en las diluciones 5, 10 y 25%; y finalmente *C. odoratus* buen desarrollo de la parte aérea y radical en las diluciones 5 y 10%.

La fitorremediación es una forma de biorremediación en la que se ha comprobado, por la amplia literatura, su eficiencia en la transformación de compuestos orgánicos. Aumenta la cantidad de microorganismos degradadores de contaminantes en la rizosfera y con el tiempo disminuye la cantidad de éstos (Günther *et al.*, 1996; Anderson *et al.*, 1993; Cunningham y Ow, 1996). Es una forma de remediación útil para amplias zonas contaminadas como en este caso, un pantano, en el que la restauración con plantas nativas, que se han adaptado a las características físicas y químicas del ambiente asegura un mejor éxito en su plantación. Esto asegurara la restauración de manera integral del ecosistema.

## 8. Conclusiones.

El S2 (suelo contaminado 221,347 ppm de HTP) es tóxico para las plantas estudiadas al disminuir el crecimiento y la sobrevivencia.

Con las mezclas de suelo hasta un 50% del S1 y 50% del S2 (98,000 ppm) se obtuvo para *C. elegans* un 40% de mortalidad. El cual es el límite para el desarrollo de esta planta en el área de estudio.

En *C. elegans* en las diluciones 10% (49,054 ppm de HTP) y 25% (22,712 ppm de HTP) no hubo diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en longitud radical, peso seco, y volumen radicular.

Las plantas fueron afectadas por la presencia de hidrocarburo ( $p < 0.05$ ) en la longitud total de la parte aérea (crecimiento de tallo), longitud radical, volumen radical y biomasa en peso seco.

En las 14 semanas de este experimento *Paspalum virgatum* presentó mayor degradación de hidrocarburos en promedio con un 22.82%, en la dilución 5% menor con respecto al control sin planta. *P. virgatum* presentó un mejor crecimiento en su parte aérea y raíz, aunque obtuvo el menor porcentaje de germinación.

*P. virgatum*, *C. odoratus* y *C. elegans* toleran altas concentraciones de hidrocarburo obteniendo buen crecimiento hasta 22,712 ppm de HTP. Esto sugiere un límite en el proceso de la fitorremediación en la zona contaminada.

*C. odoratus* obtuvo los mayores volúmenes radicales en las concentraciones 5%. Mueren en la dilución 50% (49,000 ppm), esto marca un límite para la utilización de *C. odoratus*. Esta planta obtuvo los mayores volúmenes radicales en la dilución 5%.

*C. elegans*, obtuvo, una variación en el crecimiento de la parte aérea. En las diluciones 10% y 25% no se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), y el crecimiento fue similar en ambos casos a partir de la semana diez. Esto corresponde a una concentración de 22,712 ppm y 49,054 ppm de HTP (método IMP-QA-620) respectivamente.

La presencia de las plantas favoreció el desarrollo de microorganismos degradadores de hidrocarburo. *C. elegans* presentó un aumento considerable de microorganismos degradadores de hidrocarburos asociados a su rizosfera, en la semana catorce en comparación con las otras plantas estudiadas.

De acuerdo a la matriz *C. elegans* y *P. virgatum* resultaron ser las más eficientes en los parámetros de sobrevivencia en S2, altura en S2, altura en la parte aérea, volumen radical, longitud radical, peso seco, HTP y microorganismos degradadores de hidrocarburos.

## 9. Bibliografía.

Aguilera H. N. 1989. Tratado de edafología de México. Tomo I. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 222 pp

Alonso I. V. 2002. Estudio comparativo de la fitotoxicidad del naftaleno en dos especies de plantas superiores *Cyperus elegans* y *Glycine max* (soya) obtenido bajo cultivo hidropónico. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 87 pp

Alvarez J. R. 1978. Enciclopedia de México. 4ª edición. México.

Anderson T., Guthrie E. and Walton B. 1993. Bioremediation in the Rizosphere. *Environment Science Technology* 27(13):2631-2636

Arizabalo R.D. y Díaz G. 1991. La contaminación del agua subterránea y su transporte en medios porosos. Cuaderno 6 Instituto de Geofísica, UNAM. México. 34 pp

Atlas R. M. 1991. Microbial Hydrocarbon Degradation Biorremediation of oil spill. *Chem. Tech. Biotechnol.* 52 149-156

Atlas R. M. Y Bartha R. 1998. Microbial Ecology fundamentals and applications. 4a ed. Ed. BCP Addison Wesley longman. Estados Unidos.

Banks K., Pekeak K., Rathbone y Schwab A. 1997. Phytoremediation of Petroleum Contaminated Soils: field assessment. In: Hinchee, R.E. *et al.* (eds.). 4th Battelle Memorial Institute in situ and on-site bioremediation international symposium. New Orleans. April 28-May 1, 1997. Volume 3. Pp. 305-308.

Barea J.M. 1998. Biología de la rizosfera. *Investigación y ciencia.* (Enero) 74-81

Barceló J. y Poschenrieder C. 1989. Estrés vegetal inducido por metales pesados. *Investigación y Ciencia.* 154 (Julio):54-63.

Bautista Z. F y Estrada M. H. 1998. Conservación y manejo de suelos. *Ciencias.* 50:50-55

Bizecki D., Knight D., Farrel R. And Germida J. 2003. Ability of cold-tolerant Plants to Grow in Hydrocarbon Contaminated Soil. *International Journal of Phytoremediation.* 5(2): 105-123.

Chacón R. A. 2000. Determinación de exudados radicales en *Cyperus laxus* Lam. (CYPERACEAE); posible fitorremediadora de pantano. Informe de servicio social. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Colin B. 2001. Química ambiental. Ed. Reverté SA México. 622pp

Cunningham S. and Ow D. 1996. Promises and Prospects of Phytoremediation. *Plant Physiology.* 110: 715-719

Damian C.F. 1999. Estudios de ecotoxicidad, bioremediación y fitorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos (Diesel). Tesis de Licenciatura, Biología. Fac. de Ciencias, UNAM. 54 pp

Dávila P. A y Sánchez K. J. 1996. La importancia de las gramíneas como forraje en México. *Ciencias* 44: 32-34

Diego P. N. 1997. Flora de Guerrero. No. 5 Cyperaceae. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 175 pp

Duchaufour 1978. Manual de edafología. Ed. Toray-masson. España. 476 pp

EPA. 2000. Introduction to Phytoremediation. Ed. EPA. USA. 72pp

EPA 1996. Guía del ciudadano: Atenuación natural. Ed. EPA. USA.

Fernández R., Ruiz G. y Rodríguez R. 1998. La bioremediación como alternativa al tratamiento de suelos contaminados. *CINVESTAV, Avances y Perspectivas*. 17:293-302.

Ferrera-Cerrato R. 1995. Efecto rizosfera. En R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez-Moreno (eds.), *Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable*. Colegio de Postgraduados en ciencias Agrícolas, Montecillo, Edo. de México. Pag. 233

Fiorenza S, Oubre C. and Herb C. 2000. Phytoremediation of Hydrocarbon Contaminated Soil. Ed. Lewis Publishers. USA. 164 pp

Flores V. A. 2001. Evaluación de la reducción de HAP en un suelo contaminado con petróleo por la presencia de una planta del género *Cyperus* utilizando la técnica de CG-EM. Tesis de Licenciatura, Química. Facultad de Química, UNAM.

Gallegos M., Gómez S., González C., Montes de Oca A., Zermeño J. y Gutiérrez M. 2000. Diagnostic and Resulting Approaches to Restore Petroleum Contaminated Soil in Mexican tropical swamp. *Water Science and Technology*. 42 (5-6):377-384

García P. B. 2000. Economía ambiental. Fac. de economía, UNAM. 125 pp

Guerrero A. L. 2000. Evaluación del efecto de un suelo contaminado sobre el crecimiento y metabolismo de tres especies de Cyperaceae. Tesis Maestría, ENCB, IPN. 956 pp

Günther. T., U. Dornberger and W. Fritsche. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere* 33(2):203-215.

Harrigan W. & Mc Cance M. 1974. Laboratory Methods in Food and dairy Microbiology. Ed. Academic Press. USA.

Havard B.C. 1969. Las plantas forrajeras tropicales. Ed. Blume. Barcelona. 382 pp.

Hoffman D.J., Rather B., Cairns J. 2003. Handbook of Ecotoxicology. Ed Lewis Publishers  
2<sup>nd</sup> ed. USA. 1290 pp

Instituto Mexicano del Petróleo, IMP. 1994. Determinación de hidrocarburos totales del  
petróleo y sedimento por FT-IR. Método IMP-QA-620. División de Química Analítica.

Instituto Mexicano del Petróleo, IMP. 2003. [www.imp.mx](http://www.imp.mx)

Iturbe A. R. Flores C., Chávez C., Roldan A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados  
con hidrocarburos mediante biopilas. *Ingeniería, Investigación y Tecnología*. 3(1):25-35

Jaimes L. M. 2000. Caracterización y adecuación de un suelo contaminado con  
hidrocarburos del petróleo, utilizando para su recuperación un proceso de fitorremediación.  
Tesis Licenciatura, Ingeniería Ambiental. Universidad Autónoma Metropolitana-  
Azcapotzalco.

James L. J, Lesley F., Shnoor J., Alvarez P. 1997. Effect of hybrid poplar trees on microbial  
populations important to hazardous waste bioremediation. *Environmental Toxicology and  
Chemistry*. 16(6):1318-1321.

Jiménez C. B. 2001. Contaminación ambiental en México: causa, efecto y tecnología  
apropiada. Ed. Limusa, México. 925pp

Jodi R. S.1995. The Role of Plants and Plant/Microbial Systems in the Reduction of Exposure. *Environmental Health Perspectives*. 103:13-15

Lasat M.M.2000. The use of Plants for the Removal of Toxic Metals from Contaminated Soil. Ed. EPA. 33pp

Lecomte P. & Mariotti. 1997. Handbook of Diagnostic Procedures for Petroleum Contaminated Sites. Ed. John W & Sons. USA. 192 pp

Lee, E. and M. K. Banks. 1993. Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil using vegetation: a microbial study. *Journal of Environmental Science and Health A28(10):2187-2198*.

Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente. 1999. Gaceta Ecológica Num. 52. INE-SEMARNAT. México.

Martínez, M. V. E. 2000. “Diseño de una metodología integral para evaluar el grado de contaminación del subsuelo por hidrocarburos y su aplicación a un caso de estudio.” Tesis Maestría. IPN-ESIA.

McIntyre N. 2000. Phytoremediation of Soils Contaminated with Fuel. [www.phytopet.org](http://www.phytopet.org)

Metting B.F. 1993. Soil Microbial Ecology. Ed. Marcel Dekker. USA. 646pp

Morrison R.T. 1998. Química Orgánica. Ed SITESA. México. 884 pp

Murguía E. R y Martínez V. 1991. Suelos contaminados con hidrocarburos. Pp 46-93. En F.J. F. Ruiz (Ed.). Causas y consecuencias de la contaminación de suelos, mesa redonda. Dpto. de suelos, UACH, Chapingo.

NACE. 1987. Review of Current Practices for Monitoring Bacterial Growth in Oilfield System. Ed. National Association of Corrosion Engineers. USA.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia 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 de Emergencia NOM-EM-138-ECOL-2002, Que establece los límites máximos permisibles de contaminación en suelos afectados por hidrocarburos, la caracterización del sitio y procedimientos para la restauración, Diario Oficial de la Federación, martes 20 de agosto de 2002.

Norma Oficial Mexicana de Emergencia NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Diario Oficial de la Federación, miércoles 30 de marzo de 2005. 22pp

OCDE. 1998. Análisis del desempeño ambiental México. Ed. OCDE, México.

Ortiz O. M. 2001. Bioensayos con *Cyperus elegans* para la determinación del potencial fitotóxico de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 112 pp

Páez B.R. 2000. Bioensayos de toxicidad para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. Tesis de Licenciatura, Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. 88 pp

Pérez V.J. García G. Esparza F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *CINVESTAV Avances y Perspectivas*. 21: 297-300.

Pineda F. G. y Mesta H. A.M. 2001. Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. Vol. 43 No. 3 143-150.

Porta J.C., López A. y Roquero C. 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 2ª ed. Ed. Mundi Prensa España. 848pp

Qiu X., Leland T., Shan I., Sorensen L., Kendall W. 1997. Field study: Grass remediation for clay soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons. *American Chemical Society*. Chapter 14.

Quiñoles A., Ferrera C., Gavi R., Fernández L., Rodríguez V., Alarcon A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencias* 37:585-594.

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

Riser-Roberts, E., 1998. Remediation of Petroleum Contaminated Soils. CRC Press, Boca Raton, FL.125p

Rivera-Cruz, M. del C. Ferrera-Cerrato, R., Volke, H. V., Rodríguez, V.R. y Fernández, L. L. 2002. Adaptación y selección microbiana autóctona en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra* 20:423-434

Rivera-Cruz, M. del C. Ferrera-Cerrato, R., Volke, H. V., Rodríguez, V.R. y Fernández, L. L. 2002. Adaptación y selección microbiana autóctona en medios de cultivos enriquecidos con benzo(a)pireno. *Agrociencias* 36:503-514

Robson B., Knight D., Farrel R. And Germida J. 2003. Ability of cold-tolerant Plants to Grow in Hydrocarbon Contaminated Soil. *International Journal of Phytoremediation*. Vol 5, No. 2 pp 105-123.

Rodríguez H.F y Rodríguez J. 2002. Métodos de análisis de suelos y plantas, criterios de interpretación. Ed Trillas. México.

Rovira A. D. and C.B. Davey 1974. biology of the rhizosphere. In E.W. Carson ed., The plant root and its Environment. University Press of Virginia. U.S.A.

Rovira A. D. 1979. Biology of the soil-root surface. In the Soil-Root Interface (J.L. Harley and Russel Eds.) Academic Press London.

Rusek, J. y V. G. Marshall. 2000. Impacts of Airborne Pollutants on Soil Fauna. Annual Reviews Ecology Systems 31: 395-423

Salinatro J.P., Dorn P. B., Huesseman M. H., Moore K., Rhodes I. L., Rice J., Vipond M. W. & Wisniewski. 1997. Crude Oil Hydrocarbon Bioremediation and Soil Ecotoxicity Assessment. *Environmental Science Technology*. 31: 1769-1776

Seoánez C. M. 2002. Contaminación del suelo: estudio, tratamiento y gestión. Mundi Prensa Barcelona España.

Sistachs M. y J.J. León 1987. El caguazo (*Paspalum virgatum L.*), Aspectos biológicos, su control en pastizales. Editorial del Instituto de Ciencia Animal (EDICA), La Habana, 57 pp.

Sommer I. y Cramer, S. 1998. Suelos. La Guía Ambiental. Ed. Unión de grupos ambientalistas. México. p. 223-231.

Spark D. L. 2003. Environmental Soil Chemistry. 2nd. Ed. Academia. California U.S.A. 352 pp.

Stolp H. 1988. Microbial ecology: organism, habitats, activities. Cambridge University Press. Great Britain 308 pp

Toledo A.1983. Cómo destruir el paraíso. Ed. Océano. México.151pp

Uribe H., Montes de Oca A., Ortiz O., Zermeño E., Salazar C., Martinez M. 2003. Ecotoxicity Assessment of Phytoremediation Treatment of oil spill on Fresh Marsh in the Mexican Southeast. In situ and on-site Bioremediation 2003. Proceedings of the Seventh International in situ and on-site Bioremediation Symposium (Orlando, Fl; June 2003) Ed. Battelle Press Columbus Oh.

White P. M., Wolf D.C., Thoma G.J. & Reynolds C.M. 2003. Influence of Organic and Inorganic Soils Amendments on Plant Growth in Crude Oil-Contaminated Soil. *International Journal of Phytoremediation*. 5(4):381-397

Wiltse, C.C. W.L. Rooney, Z. Chen, A.P. Schwab and M.K. Banks. 1998. Greenhouse evaluation of agronomic and crude oil-phytoremediation potencial among alfalfa genotypes. *Journal of Environmental Quality* 27:169-173.

Wise L. D. & Trantolo D.J. 1994. Remediation of hazardous Waste Contaminated Soils. Marcel D. Inc. USA. 929 pp

Zermeño E. J. A., Uribe H. R., Salazar C. L., Camacho R., Jaimes L., Gutierrez R., Escalante E., Gallegos M., and Gomez S. 2000. Feasability studies and toxicity test for Phytoremediation of soils contaminated with hydrocarbons. En: First International Conference On Petroleum Biotechnology. Eds. Sylvie Le Borgne, Norma R. y Quintero R. Ed. IMP. 235-239 pp