



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

## FACULTAD DE QUÍMICA

Efecto de *Azospirillum lipoferum* en el  
desarrollo de *Lolium perenne* y *Lolium  
multiflorum* en suelo contaminado con diesel

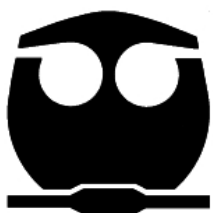
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

MÓNICA LYENET PÉREZ VÁZQUEZ



MÉXICO, D. F.

2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**

**Tesis Digitales**

**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**

**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: Lilia María Ernestina Vierna García**  
VOCAL: **Profesor: María Guadalupe Tsuzuki Reyes**  
SECRETARIO: **Profesor: Victor Manuel Luna Pabello**  
1er. SUPLENTE: **Profesor: Eduardo Bonilla Espinosa**  
2º SUPLENTE: **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL EDIFICIO A FACULTAD DE  
QUÍMICA. UNAM

ASESOR DEL TEMA:  
**María Guadalupe Tsuzuki Reyes**

**SUSTENTANTE:**  
**Mónica Lyenet Pérez Vázquez**

## DEDICATORIA ESPECIAL A:

*La Universidad Nacional Autónoma de México*

*Muchas gracias Universidad mía, sin ti no sería la mujer profesional que soy ahora, me forjaste desde mi educación media superior y estoy infinitamente agradecida con todos los profesores que fueron parte fundamental de esto, gracias por el tiempo que me dieron durante esa estancia en las aulas de ésta gran institución, no puedo expresar lo orgullosa que me siento al ser una egresada de ésta máxima casa de estudios y siempre pondré en alto el nombre de la UNAM, trabajando arduamente y ejerciendo de manera ética y profesional mi carrera.*

*Al Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química y en especial a:*

*Maestra Guadalupe Tsuzuki*

*Muchas gracias por todo el apoyo que me dio durante mi estancia en el laboratorio, gracias por todos los conocimientos que me transmitió, por los consejos que me dio para mi desarrollo profesional, personal, por los momentos que me dedico para revisar mi trabajo de tesis y por toda la aportación que le dio a éste trabajo.*

*Dr. Luna*

*Gracias por todo el apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por darme la oportunidad de colaborar en sus proyectos y contribuir de ésta forma a mi educación porque pude aprender nuevas cosas, abrir más mi panorama profesional, gracias por su apoyo y tiempo que dedico a revisar éste trabajo.*

*A MI MADRE: Muchas gracias por todo el apoyo incondicional, cuidados, apapachos etc que siempre me das, sin ti esto no hubiera sido posible, y siempre estaré infinitamente agradecida contigo y es un regalo para ti mi tesis, TE QUIERO MUCHO MAMÁ.*

*A MI PADRE: Papá Chachá sabes que esto es también para tí, sé que si estuvieras vivo, estarías muy orgulloso de mí, también te dedico con mucho cariño mi tesis TE QUIERO MUCHO PAPA.*

*A MI HERMANA ANGÉLICA: Hermana nunca te lo he dicho pero eres una segunda madre para mí porque también fuiste parte fundamental de mi educación, me cuidaste y siempre has estado para apoyarme muchas gracias por todo y también para tí está dedicada éste trabajo. TE QUIERO MUCHO HERMANA.*

*A EMILIO: Gracias por todo el apoyo y consejos que me has dado a lo largo de todo éste tiempo que llevamos en la familia juntos. MUCHAS GRACIAS.*

*A MIS SOBRINAS y SOBRINOS: Ariane, Aura, Karem, Marvín y Adriana para ustedes con mucho cariño y espero que pronto Marvín y Adriana pasen por éste etapa de titulación, Ariana y Aura tienen que estudiar mucho para que sean unas grandes profesionistas por que es lo mínimo que esperamos de ustedes. LOS QUIERO MUCHO NIÑITOS.*

*A MIS AMIGOS DE LA UNIVERSIDAD:*

*BLANCA, DAVID, RAUL, MARÍA, PABLO, PATY, ARTURO, ADRIAN A, PAOLA*

*Gracias por todo el apoyo durante la carrera, cuando me ayudaron en alguna tarea, práctica, examen y sobre todo muchas gracias por esa compañía en los tiempos libres y esas tan padres tardes en las donas, nuestro lugar favorito de diversión donde horas y horas reí con ustedes, lloré, sufrí, grité y más cosas que hicimos ahí, una etapa de mi vida que jamás olvidaré y que ustedes siempre estuvieron ahí y sobre todo GRACIAS POR BRINDARME SU AMISTAD Y CARIÑO A LO QUE SABEN QUE SIEMPRE RESPONDERÉ DE IGUAL FORMA LOS QUIERO MUCHO AMIGOS.*

*BRENDA: Amiga sabes que eres parte fundamental de mi vida, gracias por todo el apoyo que me diste durante la carrera, me acuerdo mucho cuando te conocí que me brindaste ayuda sin conocermi, eres una persona que siempre trata de dar lo mejor de sí misma sin esperar nada, no sabías si yo era alguien confiable, simplemente me brindaste tu ayuda, GRACIAS infinitamente, por las vacaciones al Norte del Corazón jamás las olvidaré son parte de mis recuerdos más felices de toda mi vida y tu estuviste ahí amiga y pues espero que sigamos escribiendo mas páginas juntas en esta historia que se llama vida, ahora en tu nueva etapa espero estar y ahora en mi nueva etapa quiero que sigas como siempre conmigo TÍ VOGLIO BENE AMICA.*

*CARLA: Amiga sabes que a pesar de todos los obstáculos que hemos vivido, tristezas, etc; siempre contarás conmigo, y espero siempre contar contigo y que sigas en mi vida como hasta ahora, porque los buenos amigos son para siempre y espero que sigamos escribiendo mas páginas juntas en ésta historia tan hermosa que nos ha tocado vivir . TE QUIERO MUCHO AMIGA.*

*CARLOS: Amigo gracias por tu apoyo durante nuestra estancia en la facultad, sabes que te quiero, hemos crecido, madurado en éste tiempo y hasta he visto como te has convertido en un papá maravilloso, espero que se sigan acumulando éxitos y que éstos los sigamos compartiendo como hasta ahora, por todos nuestros momentos felices durante nuestra estancia en la Facultad en la vida y siempre recordare nuestras vacaciones en Chacahua como los momentos más felices de mi vida. GRACIAS AMIGO.*

*CECILIA: Amiga cuantos recuerdos juntas en el laboratorio de Química General con el profesor la Boa, nuestros momentos de crisis, histeria durante nuestra estancia en la universidad, nuestros momentos felices en las donas, los tristes cuando llorábamos por algún ingrato amor, o por que simplemente no era un buen día, amiga esos momentos jamás los olvidaré, y sobre todo nuestras vacaciones en Oaxaca, momentos que se quedaron en mi memoria como los más felices de mi vida, siempre espero contar contigo como hasta ahora, y*

*que siempre estés compartiendo conmigo mis éxitos como hasta ahora no me has fallado y seguirá siendo así AMIGA MUCHAS GRACIAS POR TODO TE QUIERO MUCHO.*

*LUCIA: Amiga ya cuanto tiempo juntas, parece que fue ayer cuando te conocí, sabes recuerdo ese día , y desde el momento que platicamos parecía que nos conocíamos de tiempo atrás eres una persona muy transparente, eso me agrado y supe que nuestra amistad duraría como hasta ahora , espero que siempre estés presente en mi historia llamada vida, escribiendo muchas más páginas, que siempre me des consejos, porque eres alguien muy sabia, gracias por los momentos felices por el apoyo en los difíciles y espero que como hasta ahora estés presente en todos mis éxitos y espero que sigamos así, gracias por todos los momentos felices , nunca olvidare esas vacaciones de verano en Oaxaca mis mejores vacaciones de la vida y tu estuviste ahí amiga. Recuerda que siempre estaré ahí para apoyarte y que Te t'aime beaucoup mon amie.*

*MAYA: Amiga el tiempo que hemos vivido juntas como las vacaciones de Oaxaca, al Norte del Corazón han sido momentos muy felices y los mejores de mi vida, los momentos en la Universidad nuestras clases juntas, los momentos de estrés que me apoyabas me decías esas palabras de aliento para que no me rindiera MUCHAS GRACIAS AMIGA, nuestros tiempos libres en CU, nuestros momentos felices en conciertos etc, tristes cuando el amor nos jugaba mal y cariño que me has brindado durante todo este tiempo de nuestra historia juntas, siempre espero contar con tu presencia en mis éxitos como hasta ahora, nunca me has abandonado, GRACIAS de nuevo y sabes que cuentas conmigo como hasta ahora ha sido y será TI VOGLIO BENE MENINA LINDA.*

*WENDY: Amiga gracias por compartir tus momentos tristes, felices y de histeria conmigo, sé que siempre contaré con tu apoyo como lo has hecho hasta ahora, mil gracias por brindarme tu amistad , por estar siempre apoyándome , estar presente en los momentos de éxito , espero que continúen como hasta ahora ha sido y que sigamos escribiendo más páginas en nuestra historia llamada vida ,*

*MOMENTOS QUE JAMÁS OLVIDARÉ ,TE QUIERO MUCHO AMIGA.*

*A MIS AMIGOS DE LA VIDA:*

*ADRIANA: Sabes amiga, jamás pensé cuando te conocí que seríamos tan buenas amigas, nunca me imagine lo increíble y maravillosa mujer que eres, sabes gracias por todos los consejos, momentos felices y tristes, gracias por las vacaciones en Veracruz , momentos que de verdad nunca olvidaré y se quedaron en mí recuerdo como uno de los más felices de mi vida y como siempre amiga de verdad espero que estes presente en mi vida compartiendo conmigo momentos de éxito como hasta ahora ha sido y será, GRACIAS POR TODO DE NUEVO, NO PUEDO PAGARTE TODO LO QUE HAS HECHO POR MI TE QUIERO MUCHO AMIGUITA LINDA.*

*GLORIA: Amiga no puedo olvidar todos los momentos felices e increíblemente llenos de historias que nos han hecho crecer como personas desde la adolescencia hemos estado juntas, compartiendo momentos felices, tristes y sobre todo compartiendo cada uno de nuestros éxitos amiga espero siempre seguir así como hasta ahora jamás olvidaré que contigo fui a ver mi primer concierto de mi grupo favorito que en ese entonces eran los Fabulosos Cadillacs, jamás olvidaré que hacías todo hasta decirle a tú mamá que llamará a la mía para que me dejará ir a algún concierto , esos momentos se quedaron en mis recuerdos como unos de los más felices de mi vida y espero que sigamos escribiendo más historias juntas , y recuerda que siempre contarás conmigo TE QUIERO MUCHO MI YOYIS.*

*FERNANDA: Amiga sabes que hemos pasado desde los 7 años juntas en esta historia llamada vida , jamás pensé que seguiríamos siendo amigas como hasta ahora, como siempre sé que cuento contigo, que a veces no nos veíamos, por que hicimos cosas diferentes, pero sabes jamás olvidaré esos momentos felices de la infancia, esos juegos, cuando tu abuelo nos regañaba por jugar a las escondidas en su closet, todos esos momentos felices de la niñez, sabes son recuerdos que jamás olvidaré y todo lo que hemos pasado juntas y hemos crecido madurado*

*para ser las mujeres que hoy en día somos, espero sigas escribiendo historias conmigo TE QUIERO MUCHO AMIGA.*

*ELI: Amiga sabes eres alguien muy importante en mi vida, hemos vivido tantas cosas juntas, hemos compartido éxitos, logros, tristezas pero siempre hemos salido adelante , porque hemos aprendido que la vida no es fácil, hemos crecido juntas, aunque a veces no nos veíamos por nuestras actividades, se que siempre seremos amigas, porque el tiempo o la distancia no nos separa al contrario hace que veamos realmente que nuestra amistad es sincera y por ello te quiero agradecer amiga MUCHAS GRACIAS Y TE QUIERO MUCHO.*

*EDGAR: Sabes que eres uno de mis mejores amigos hemos vivido tantas cosas buenas y hemos crecido como seres humanos, nuestras pláticas pueden ser tan simples como hablar sobre cuestiones políticas, sociales etc , espero siempre tenerte a mi lado porque eres alguien tan sencillo y nada complicado amigo quiero ser como tú algún día , ese temple que tienes no puedo lograrlo. GRACIAS POR TODOS LOS MOMENTOS FELICES TE QUIERO MUCHO.*

*CRIS Y LAO: Amigos una especial mención a ustedes porque r ustedes fueron parte importante de mi formación académica en la grandiosa UNAM nuestras clases de Teatro, Francés, Esgrima, todo eso que me ha formado no solo académicamente sino como persona , ustedes siempre estuvieron ahí, apoyándome en todo momento y hasta la fecha lo siguen haciendo, espero que sigamos escribiendo mas historias juntos y compartiendo nuestros éxitos GRACIAS POR TODO AMIGOS LOS QUIERO MUCHO.*

*Y A TODOS MIS AMIGOS DE LA VIDA QUE NO TERMINARÍA LA LISTA TAN INTERMINABLE DE PERSONAS QUE SON IMPORTANTES Y QUE HAN DEJADO HUELLA Y MOMENTOS FELICES EN MI VIDA, GRACIAS A TODOS USTEDES AMIGOS.*

*A MIS AMIGOS DEL LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA EXPERIMENTAL:*

*ANA, MANU, MARIE, EVA, BENJAMIN, ERNESTO, PAVEL, MONICA, ALMA, NAYE, GABY, MABELL, CRIS:*

*Muchas gracias por todo el apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Microbiología, por los momentos felices de risa y que hicieron mi estancia en el laboratorio muy agradable , por sus enseñanzas por su apoyo en la parte académica, sus consejos tan sabios para mis experimentos y sobre todo por su amistad. MUCHAS GRACIAS A TODOS LOS QUIERO MUCHO.*

*HOLDY: Amiga muchas gracias por todo el apoyo durante nuestras horas de experimentos, en nuestras horas en el cuarto de cultivo, gracias por los consejos que fueron muy importantes para el trabajo de tesis , muchas gracias por tú apoyo incondicional que sé que hasta el momento me brindas si lo necesito y sobre todo amiga gracias por tú amistad eres una maravillosa mujer y ya está aquí terminado gran parte de ese trabajo que hicimos juntas TE QUIERO MUCHO AMIGA.*

*VERÓNICA: Amiga sabes jamás pensé que seríamos tan buenas amigas, cuando platicábamos mientras cada quien escribía o buscaba información de su tesis o solo por el simple hecho de querer compartir nuestras historias de vida, esos momentos felices, tristes que hemos compartido dentro y fuera de ese laboratorio , amiga MUCHAS GRACIAS POR TODO TU CARIÑO y espero seguir escribiendo historias felices contigo.*

*JACOB: Amigo sabes eres una persona que me ha enseñado mucho de la vida, a no ser tan negativo a ver las cosas con filosofía , gracias por todo el apoyo durante mi estancia en el laboratorio, gracias por esos momentos felices cuando realizábamos las pruebas de biodegradación, gracias por compartir conmigo tus añoranzas, tus logros, GRACIAS AMIGO TE QUIERO MUCHO.*

*ARTURO: Gracias por todos esos momentos tan agradables que pasamos juntos en ese laboratorio, esos momentos de tristeza y que hicieron que nos uniéramos más como personas que como compañeros*

*de laboratorio ahora creo que estaremos por mucho tiempo escribiendo historias nuevas y compartiendo momentos de alegría y de éxitos como hasta ahora, GRACIAS POR TODO TE QUIERO MUCHO AMIGO.*

*A SINCAL:*

*Una dedicatoria especial a la empresa en la que en éste momento laboro por el apoyo que me han brindado y no solo profesionalmente, MUCHAS GRACIAS César y July por todo lo que me han ofrecido y espero seguir creciendo como hasta ahora.*

## INDICE

|          |                                                                                                                                  |           |
|----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>RESUMEN</b>                                                                                                                   | <b>13</b> |
| <b>2</b> | <b>INTRODUCCIÓN</b>                                                                                                              | <b>15</b> |
| <b>3</b> | <b>OBJETIVO GENERAL:</b>                                                                                                         | <b>17</b> |
| 3.1      | Objetivos específicos:                                                                                                           | 17        |
| <b>4</b> | <b>HIPOTÉISIS:</b>                                                                                                               | <b>17</b> |
| <b>5</b> | <b>MARCO TEÓRICO</b>                                                                                                             | <b>18</b> |
| 5.1      | Contaminación de suelos                                                                                                          | 18        |
| 5.2      | Fuentes de contaminación en México                                                                                               | 19        |
| 5.3      | Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP).                                                                      | 21        |
| 5.4      | Género <i>Azospirillum</i>                                                                                                       | 31        |
| 5.5      | Interacción raíz- bacteria                                                                                                       | 33        |
| 5.6      | Uso de RPCP en agricultura                                                                                                       | 35        |
| 5.7      | Uso de RPCP en aplicaciones ambientales                                                                                          | 37        |
| <b>6</b> | <b>MATERIAL Y MÉTODOS:</b>                                                                                                       | <b>39</b> |
| 6.1      | Plan de trabajo                                                                                                                  | 39        |
| 6.2      | Semillas de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i>                                                                    | 40        |
| 6.3      | Diesel:                                                                                                                          | 40        |
| 6.4      | Suelo                                                                                                                            | 40        |
| 6.5      | Cepas de <i>Azospirillum</i>                                                                                                     | 42        |
| 6.6      | Sitio donde se realizó el experimento                                                                                            | 45        |
| 6.7      | Tratamientos                                                                                                                     | 45        |
| 6.8      | Preparación del inoculo:                                                                                                         | 46        |
| 6.9      | Inoculación de las semillas                                                                                                      | 46        |
| 6.10     | Siembra de las semillas                                                                                                          | 47        |
| 6.11     | Cuidado de las unidades experimentales                                                                                           | 47        |
| 6.12     | Variables evaluadas.                                                                                                             | 47        |
| 6.13     | Métodos                                                                                                                          | 48        |
| <b>7</b> | <b>RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>                                                                                       | <b>50</b> |
| 7.1      | Viabilidad de las semillas.                                                                                                      | 50        |
| 7.2      | Tolerancia de las Cepas de <i>Azospirillum</i> al Diesel.                                                                        | 50        |
| 7.3      | .Efecto del diesel en la germinación.                                                                                            | 51        |
| 7.4      | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en la germinación de las semillas de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> . | 52        |

|      |                                                                                                                                      |    |
|------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 7.5  | Efecto de la presencia de diesel en la longitud de la parte aérea de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .                     | 54 |
| 7.6  | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en la longitud de la parte aérea de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .      | 56 |
| 7.7  | Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de la parte aérea en <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i> .          | 58 |
| 7.8  | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en el peso húmedo de la parte aérea de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .   | 59 |
| 7.9  | Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte aérea de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i> .            | 60 |
| 7.10 | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en el peso seco de la parte aérea de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .     | 61 |
| 7.11 | Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de la parte radical de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i> .        | 62 |
| 7.12 | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en el peso húmedo de la parte radical de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> . | 63 |
| 7.13 | Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte radical de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i> .          | 65 |
| 7.14 | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en el peso seco de la parte radical de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .   | 66 |
| 7.15 | Efecto de la presencia de diesel en el volumen radical de <i>Lolium perenne</i> y <i>Lolium multiflorum</i> .                        | 67 |
| 7.16 | Efecto de la inoculación de <i>A. lipoferum</i> en el volumen radical de <i>L. perenne</i> y <i>L. multiflorum</i> .                 | 69 |
| 7.17 | Presencia de <i>Azospirillum</i> en la etapa final del experimento.                                                                  | 71 |
| 8    | <b>CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b>                                                                                                | 72 |
| 9    | <b>BIBLIOGRAFÍA</b>                                                                                                                  | 74 |
| 10   | <b>ANEXO 1</b>                                                                                                                       | 81 |

## 1 RESUMEN

Hay necesidad de una versatilidad de tecnologías in situ que puedan remediar eficazmente los contaminantes recalcitrantes del suelo y que éstas sean una solución que no afecte el medio ambiente. La fitorremediación es una tecnología que ha demostrado ser eficaz, pero hasta la actualidad se siguen realizando estudios de investigación para conocer cuáles plantas son tolerantes a la presencia de altas concentraciones de un agente xenobiotico ; estudios previos han demostrado que la inoculación de Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP) favorecen el desarrollo de la planta a pesar de las condiciones de estrés a la que está sometida, por lo que en el Laboratorio de Microbiología Experimental de la Facultad de Química de la UNAM, se realizó éste trabajo con la finalidad de conocer si las plantas *Lolium perenne* (variedad Rye Grass perenne tetraploide y *Lolium multiflorum* ( variedad Rye Grass anual gulf hoja delgada) son tolerantes al contaminante diesel y si la inoculación de las semillas con las RPCP (PGPR por sus siglas en inglés) *Azospirillum lipoferum* cepas AzM1, AzM3 y AzM5 favorecían el desarrollo de la planta a pesar de las condiciones de estrés a las que las plantas estaban sometidas. Para ello se contamina suelo con diesel, en donde se sembraron semillas inoculadas con las diferentes cepas de *Azospirillum*, y se establecieron controles con semillas que no estaban inoculadas con estas cepas. Se encontró que la mayor concentración de diesel utilizada en éste bioensayo (3%) afectó significativamente a todas las variables medidas en ambas especies de plantas y esto se observó más marcado en *L. multiflorum*. Con respecto a la inoculación de las cepas se encontró que la inoculación de *Azospirillum* en *L. perenne* no tuvo efecto significativo en las variables evaluadas; en tanto que para *L. multiflorum* se observó un incremento en las variables longitud de la parte aérea, peso seco y húmedo de la parte radical y en el volumen de la raíz cuando fue

inoculado con *Azospirillum lipoferum*, por lo que se concluye que *L. multiflorum*, a pesar de ser más sensible al diesel, establece una buena interacción con las cepas de *Azospirillum*, las que le permiten disminuir los efectos del estrés ocasionado por el contaminante, sin embargo la planta no acumula la biomasa requerida para mejorar la captación de contaminantes y para estimular las actividades de rizodegradación. En el caso de *Lolium perenne*, produce mayor biomasa que la planta antes mencionada sin embargo no existe una interacción exitosa con ninguna de las cepas.

## 2 INTRODUCCIÓN

La fitorremediación (eliminación de contaminantes del suelo vía desarrollo de plantas) no es siempre una forma eficiente de eliminar contaminantes orgánicos persistentes (Huang *et al*; 2004), tiene muchas limitaciones, una de éstas es que muchas especies de plantas son sensibles a los contaminantes (Rock, 1997 y US EPA, 2000), sin embargo es posible facilitar la fitorremediación a través de la presencia de rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas RPCP ó por sus siglas en inglés PGPR (plant growth promoting rizobacteria) (Burd *et al*; 1998; Siciliano y Germida, 1997 y Ajithkumar *et al*; 1998) .

Las RPCP incluyen bacterias de vida libre (Glick, 1995) y otras que se introducen en las raíces formando asociaciones mutualistas altamente especializadas. Los que predominan en la rizosfera son bacilos Gram negativos que incluyen *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Alcaligenes spp*, (Alexander, 1999); fijadoras de nitrógeno como *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Azospirillum* (aerobios), *Clostridium* (anaerobio), solubilizadoras y mineralizadoras de fósforo (fosfobacterias) como *Enterobacter*, *Serratia*, *Pseudomonas* (Glick, 1995 y Steenhoudt y Venderleyden, 2000).

Algunas rizobacterias tienen la habilidad de incrementar el desarrollo potencial de las plantas aún bajo condiciones no ideales, lo cual realizan a través de diversos mecanismos que incluyen: Fijación de nitrógeno, síntesis de sideróforos, producción de fitohormonas y la solubilización de minerales (Glick, 1995), además, algunas RPCP sintetizan la enzima 1-amino-ciclopropano-1-carboxilato (ACC) desaminasa la cual hidroliza el ACC, precursor inmediato del etileno en la planta. Ésta actividad enzimática tiene una implicación importante para la fitorremediación porque las plantas producen un exceso de etileno durante el estrés químico, lo que inhibe el desarrollo de la raíz. La presencia de ésta enzima asegura que no se alcancen los niveles de etileno que causan daño a la planta (Glick *et al*; 1998; Glick, 2003).

Es particularmente frecuente la contaminación del suelo debido a derrames accidentales y fugas de hidrocarburos del petróleo como el diesel, los que son poco solubles en agua y fuentes de contaminación a largo plazo por lo que constituyen un problema grave y costoso (Kechavararzi, 2007).

Bajo condiciones normales el diesel penetra el suelo, se separa y filtra por migración descendente, sin embargo este proceso está limitado a la capa superficial, y debido a las características físicas del combustible es factible utilizar fitorremediación con especies de plantas que tienen sistemas de raíces poco profundas (Adam y Duncan, 2002). Entre las plantas más usadas en la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos se incluyen diferentes tipos de pastos (Al-Ghazawi *et al*; 2005).

Una de las limitantes en la fitorremediación de suelos es que muchas plantas no son tolerantes a los contaminantes presentes, por lo que es necesario seleccionar la adecuada y aumentar su tolerancia al mismo mediante la inoculación de RPCP que sean compatibles con esta. (Huang *et al*; 2005 y Glick, 2003).

Con dichos antecedentes éste trabajo tiene como objetivo estudiar la interacción planta-bacteria en presencia de diesel.

### 3 OBJETIVO GENERAL:

Comparar el efecto de tres cepas de *Azospirillum* con capacidad de sintetizar ACC desaminasa, en el desarrollo de dos especies de pasto en suelo adicionado con diesel.

#### 3.1 Objetivos específicos:

- Determinar el efecto de diesel en el desarrollo de *L. perenne* y *L. multiflorum*.
- Determinar el efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* en el desarrollo de *L. perenne* y *L. multiflorum*.
- Determinar el efecto de la inoculación de las cepas de *Azospirillum* en el desarrollo de las dos especies de pasto en presencia de diesel

### 4 HIPOTÉISIS:

*Si las cepas de Azospirillum lipoferum con actividad de ACC desaminasa establecen una buena interacción con las especies de pasto entonces promoverán el desarrollo de la planta en un sustrato contaminado con diesel.*

## 5 MARCO TEÓRICO

### 5.1 Contaminación de suelos

Muchos suelos están contaminados con uno o varios compuestos como metales pesados, compuestos radioactivos o inorgánicos, de éstos los metales pesados incluyen plomo, zinc, cadmio, selenio, cromo, cobalto, cobre, níquel y mercurio; los compuestos radioactivos uranio, cesio o estroncio; y otros compuestos inorgánicos pueden estar presentes como arsénico, sodio, nitrato, amonio o fosfatos.

En adición de los compuestos inorgánicos mencionados, el suelo también puede contaminarse con compuestos orgánicos como los organoclorados, triclorometileno, explosivos como el trinitrotolueno (TNT) y 1,3,5-trinitro-1,3,6-hexahidrotiazina(RDX); otros contaminantes también presentes en suelo son los hidrocarburos benceno, tolueno y xileno (BTX), los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs); otros agentes xenobióticos que contaminan el suelo son los plaguicidas como atrazina y bentazon.

Muchos de estos compuestos pueden ser metabolizados por algunas bacterias del suelo, mediante procesos que son usualmente lentos e ineficientes, como consecuencia del relativo número pequeño de este tipo de microorganismos. Sin embargo, hay evidencia que la biodegradación de compuestos orgánicos recalcitrantes en el suelo es mayor en la rizosfera (Glick, 2003).

La contaminación del suelo por hidrocarburos es originada por derrames y fugas accidentales durante su transporte y manejo; y en el caso específico del petróleo y el diesel ha sido particularmente frecuente durante las últimas décadas.

Los hidrocarburos son poco solubles en agua y estos pueden persistir por grandes periodos en un sitio, debido a esto la remediación de sitios

contaminados con este tipo de compuestos es costoso y difícil (Kechavararzi, 2007).

El diesel es una mezcla compleja de hidrocarburos con un alto contenido de alcanos entre C8 Y C26 los cuales son potencialmente fitotóxicos como el naftaleno, el cual interfiere con el desarrollo normal de la planta (Adam y Duncan, 1999). Los alcanos son contaminantes fáciles de degradar sobre todo aquellos entre C10 y C25, los cuales son más propensos al ataque microbiano para su degradación (Atlas y Bartha, 1993). Sin embargo comparado con otros combustibles, el diesel tiene un alto contenido de HAPs lo cual es de particular preocupación ya que éstos son contaminantes altamente persistentes en el medio ambiente (Wang *et al*; 1990). Hay muchas fuentes de contaminación por HAPs en suelos, los cuales incluyen derivados del fraccionamiento de alquitranes como la creosota, derivados de la producción de acero y de la refinación de combustibles.

Las técnicas usadas para remediar suelos contaminados con HAPs son costosas, consumen tiempo y no son muy eficientes (Suthersan, 2002).

El diesel penetra el suelo, se separa y se filtra por migración descendente, sin embargo esta migración está limitada por las características físicas del combustible. Bajo condiciones normales el diesel será adsorbido por la superficie del suelo rica en materia orgánica, impidiendo su migración hacia el fondo del mismo, por lo cual se mantendrá en la zona de las raíces. Por lo anterior, la fitorremediación es la alternativa para remediar sitios contaminados con diesel (Adam y Duncan, 2002).

## 5.2 Fuentes de contaminación en México

Como consecuencia de varios siglos de actividad minera en México, y posteriormente debido a la industria de la química básica, petroquímica y

refinación del petróleo, se han producido cantidades grandes, pero muy difíciles de cuantificar, de residuos peligrosos. (SEMARNAT, 2002).

Principales causas de contaminación:

- i. Disposición inadecuada de residuos peligrosos en terrenos baldíos, bodegas, almacenes e instalaciones industriales.
- ii. Fugas de materiales peligrosos de tanques y contenedores subterráneos.
- iii. Fugas de materiales peligrosos de tuberías y ductos.
- iv. Lixiviación de residuos peligrosos en sitios de almacenamiento y en sitios donde se desarrollan actividades de manejo de residuos peligrosos.
- v. Derrames accidentales de sustancias químicas por accidentes de transporte. (Proyecto del programa nacional de remediación de sitios contaminados, SEMARNAT, 2008).

En el período 2003-2006 ocurrieron en el país 755 emergencias ambientales que condujeron a la elaboración de una propuesta de remediación. El análisis de cuatro años muestra que los contaminantes involucrados son, en orden de magnitud decreciente:

- ❖ Gasolina Magna
- ❖ **Diesel**
- ❖ Hidrocarburos
- ❖ Petróleo crudo
- ❖ Combustóleo
- ❖ Gasolina Premium
- ❖ Aceites
- ❖ Turbosina

Los responsables principales de dichas emergencias son:

- a) PEMEX
- b) Los transportistas de productos derivados de petróleo y residuos peligrosos
- c) Otras industrias
- d) Ferrocarriles

Las principales causas de emergencias son, en orden de magnitud decreciente:

- I. Fugas de ductos.
- II. Derrames de carros tanque
- III. Robo de hidrocarburos en ductos
- IV. Derrames de materiales peligrosos de tanques de almacenamiento.

Las entidades más afectadas por emergencias ambientales son Veracruz, Tamaulipas, Oaxaca, Hidalgo, Puebla, Guanajuato, San Luis Potosí, Jalisco, Tabasco y Coahuila.

En cuanto al volumen de suelos contaminados, la fuga de ductos contribuyó con el mayor porcentaje en el periodo 2003-2006. En cuanto al área contaminada las gasolinas generan las mayores extensiones de contaminación por accidente. (Proyecto del programa nacional de remediación de sitios contaminados, SEMARNAT, 2008).

### 5.3 Rizobacterias promotoras del crecimiento de plantas (RPCP).

Kloepper (1978) Definió a las RPCP como bacterias de vida libre que colonizan las raíces y estimulan significativamente el crecimiento de plantas; este tipo de bacterias pertenecen a diversos géneros: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcus*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*,

*Enterobacter, Flavobacterium, Frankia, Hydrogenophaga, Serratia, Streptomyces, Vibrio* e incluso el género *Rhizobium* (Bashan y de Bashan, 2005).

En el suelo la mayoría de los microorganismos se encuentra en la rizosfera (región adyacente a la raíz de la planta), donde el ambiente es distinto de la zona edáfica. en la rizosfera se genera la presencia de una gran variedad de sustancias orgánicas, como aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, derivados de ácidos nucleicos, factores de crecimiento y enzimas que estimulan el desarrollo y actividad de los microorganismos, los que establecen asociaciones con las plantas y ejercen un efecto que puede ser benéfico o dañino (Ramírez-Gama y Luna Millán, 1995). En ocasiones, los microorganismos invaden el interior del tejido de las raíces y forman estructuras especializadas en donde fijan nitrógeno, tal es el caso de *Rhizobium sp.* y *Bradyrhizobium sp* que se asocian con leguminosas. En otros casos, los microorganismos permanecen en la rizosfera o en la superficie o interior de las raíces pero sin formar estructuras especializadas (Jiménez *et al*; 2001).

#### 1. Características de RPCP

- La mayoría no invade el interior de los tejidos de las plantas, como ocurre con los hongos micorrízicos que forman arbuscúlos en el interior de las células radicales o como *Rhizobium* que induce la formación de nódulos.
- Presentan una capacidad competitiva elevada, lo que asegura su establecimiento en la rizosfera después de su inoculación.
- Tienen la capacidad para colonizar eficientemente la superficie de la raíz y como consecuencia influyen positivamente en el crecimiento de la planta.

- No producen daño al hombre ni a otros organismos (Jiménez *et al*; 2001).

## 2. Mecanismos directos e indirectos que promueven el crecimiento de plantas.

Los mecanismos que utilizan las RPCP para promover el desarrollo de las plantas son complejos y se clasifican en dos tipos:

- a) Directos. Son mecanismos que producen alteraciones en la fisiología de la planta hospedera.
- b) Indirectos. Estos producen cambios en el balance de las poblaciones microbianas de la rizosfera (Glick y Holguin, 1998).

### a. Mecanismos indirectos:

Las RPCP promueven el desarrollo de la planta indirectamente por la producción de sustancias que dañan o inhiben a otros microorganismos, disminuyendo así las infecciones por patógenos (bacterias, hongos y virus). Los mecanismos que constituyen una forma de control biológico son:

#### ✓ Producción de antibióticos

La producción de antibióticos es quizá el más poderoso mecanismo para inhibir la presencia de fitopatógenos. Diferentes tipos de antibióticos son sintetizados por diferentes microorganismos y han mostrado ser efectivos en condiciones de laboratorio, aunque no necesariamente en condiciones de campo.

Un ejemplo de este tipo de control biológico que actualmente es comercializado es el uso de *Agrobacterium radiobacter* el cual produce Agrocina 84 que controla la presencia del patógeno *A. tumefaciens*, causante de la enfermedad llamada tumor o agallas del cuello de la raíz en árboles frutales. (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

✓ Producción de sideróforos

EL hierro es un elemento esencial para el desarrollo microbiano, que en la mayoría de los casos se encuentra presente en el suelo en una forma mineral no soluble. Algunos microorganismos del suelo, para obtener el hierro, secretan moléculas de bajo peso molecular llamadas sideróforos, cuya función es quelar el Fe (III)(Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008). Los sideróforos sintetizados por las RPCP tienen mayor afinidad al hierro que los sideróforos sintetizados por los hongos patógenos, permitiendo que las RPCP utilicen la mayoría del hierro disponible, esto previene la proliferación de los patógenos. Así, benefician a las plantas en dos formas: Mediante la inhibición de patógenos y por el incremento de hierro disponible para su nutrición, como resultado de lo anterior se tiene un incremento en el desarrollo.

Son muchos los ejemplos de sideróforos implicados en la inhibición de enfermedades de plantas y uno de ellos corresponde a una cepa modificada de *Pseudomonas putida*, la cual produce un sideróforo más efectivo que el que produce la bacteria silvestre para el control biológico del hongo *Fusarium oxysporum* en jitomate (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

✓ Producción de otras moléculas de bajo peso molecular:

Algunas RPCP producen una amplia variedad de metabolitos de bajo peso molecular con potencial antifúngico. El mejor conocido es el ácido cianhídrico (HCN), al ser sintetizado por bacterias se puede inhibir a *Thielaviopsis basicola*, agente que produce la pudrición negra de la raíz en el tabaco. (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

- ✓ Producción de enzimas hidrolíticas (glucanasas, quitinasas, laminarinasas)

Ciertas enzimas hidrolíticas sintetizadas por algunas RPCP, pueden lisar la pared celular de hongos, pero no la pared celular de las células de la planta, y de ese modo previenen la proliferación de fitopatógenos. Por ejemplo, *Pseudomonas stutzeri* produce quitinasa y laminarinasas extracelulares que lisan al patógeno *Fusarium solani*. Igualmente, *Burkholderia cepacia* produce 0-1,3-glucanasa, este metabolito reduce la incidencia de la enfermedad causada por los hongos *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Phytophthora ultimum*. Otra estrategia usada por las RPCP para reducir enfermedades severas en las plantas, es la hidrólisis de productos sintetizados por los hongos, que son dañinos para las plantas. Un ejemplo de este mecanismo es el que presentan, el hongo *Cladosporium werneckii* y la bacteria *B. cepacia*, que pueden hidrolizar ácido fusárico (producido por el hongo *Fusarium*) que causa severos daños a la planta. (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

- ✓ Resistencia sistémica inducida y resistencia sistémica adquirida:  
Las plantas pueden ser protegidas contra patógenos por largos periodos y contra un amplio espectro de microorganismos causantes de enfermedades, haciéndolas más resistentes a la infección. La exposición a patógenos, no patógenos, RPCP y a metabolitos microbianos, estimula un mecanismo natural de defensa en las plantas: la inmunización en contra de infecciones virales, fúngicas, y bacterianas. La resistencia sistémica adquirida (RSA) se presenta cuando un agente patógeno inicia la infección en una planta, y como respuesta esta desarrolla una reacción de hipersensibilidad que limita la infección a una lesión necrótica localizada. Por influencia de esta infección primaria, se generan

moléculas señal que son transportadas a toda la planta, activando el sistema de resistencia que confiere a ésta una capacidad defensiva mejorada. En este proceso, el ácido salicílico juega un papel central como molécula señal.

La resistencia sistémica inducida (RSI) se origina a partir de la percepción de rizobacterias no patógenas por las raíces de la planta produciendo un incremento en el nivel de resistencia, el cual es expresado en posteriores infecciones por un patógeno. En este mecanismo, el reconocimiento de los determinantes bacterianos específicos por la superficie de la raíz modula la producción de moléculas señal, como el ácido jasmónico y el etileno, las que a través de proteínas reguladoras incrementan la resistencia sistémica en la planta.

✓ Competencia y desplazamiento de patógenos:

LA competencia, por nutrientes y nichos disponibles, entre los patógenos y las RPCP es otro mecanismo de control biológico de algunas enfermedades en las plantas. Por ejemplo, altos niveles de inoculación con una cepa de *Pseudomonas syringae* saprofita protege a la pera de los patógenos *Botrytis cinerea* (moho gris) y *Penicillium expansum* (moho azul).

En las hojas hay un número limitado de sitios donde un patógeno puede atacar a la planta, las bacterias capaces de multiplicarse en la superficie de las hojas y formar una población grande, pueden competir satisfactoriamente contra los patógenos por estos sitios y algunas veces reducen las enfermedades por medio de este mecanismo. Estas bacterias pueden ser cepas saprofitas, o patógenos no virulentos. Por ejemplo, la bacteria *A. brasiliense* fue capaz de desplazar de las hojas de jitomate, a *P. syringae*, agente causal de la enfermedad que genera el moteado en jitomates (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

b. Mecanismos directos:

Estos actúan estimulando el desarrollo de las raíces y la nutrición de las plantas, lo que repercute en un mayor crecimiento de las mismas y en el aumento de la producción de frutos y granos. Estos efectos se producen mediante diferentes vías:

a) Fijación de nitrógeno

Existe un grupo de bacterias, conocidas como bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico, que a través del sistema enzimático nitrogenasa reducen el nitrógeno molecular a amonio, lo cual proporciona una fuente importante de nitrógeno asimilable a las plantas; este proceso es particularmente realizado por las bacterias simbióticas formadoras de estructuras especializadas tales como *Rhizobium* y *Frankia* (Postgate, 1981).

Otras bacterias que viven libremente en la rizosfera, sobre las raíces o en el interior de las mismas pero sin formar estructuras especializadas, también fijan nitrógeno, pero en estos casos la aportación es menor. Ejemplo de estas bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre son: *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* y *Derxia* (aerobias); *Bacillus*, *Enterobacter*, y *Pseudomonas* (facultativas); *Clostridium* (anaerobio) y las endófitas: *Acetobacter diazotrophicus*, *Herbaspirillum seropedicae* y *Azoarcus* (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

b) Síntesis de sideróforos:

Las plantas son beneficiadas por rizobacterias productoras de sideróforos, metabolito cuya función es quelar el Fe (III). El mecanismo de transporte a través de la membrana interna no se conoce bien; pero se ha establecido que una vez dentro de la célula, el hierro, estrechamente unido a su sideróforo es reducido a Fe(II), la

forma en la que lo asimilan las bacterias y las plantas (Madigan, *et al*; 2009) Entre las rizobacterias productoras de sideróforos y por lo tanto involucradas en la reducción y solubilización del hierro, se reporta un grupo heterogéneo de bacterias heterotróficas que incluyen, entre otras, a *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Alcaligenes*, *Clostridium* y *Enterobacter* (Atlas y Bartha, 1993).

#### c) Solubilización de minerales

En este proceso es de particular importancia la solubilización de fosfato:

Una alternativa para movilizar el fósforo en el suelo, es el uso de rizobacterias solubilizadoras de fósforo (RSF) también conocidas como fosfobacterias. Este grupo de bacterias es capaz de movilizar de 30 a 50 kg de fósforo por hectárea lo que significa, una reducción neta de 50% en el uso de fertilizantes químicos que aportan este elemento. Como solubilizadoras de fósforo se han reportado a *Enterobacter*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium*, éstas transforman a los fosfatos tribásicos insolubles en fosfatos dibásicos y monobásicos, los cuales son formas solubles y asimilables por las raíces de las plantas (Díaz *et al*; 2001).

#### d) Producción de fitohormonas (auxinas, citocininas, giberelinas)

Diversas especies de RPCP producen estos compuestos que incrementan la velocidad de desarrollo y el rendimiento de las plantas (Barea y Brown, 1974; Brown, 1976; Okon y Kapulnik, 1986 y Lorence, 1999).

#### e) Producción de auxinas:

Las auxinas estimulan el crecimiento de la radícula y raíces adventicias, lo que se refleja en una mayor absorción de agua y nutrientes. La hormona más estudiada de este tipo es el ácido indol-

3-acético (Lambrecht *et al*; 2000 y Vande Broek, 1999), la que previene la caída de flores y frutos, además de retrasar la senescencia (Bartel, 1997 y Patten y Glick, 1996): Entre los microorganismos que producen este compuesto se encuentran *Azospirillum* y *Klebsiella* (Glick, 1995; Bashan y Carrillo, 1996; El-Khawas, 1995, El Khawas y Adachi, 1990 y Torres Rubio *et al*; 2000).

f) Producción de giberelinas:

Estas hormonas presentan diversos efectos dependiendo del tipo de giberelina; las más comunes son GA<sub>1</sub>, GA<sub>3</sub>, GA<sub>4</sub>, GA<sub>7</sub> y GA<sub>9</sub> (BBSRC, 2003 y Lorence, 1999). Éstas ocasionan la estimulación del crecimiento del tallo, la interrupción del periodo de latencia de las semillas (activan la germinación), la inducción de brotes (yemas) y el incremento en el desarrollo de los frutos. Entre los microorganismos productores de giberelinas se reportan: *Azotobacter*, y dos especies del género *Azospirillum*, *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Radamacher, 1994).

g) Producción de citocininas:

Actualmente se conocen más de 200 citocininas naturales y sintéticas, la más común en las plantas es la Zeatina (BBSRC, 2003). La primera citocinina descubierta fue la cinetina la cual es producida por algunas cepas de *Azospirillum*. Dentro de los efectos causados por estas hormonas están: la estimulación de la división celular, retraso en el envejecimiento de los órganos vegetales, promoción de la organogénesis en los callos celulares, el desarrollo de los cloroplastos, entre otros (Rojas y Ramírez, 1993). Entre los microorganismos productores de algunas citocininas se encuentran: *Azotobacter*, *Azospirillum* y *Pseudomonas* (Garcia de Salamone *et al*; 2001).

h) Síntesis de enzimas que modulan el crecimiento o bien reducen los niveles de etileno en la planta.

En respuesta al ataque por patógenos o al estrés, las plantas sintetizan etileno en cantidades mayores que lo normal. El etileno estimula la senescencia y la abscisión de hojas y frutos, inhibe el desarrollo de la planta y provoca la muerte celular en los sitios cercanos a las zonas infectadas. Algunas RPCP sintetizan la enzima ACC desaminasa, la cual puede disminuir los niveles de etileno en las plantas y de ese modo estimular su desarrollo (Bashan y de Bashan, 2005).

### 3. Función de la ACC (1-aminociclopropano-1-carboxilato) desaminasa en la reducción de la concentración de etileno en la planta.

El etileno es una de las moléculas orgánicas más simples cuya actividad biológica se presenta a concentraciones tan bajas como  $0.05\mu\text{L/L}$ . Su efecto se manifiesta en el desarrollo normal de las plantas afectando la germinación de semillas y el crecimiento de raíces, tallos y pétalos, así como en su respuesta a condiciones adversas (Glick, 2005). Es un importante elemento del sistema de regulación endógena de la planta. Durante las etapas de crecimiento, los niveles de etileno se mantienen bajos ( $<0.05\mu\text{L/L}$ ), en tanto que durante la maduración y senescencia de los frutos el nivel aumenta ( $100\mu\text{L/L}$ ) lo que ocasiona la estimulación del envejecimiento y frecuentemente causa la pérdida en la producción de flores y de frutos.

Se ha demostrado que bajo condiciones adversas los niveles de etileno en las plantas aumentan considerablemente, lo cual constituye una respuesta de defensa a los daños causados por metales pesados, temperaturas extremas, sequía, inundación, ataques por insectos u otros patógenos (Glick, 2005).

La producción de etileno en respuesta al estrés es considerado como un fenómeno característico. Por ello, el etileno es a veces llamado una

hormona de alarma que informa a otros tejidos de las perturbaciones en la planta. Por ejemplo, la principal consecuencia de la inundación de los cultivos es el estrés hídrico causado a las plantas por la privación de oxígeno a las raíces, la hipoxia provoca una actividad más alta de ACC sintetasa, lo que ocasiona una mayor producción de ACC en las raíces y esto estimula la síntesis de etileno (Glick *et al*; 2001).

#### Mecanismo de acción

La ACC desaminasa interfiere con la síntesis de etileno en las plantas. Al hidrolizar el ACC, precursor inmediato del etileno, la enzima realiza una desaminación y produce  $\alpha$ -cetobutirato y amonio, acción que determina la disminución de la síntesis de etileno, lo que es particularmente importante en plantas que crecen en condiciones adversas (Glick, 1995).

#### 5.4 Género *Azospirillum*

*A.* El género *Azospirillum* comprende bacterias de vida libre que pertenecen a la clase alfa de las proteobacterias (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000). Actualmente son reconocidas quince especies pertenecientes al género (NCBI, página web):

|                         |                    |
|-------------------------|--------------------|
| <i>A.lipoferum</i>      | <i>A.melínis</i>   |
| <i>A.brasílense</i>     | <i>A.canadense</i> |
| <i>A.amazonense</i>     | <i>A.rugosum</i>   |
| <i>A.halopraeferans</i> | <i>A.palatum</i>   |
| <i>A.irakense</i>       | <i>A.rubí</i>      |
| <i>A.largimobíle</i>    | <i>A.pícis</i>     |
| <i>A.doebereínerae</i>  | <i>A.zeae</i>      |
| <i>A.oryzae</i>         |                    |

#### 5.4.1 Características microscópicas

*Azospirillum* tiene forma vibroide, presenta pleomorfismo y movilidad en espiral (Döbereiner, 1992). Es fijador de nitrógeno, Gram negativo, su tamaño oscila entre 0.1  $\mu\text{m}$  de diámetro y 2.1 a 3.8  $\mu\text{m}$  de longitud (Tarrand et al; 1978).

La movilidad de este género de bacterias se da mediante un flagelo polar con movimiento típico helicoidal o vibratorio en medio líquido, solo *A. brasilense*., *A. lipoferum* y *A. irakense* presentan un flagelo lateral el cual utilizan para desplazarse sobre la superficie cuando se desarrollan en medios de cultivo sólido. La movilidad ofrece a las bacterias la ventaja de desplazarse hacia los lugares en donde haya condiciones de nutrientes favorables, *Azospirillum* muestra una quimiotaxis positiva hacia ácidos orgánicos, azúcares, aminoácidos y compuestos aromáticos (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000)

Las células presentan en su interior elevadas cantidades de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) el cual puede constituir hasta un 50 % del peso seco celular (Okon et al; 1976); estas se observan al microscopio como gránulos refringentes en el interior de las células. Se le han atribuido diferentes funciones biológicas al PHB, por ejemplo permiten una mayor resistencia a la desecación, a la luz ultravioleta y al choque osmótico. Dependiendo de la edad del cultivo, las células pueden cambiar de forma y producir cistos que desempeñan una función importante en la sobrevivencia de las células cuando los nutrimentos son escasos y en los períodos previos a la asociación con la planta (Tal y Okon, 1985)

#### 5.4.2 Características metabólicas y culturales.

Las especies de *Azospirillum* utilizan como fuente de carbono preferentemente a los ácidos orgánicos como el malato y succinato pero

tienen la capacidad de utilizar diferentes azúcares y aminoácidos como fuentes de carbono y energía. Estas células son muy versátiles en su metabolismo, usan una amplia variedad de rutas metabólicas para obtener energía (ATP) y metabolitos intermediarios (Tal y Okon, 1985). Se desarrollan bien a pH neutro, aunque algunas especies prefieren condiciones ligeramente ácidas- La fijación de nitrógeno ocurre únicamente en condiciones microaerofílicas.

### 5.5 Interacción raíz- bacteria

El establecimiento de una asociación exitosa entre la planta y *Azospirillum* ocurre cuando la bacteria es capaz de sobrevivir en el suelo y alcanzar poblaciones significativamente grandes en la raíz del hospedero. En la rizosfera, los exudados radicales establecen un gradiente de nutrimentos que parte de la raíz hacia el suelo adyacente, esto genera quimiotaxis positiva en la bacteria, que utiliza los exudados como fuentes de carbono y energía. De esta manera, los exudados contribuyen en la sobrevivencia y en la colonización de la rizosfera (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

En esta asociación no se forman estructuras especializadas, por lo que es esencial asegurar la unión de la bacteria a la raíz por tres razones principales:

- 1) Si la bacteria no está unida a las células de la epidermis radical, las sustancias promotoras del desarrollo vegetal secretadas por la bacteria se difunden dentro de la rizosfera y son consumidos por los microorganismos antes de llegar a la planta.
- 2) Sin los sitios seguros de unión, el agua puede trasladar a la bacteria lejos de la rizoplanea (superficie de la raíz) y perecer en el suelo deficiente de nutrimentos.
- 3) Los sitios potenciales de asociación disponibles sobre las raíces para las RPCP, son vulnerables a la colonización por otros microorganismos

no benéficos presentes en la rizosfera, por lo que las RPCP tienen que desarrollar diferentes estrategias para permanecer unidas a las raíces, de forma temporal o permanente. (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008).

#### 5.5.1 Unión de *Azospirillum* a la raíz

*Azospirillum* ha desarrollado dos mecanismos de unión:

En el primer mecanismo ocurre una unión a corto plazo, en las primeras horas después del contacto (después de que la bacteria migra hacia las raíces por quimiotaxis y aerotaxis, o hasta que la raíz alcanza el sitio donde se aplicó el inóculo), esto involucra interacciones hidrofóbicas y el reconocimiento, mediado por lectinas, entre la bacteria y la pared celular de la planta.

El segundo mecanismo involucra la formación de una red fibrilar de proteína /polisacárido, la cual ancla permanentemente a la bacteria con la superficie de la raíz. Eventualmente las bacterias se multiplican y forman pequeños agregados que proveen una ventaja ecológica, sobre las que no están agregadas, con respecto a la competencia por los nutrientes que se filtran desde la raíz.

Debido a que las rizobacterias no siempre tienen disponible plantas hospederas factibles de colonizar, han desarrollado mecanismos que les permiten sobrevivir en la ausencia de un hospedero. Para ello, las células pueden formar cistos y flóculos que las protegen de la desecación, producen melanina para bloquear la irradiación ultravioleta., y reducen su metabolismo al mínimo requerido para sobrevivir. Además, en tiempos de abundancia de nutrientes, muchas RPCP almacenan grandes cantidades de poli- $\beta$ -hidroxibutirato que puede mantenerlas por largos períodos en ambientes con escasez de nutrientes. (Bashan y de Bashan 2005 y Bashan *et al*; 2008).

## 5.6 Uso de RPCP en agricultura

El tratamiento de plantas con bacterias benéficas para la agricultura se ha hecho por varios siglos, por ejemplo la inoculación de leguminosas con *Rhizobium* se ha practicado por casi 100 años, y ha tenido un gran impacto en el rendimiento de los cultivos en todo el mundo. También se han registrado prácticas de inoculación sin éxito, tal es el caso de la inoculación con *Azotobacter*, bacteria fijadora de N<sub>2</sub> de vida libre, la cual fue usada a gran escala en Rusia en los años 30's y 40's. La práctica generó resultados no concluyentes y posteriormente fue abandonada. En la actualidad ha resurgido el interés por esta rizobacteria. Otro ejemplo, en el este de Europa en los años 30's, fue el uso de *Bacillus megaterium* para la solubilización del fósforo a gran escala, el cual aparentemente falló.

Dos de las mayores novedades en la tecnología de inoculación de plantas ocurrió en los años 70's, los cuales fueron:

1. Se descubrió que *Azospirillum* podía aumentar el desarrollo de las plantas no leguminosas por medio de un mecanismo que afecta directamente el metabolismo de la planta.
2. Empezaron a investigarse agentes de biocontrol, principalmente de los grupos *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* que pueden actuar como plaguicidas en el control de enfermedades (Bashan y Carrillo, 1996).

El género más conocido entre las RPCP es *Azospirillum*, esta bacteria aumenta el desarrollo de las plantas usando diferentes mecanismos (Cuadro 1), algunos son similares a los usados por otras RPCP. Los esfuerzos mundiales para estudiar a este grupo de bacterias han dado como resultado la disponibilidad de varios inoculantes comerciales usados para promover el desarrollo de maíz, trigo, arroz, vegetales y algunos pastos: AzogreenMR (Inoculante con *Azospirillum lipoferum* para maíz; en Francia) y BioYield (Con *Paenobacillus macerans* y

*Bacillus amyloliquefaciens* para el biocontrol de enfermedades del jitomate y pimienta en los Estados Unidos). Aunque algunas cepas de *Azospirillum* tienen una afinidad por ciertos cultivos, la mayor ventaja de este género es que no es específico para un tipo de planta particular, así que esta puede aumentar el desarrollo de numerosas especies de plantas. Muchos estudios de campo han mostrado que la inoculación con *Azospirillum* incrementa el rendimiento del cultivo (Bashan y de Bashan 2005 y Bashan *et al*; 2008).

Cuadro 1- Beneficios proporcionados a la planta por las bacterias promotoras del desarrollo vegetal.

| Mecanismos                                                      | Efecto en el desarrollo de la planta                                                                | Ejemplos de géneros bacterianos                                                                                        |
|-----------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Fijación de nitrógeno asociada a la raíz                        | Incrementa el contenido de nitrógeno y la biomasa                                                   | <i>Azospirillum</i> ,<br><i>Acetobacter</i><br><i>Azotobacter</i> ,<br><i>Cyanobacteria</i> ,<br><i>Herbaspirillum</i> |
| Producción de fitohormonas (Auxinas, giberelinas , citocininas) | Estimulan elongación de la raíz, incrementan la biomasa de la raíz, e inducen el ciclo reproductivo | <i>Azospirillum</i>                                                                                                    |
| Solubilización de fósforo                                       | Incremento de la biomasa y contenido de fósforo                                                     | <i>Bacillus licheniformis</i> ,<br><i>Vibrio</i>                                                                       |
| Inhibición de la síntesis de etileno en la planta               | Elongación de la raíz                                                                               | <i>Pseudomonas putida</i>                                                                                              |
| Oxidación del azufre                                            | Incrementa la biomasa y el contenido de nutrientes( foliar)                                         | Indefinido                                                                                                             |
| Incremento de la permeabilidad de la raíz                       | Incremento de la biomasa y captación de nutrientes                                                  | <i>Azospirillum</i>                                                                                                    |
| Aumento general de la captación de minerales                    | Incremento de la biomasa y captación de nutrientes                                                  | <i>Azospirillum</i>                                                                                                    |
| Incremento de la producción de nitritos                         | Incremento de la formación de raíces laterales                                                      | <i>Azospirillum</i>                                                                                                    |
| Incremento de                                                   | Incremento de biomasa                                                                               | <i>Azospirillum</i>                                                                                                    |

|                                                                                         |                                                                     |                     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|---------------------|
| acumulación de nitratos                                                                 | y contenido de nitrato                                              |                     |
| Reducción de la toxicidad de metales pesados                                            | Protección en contra de la toxicidad del Níquel                     | <i>Kluyvera</i>     |
| Incremento de nódulos en las leguminosas                                                | Incremento de la biomasa, Contenido de N y rendimiento reproductivo | <i>Azospirillum</i> |
| Incremento de la frecuencia de infección por hongos endomicorrízicos                    | Incremento de la biomasa                                            | <i>Pseudomonas</i>  |
| Incremento de la resistencia a condiciones adversas ( sequía, salinidad , abono toxico) | Promueve la sobrevivencia de la planta e incrementa la biomasa      | <i>Azospirillum</i> |

(Modificado de Bashan y de Bashan, 2005).

### 5.7 Uso de RPCP en aplicaciones ambientales

El uso de las RPCP en años recientes se ha extendido a aplicaciones ambientales. Por ejemplo, especies de *Azospirillum* pueden aumentar la eficiencia de la biorremediación de aguas residuales en sistemas con microalgas, debido a que la proliferación de éstas es estimulada por este género bacteriano.

*Azospirillum* y especies de cianobacterias pueden mejorar la reforestación de los manglares mediante el aumento de la tasa de sobrevivencia y el desarrollo de las plántulas en un entorno desfavorable. Plantas inoculadas con *Kluyvera* han reducido la toxicidad con níquel, por lo que este sistema puede aplicarse en la rehabilitación de sitios contaminados con éste metal. (Bashan y de Bashan, 2005 y Bashan *et al*; 2008)

Los avances en este campo aún son limitados debido a que se tienen que resolver los siguientes problemas críticos:

- a. Aunque se han reportado casos exitosos de remediación con RPCP aún se conoce poco acerca de los mecanismos involucrados y cómo interactúan las RPCP con las raíces y otras bacterias.
- b. Casi todos los trabajos previos en biorremediación con RPCP se han llevado a cabo en laboratorios o invernaderos, se requiere conocer los efectos que ocurrirían en la biorremediación, en un ecosistema más complicado.
- c. La aplicación de esta tecnología está limitada debido a que las RPCP pueden no establecer una interacción exitosa con ciertas plantas.
- d. Aunque algunas RPCP pueden incrementar la tolerancia de las plantas a los contaminantes, los sistemas RPCP –planta pueden no sobrevivir en ambientes extremos así como en altas concentraciones del contaminante (Zhuang *et al*; 2007).

## 6 MATERIAL Y MÉTODOS:

### 6.1 Plan de trabajo

La estrategia para la ejecución del experimento se resume en la figura 1.

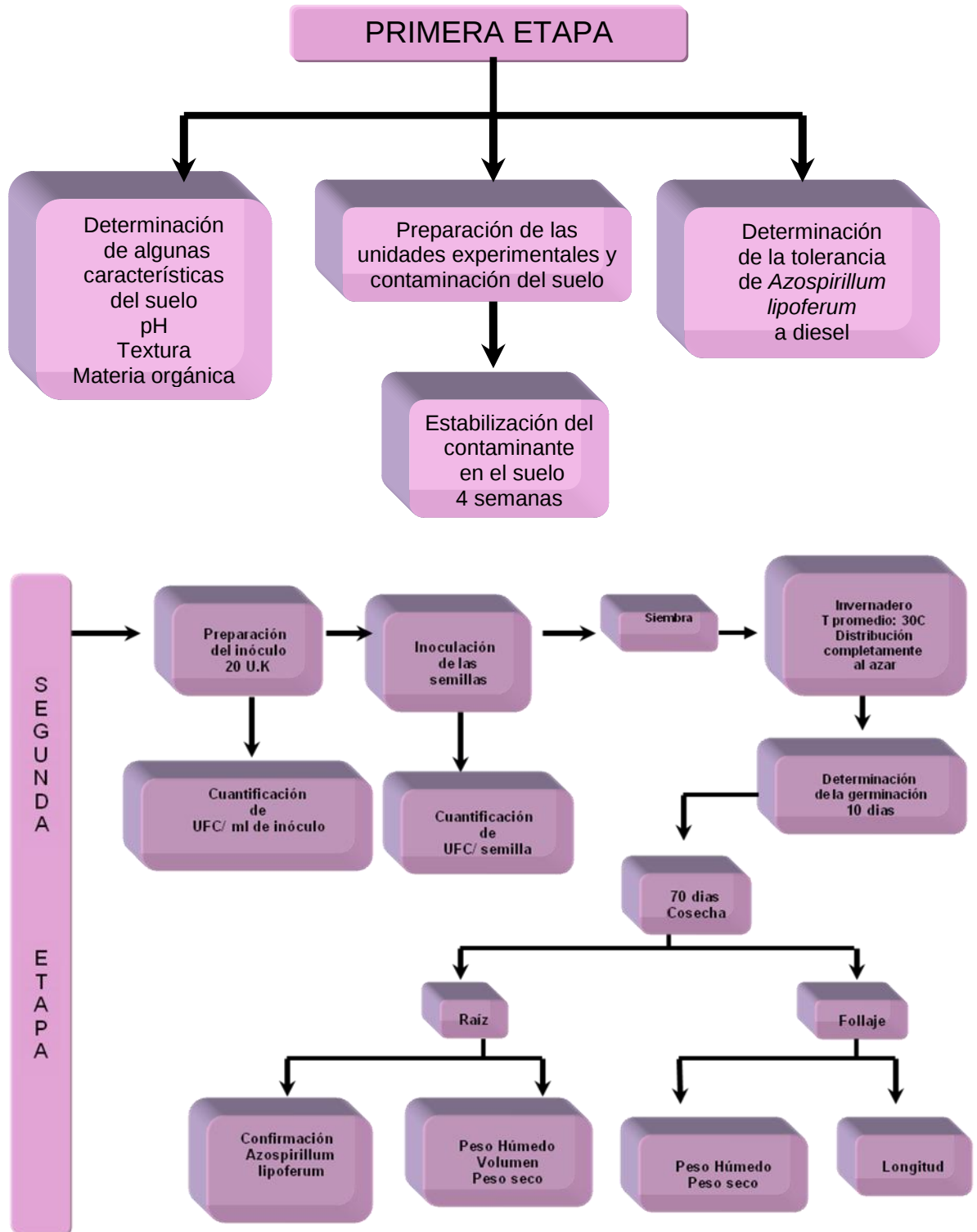


Figura 1. Diagrama general de trabajo.

## PRIMERA ETAPA EXPERIMENTAL

### 6.2 Semillas de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

En este trabajo se emplearon dos pastos *Lolium perenne* (P1, variedad Rye grass perenne tetraploide) y *Lolium multiflorum* (P2, variedad Rye grass annual Gulf hoja delgada). Las semillas fueron obtenidas comercialmente, son semillas certificadas (85% germinación, 99 % pureza).

Para conocer la viabilidad de las semillas se determinó el porcentaje de germinación, para ello se colocaron 10 semillas de cada especie en cajas petri con un papel filtro, (por triplicado), se agregaron 4 ml de agua para mantener húmedas las semillas y se incubaron a 28 C por un periodo de 7 días.

### 6.3 Diesel:

El diesel fue obtenido en una gasolinera de la ciudad de México.

### 6.4 Suelo

El suelo fue obtenido del invernadero Faustino Miranda en Ciudad Universitaria.

Antes de la adición del diesel el suelo se secó a temperatura ambiente y después se tamizó con una malla del número 10.

#### 6.4.1 Determinación de algunas propiedades físicas y químicas del suelo

- pH

Se pesaron 50 g de suelo y se agregaron 125 mL de agua destilada (relación 1:2.5), se agito durante 5 minutos y se tomó la lectura con un potenciómetro.

- Textura del suelo

#### (Método del hidrómetro)

Se pesaron 60 gramos del suelo en un vaso de precipitados de 500 mL, se añadieron 40 mL de agua oxigenada y ésta se evaporó hasta sequedad. Se agregaron otros 40 mL de agua oxigenada se evaporó

nuevamente hasta sequedad, se repitió el tratamiento hasta que se observó que no existía efervescencia al añadir el agua oxigenada.

Después de la eliminación de la materia orgánica, se pesaron 50 gramos de suelo y se colocaron en un vaso de precipitados de 250 mL, se agregó agua hasta cubrir la superficie del suelo con una capa de aproximadamente 2 cm. Se añadieron 5 mL de una solución de metasilicato de sodio y se dejó reposar durante 15 minutos. Se colocó la muestra en la copa del agitador mecánico, pasando todo el material con la ayuda de una piceta, se agitó durante 15 min, y se vertió el contenido de la copa en una probeta de 1000 mL, lavando la copa con agua destilada. Se agregó agua hasta completar un volumen de un litro con el hidrómetro colocado dentro de la suspensión, se retiró el hidrómetro y suspendió el suelo agitando durante un minuto con el agitador de mano, se tomaron las lecturas con el hidrómetro a los 40 segundos y a las 2 horas después de la dispersión del suelo con el agitador de mano.

Para hacer la lectura, se colocó el hidrómetro dentro de la probeta 20 segundos antes del momento de la determinación, cuidando de alterar lo menos posible la suspensión. Después de la lectura, se sacó el hidrómetro y se determinó la temperatura de la suspensión. (Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000).

- Materia orgánica

Se colocaron 0.5 gramos de suelo secado en la estufa, dentro de un matraz Erlenmeyer de 500 mL, se agregaron 10 mL de la solución de  $K_2Cr_2O_7$  1N (utilizando la bureta) y se mezcló perfectamente bien por agitación. Se añadieron 20 mL de  $H_2SO_4$  concentrado (colocado en una probeta graduada) y se agitó cuidadosamente durante un minuto, se dejó reposar el matraz a temperatura ambiente durante 20 a 30 minutos, para que la reacción fuera completa, después se agregaron 200 mL de agua destilada para diluir, se añadieron 10 mL de  $H_3PO_4$  al 85% y se tituló con una solución ferrosa 0.5 N. (Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000).

En el Cuadro 2 se presentan los resultados de estas determinaciones.

Cuadro 2. Algunas propiedades físicas y químicas del suelo.

| Determinación    | Resultado               |
|------------------|-------------------------|
| Materia orgánica | 5.46 %                  |
| pH               | 7.2                     |
| Textura          | Franco arcillo arenoso. |

#### 6.4.2 Adición del diesel al suelo

Se colocaron 400g de suelo previamente secado a temperatura ambiente en una bolsa de plástico negro de 20x25 cm (unidades experimentales), se agregó el diesel necesario para tener una concentración inicial de 1% y 3% (p/p), mezclando lo suficiente para que éste se distribuyera lo mejor posible en el suelo de las unidades experimentales.

Se dejó en reposo a temperatura ambiente por un periodo de 4 semanas para la estabilización del diesel en el suelo, ya que hay volatilización de la fracción ligera del contaminante.

#### 6.5 Cepas de *Azospirillum*

Se emplearon 3 cepas de *Azospirillum lipoferum* cuya información se presenta en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Cepas de *Azospirillum* utilizadas en el ensayo.

| CLAVE | PROCEDENCIA                    | Actividad ACC desaminasa<br>( $\mu$ molacetobutirato/mg<br>proteína/hora). ** |
|-------|--------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| AzM1  | Raíces de <i>Zea mays</i> *LME | 2.41 $\pm$ 0.53                                                               |

|      |                                |           |
|------|--------------------------------|-----------|
| AzM3 | Raíces de <i>Zea mays</i> *LME | 3.31±0.21 |
| AzM5 | Raíces de <i>Zea mays</i> *LME | 2.81±0.92 |

\*LME Laboratorio de Microbiología Experimental.

\*\* *Datos tomados de Camarillo, 2006.*

#### 6.5.1 Activación y verificación de pureza de las cepas

##### 6.5.1.1 Activación

La activación se llevó a cabo a partir de cultivos liofilizados, para ello las ampollitas, se desinfectaron superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio (5% v/v), se abrieron las ampollitas sobre una torunda estéril e hidrataron por 1 o 2 minutos con unas gotas de caldo nutritivo, se colocó la suspensión obtenida en un matraz con el mismo medio y se incubó con agitación (150rpm) a 34 °C, durante 72 hrs. A partir de este cultivo se inoculó por estría en una placa de gelosa nutritiva, se incubó a 35 °C durante un periodo de 3 a 7 días.

##### 6.5.1.2 Verificación de pureza

Se realizó mediante la observación de características microscópicas y macroscópicas o coloniales de cultivos en placa de gelosa nutritiva.

##### 6.5.1.3 Características microscópicas

- Mediante preparaciones húmedas.

Se investigó la presencia de bacilos con desplazamientos rápidos, con movimientos en espiral sobre su propio eje y la presencia de gránulos refringentes.

- Mediante preparaciones fijas con tinción de Gram.

Se investigó la presencia de bacilos ligeramente curvos, Gram negativos, con extremos celulares redondeados y/o la presencia de cistos (células refringentes con forma ovoide y de paredes gruesas similares a quistes).

#### 6.5.1.4 Características Macroscópicas:

- En placas de agar nutritivo.

Se investigó la presencia de un solo tipo de colonias con las características típicas de cada cepa.

Cuadro 4. Características macroscópicas de las Cepas de *Azospirillum*.

| Clave | Forma    | Borde     | Color          | Aspecto              | Elevación                               |
|-------|----------|-----------|----------------|----------------------|-----------------------------------------|
| AzM1  | Circular | Irregular | Rosa-salmón    | Seco                 | Plana formada por círculos concéntricos |
| AzM3  | Circular | Irregular | Rosa-salmón    | Seco                 | Plana formada por círculos concéntricos |
| AzM5  | Circular | Entero    | Amarillo claro | Liso con brillo leve | Convexa                                 |

- Comprobación de la fijación de nitrógeno.

Una vez que se confirmó la pureza de las cepas, se seleccionaron unas colonias aisladas, a partir de éstas se inocularon en medio NFb semi-sólido y se incubaron por 3 días a 35 °C.

Se confirmó la fijación de nitrógeno, por el desarrollo de una película por debajo de la superficie del medio y vire del indicador

#### 6.5.1.5 Conservación de las cepas.

Los cultivos de trabajo se mantuvieron en el medio Nfb a 4° C.

### 6.5.2 Tolerancia de las cepas de *Azospirillum* al Diesel

Para la determinación de la tolerancia de las tres cepas de *Azospirillum*, se esterilizó diesel por medio de filtración en membrana el cual se colocó en un frasco estéril para su almacenamiento.

Del diesel estéril se agregó 1mL en placas de agar nutritivo y medio Nfb , éste se extendió con una asa de Digrafsky (varilla de vidrio doblada en ángulo recto) previamente esterilizada.

Con una asa bacteriológica estéril se inocularon las cepas AZm1, AZm3, AZm5 en el medio agar nutritivo (con diesel y sin éste) y en el medio Nfb sólido (con diesel y sin éste), esto se realizó por triplicado, se incubó a 35 °C durante un periodo de 7 días.

La tolerancia al diesel se determinó mediante la comparación del desarrollo de las cepas en los medios con y sin el contaminante

## SEGUNDA ETAPA EXPERIMENTAL

### 6.6 Sitio donde se realizó el experimento

Se empleó un invernadero cubierto con plástico especial y malla sombra para regular la entrada de luz a un 80%, Sin regulación de temperatura por lo que la variación fue de 34-45°/10-15° C (día/noche).

### 6.7 Tratamientos

Claves utilizadas en este experimento:

P1 = *Lolium perenne* variedad Rye grass perenne tetraploide

P2= *Lolium multiflorum* variedad Rye grass annual Gulf hoja delgada.

Cepas de *Azospirillum lipoferum*= AzM1, AzM3 y AzM5

S/B = Sin bacteria

Concentraciones de diesel (p/p) = 0%, 1% y 3%

Cuadro 5. Los tratamientos que se emplearon en este trabajo fueron los siguientes:

## CONTROLES

| Pasto | Bacteria | Concentración | Pasto | Bacteria | Concentración |
|-------|----------|---------------|-------|----------|---------------|
| P1    | S/B      | 0%            | P2    | S/B      | 0%            |
| P1    | S/B      | 1%            | P2    | S/B      | 1%            |
| P1    | S/B      | 3%            | P2    | S/B      | 3%            |

## TRATAMIENTOS

|    |      |    |    |      |    |
|----|------|----|----|------|----|
| P1 | AzM1 | 0% | P2 | AzM1 | 0% |
| P1 | AzM1 | 1% | P2 | AzM1 | 1% |
| P1 | AzM1 | 3% | P2 | AzM1 | 3% |
| P1 | AzM3 | 0% | P2 | AzM3 | 0% |
| P1 | AzM3 | 1% | P2 | AzM3 | 1% |
| P1 | AzM3 | 3% | P2 | AzM3 | 3% |
| P1 | AzM5 | 0% | P2 | AzM5 | 0% |
| P1 | AzM5 | 1% | P2 | AzM5 | 1% |
| P1 | AzM5 | 3% | P2 | AzM5 | 3% |

### 6.8 Preparación del inóculo

Se preparó una suspensión bacteriana en caldo nutritivo a una densidad óptica de 20 UK que corresponde aproximadamente a  $2.5 \times 10^8$  células/mL.

Se realizó un control de calidad del inóculo determinando las unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro, para ello se aplicó el método de gota o de Miles y Misra.

### 6.9 Inoculación de las semillas

Se desinfectó la superficie de las semillas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % por 10 min y después se enjuagó con agua destilada estéril hasta que no se detectó la presencia de Hipoclorito. Las semillas se dejaron reposar por 2 horas a temperatura ambiente en la suspensión bacteriana, después se pasaron éstas a cajas de Petri estériles las que se dejaron abiertas en una campana de flujo laminar por

30 min antes de sembrar. Se realizó un control de calidad de la inoculación de las semillas determinando las UFC por semilla inoculada, para ello se aplicó el método de gota o de Miles y Misra.

#### 6.10 Siembra de las semillas

Para todos los tratamientos se sembraron 20 semillas inoculadas previamente con las cepas de *A. lipoferum*, las semillas se colocaron a una profundidad de 0.5 cm en el suelo previamente humedecido con 250 mL de agua, y se les cubrió con una pequeña capa de suelo.

##### 6.10.1 Determinación del porcentaje de germinación de las semillas

Se realizó a los 10 días después de la siembra contando el número de semillas que germinaron durante ese periodo.

#### 6.11 Cuidado de las unidades experimentales

Riego: Se regó con agua de la red local, tres veces por semana.

El volumen de agua varió con la etapa de crecimiento de los pastos

#### 6.12 Variables evaluadas.

A los 70 días se retiraron las plantas de la unidad experimental y fueron divididas en parte radical (raíz) y parte aérea (follaje).

Las variables medidas fueron:

Parte radical:

- Peso húmedo
- Peso seco
- Volumen.
- Presencia de *Azospirillum*

Parte aérea:

- Peso húmedo
- Peso seco
- Longitud

### 6.13 Métodos

#### 6.13.1 Determinación de la presencia de *Azospirillum* al final del experimento.

Debido a la gran cantidad de muestras no se hizo la cuantificación de las poblaciones bacterianas, solo se tomaron muestras representativas de las raíces; se desinfectaron con hipoclorito al 5% posteriormente se enjuagó con agua destilada estéril, inmediatamente después se colocaron las raíces dentro de los tubos de ensaye con el medio Nfb semisólido. Los tubos se incubaron a 35°C por 48 hrs, a partir de este tiempo se observó la aparición de una película blanca, característico vire del indicador y mediante la observación microscópica de la morfología típica.

#### 6.13.2 Determinación de Peso Húmedo, Volumen y Peso Seco de la parte radical.

La parte radical se pesó en una balanza granataria con una sensibilidad de 0.01 g, después se colocó la raíz en una probeta de 500 ml con agua y por desplazamiento del volumen se determinó el volumen radical.

Las raíces se dejaron escurrir en papel absorbente y posteriormente se colocaron, en bolsas de papel, y se secaron en la estufa a 110 °C hasta peso constante y la determinación del peso seco se llevo a cabo en una balanza analítica

#### 6.13.3 Determinación del Peso Húmedo y Seco de parte aérea

La parte aérea (follaje) se pesó en una balanza granataria con una sensibilidad de 0.01 g. Para la determinación del peso seco, el follaje se colocó en bolsas de papel, se secó, en la estufa a 110 °C hasta obtener

un peso constante. La determinación del peso se realizó en una balanza granataria.

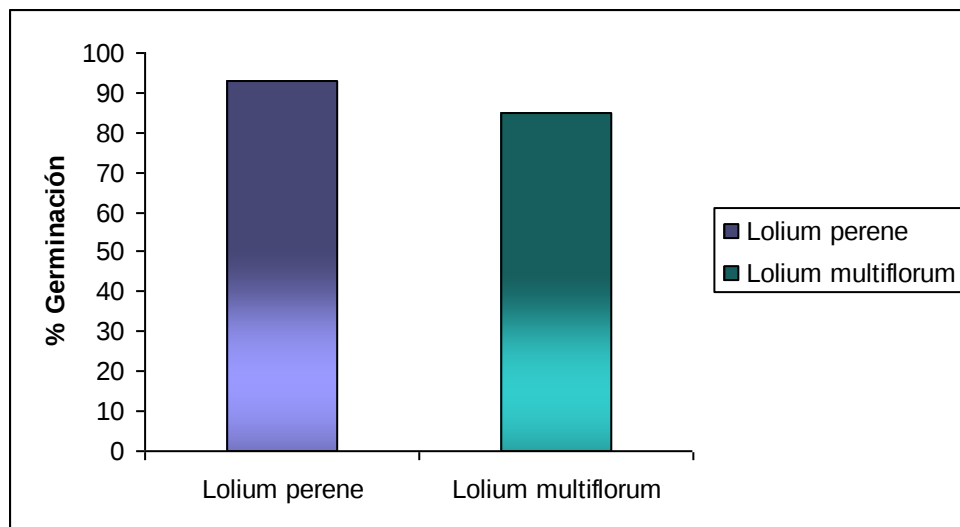
#### 6.13.4 Medición de la longitud de la parte aérea.

La longitud de la parte aérea se midió con una regla de la base del follaje a la punta de éste.

A cada una de las variables determinadas se le aplicó un análisis de varianza y para la separación de medias se utilizó la prueba de Duncan, con el software estadístico SPSS 17 para Windows.

## 7 RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1 Viabilidad de las semillas.



**Gráfica 1.** Viabilidad de las semillas de las dos especies de pastos.

La gráfica 1 muestra que el porcentaje de germinación de *Lolium perenne* es de 93% y de *Lolium multiflorum* es de 85%. Los porcentajes de germinación indican que la semilla tiene la viabilidad que corresponde a una semilla certificada.

### 7.2 Tolerancia de las Cepas de *Azospirillum* al Diesel.

**Cuadro 6.** Desarrollo de *Azospirillum* en presencia de diesel y efecto de éste en sus características microscópicas.

| Cepa | Agar nutritivo | NFb | Tinción Gram                  | Preparación en fresco             | Agar nutritivo + Diesel | Nfb+ Diesel | Tinción Gram                  | Preparación en fresco             |
|------|----------------|-----|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|-------------|-------------------------------|-----------------------------------|
| AZM1 | ++             | ++  | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral | ++                      | ++          | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral |
| AZM3 | ++             | ++  | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral | ++                      | ++          | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral |

|      |    |    |                               |                                   |    |    |                               |                                   |
|------|----|----|-------------------------------|-----------------------------------|----|----|-------------------------------|-----------------------------------|
| AZM5 | ++ | ++ | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral | ++ | ++ | Bacilos curvos Gram negativos | Bacilos con movimiento en espiral |
|------|----|----|-------------------------------|-----------------------------------|----|----|-------------------------------|-----------------------------------|

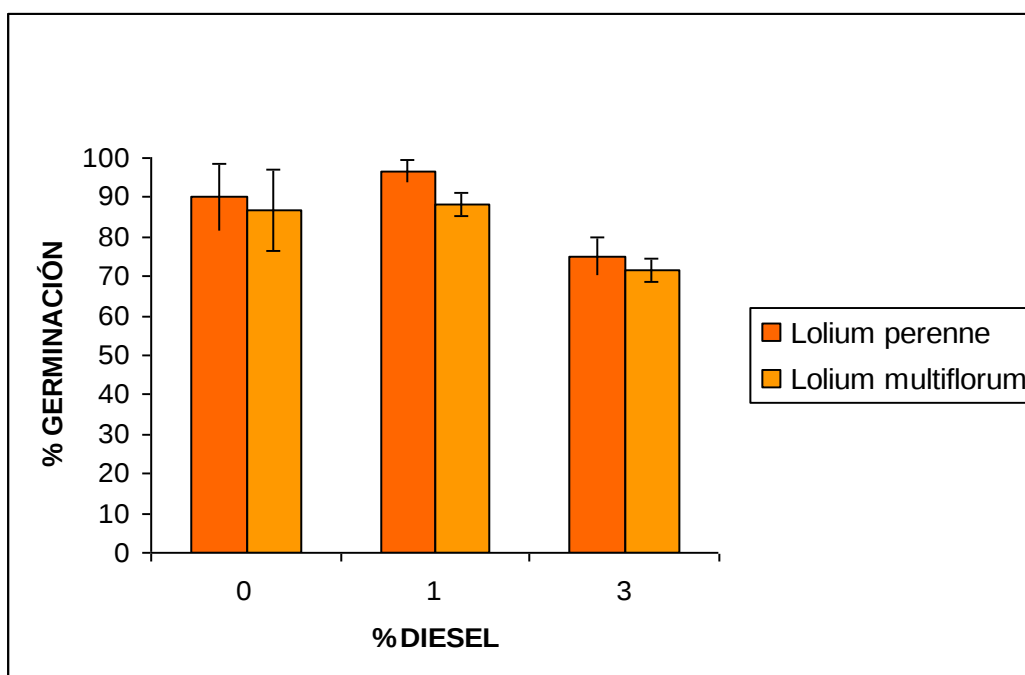
++ Crecimiento

- No crecimiento

El Cuadro 6 muestra que las cepas de *A. lipoferum* crecen en el medio agar nutritivo +diesel y Nfb +diesel, y éste desarrollo fue similar al que se obtuvo en los controles sin el contaminante. La tinción Gram indica que no se ven alteradas las características de tinción y la morfología debido a la presencia del diesel y la preparación en fresco muestra que la movilidad tampoco se ve afectada.

Estos resultados concuerdan con los reportados por Muratova *et al*; 2005 y Huang *et al*; 2004 quienes mencionan que cepas de *A. lipoferum* y *A. brasiliense* son tolerantes a la presencia de hidrocarburos.

### 7.3 Efecto del diesel en la germinación.

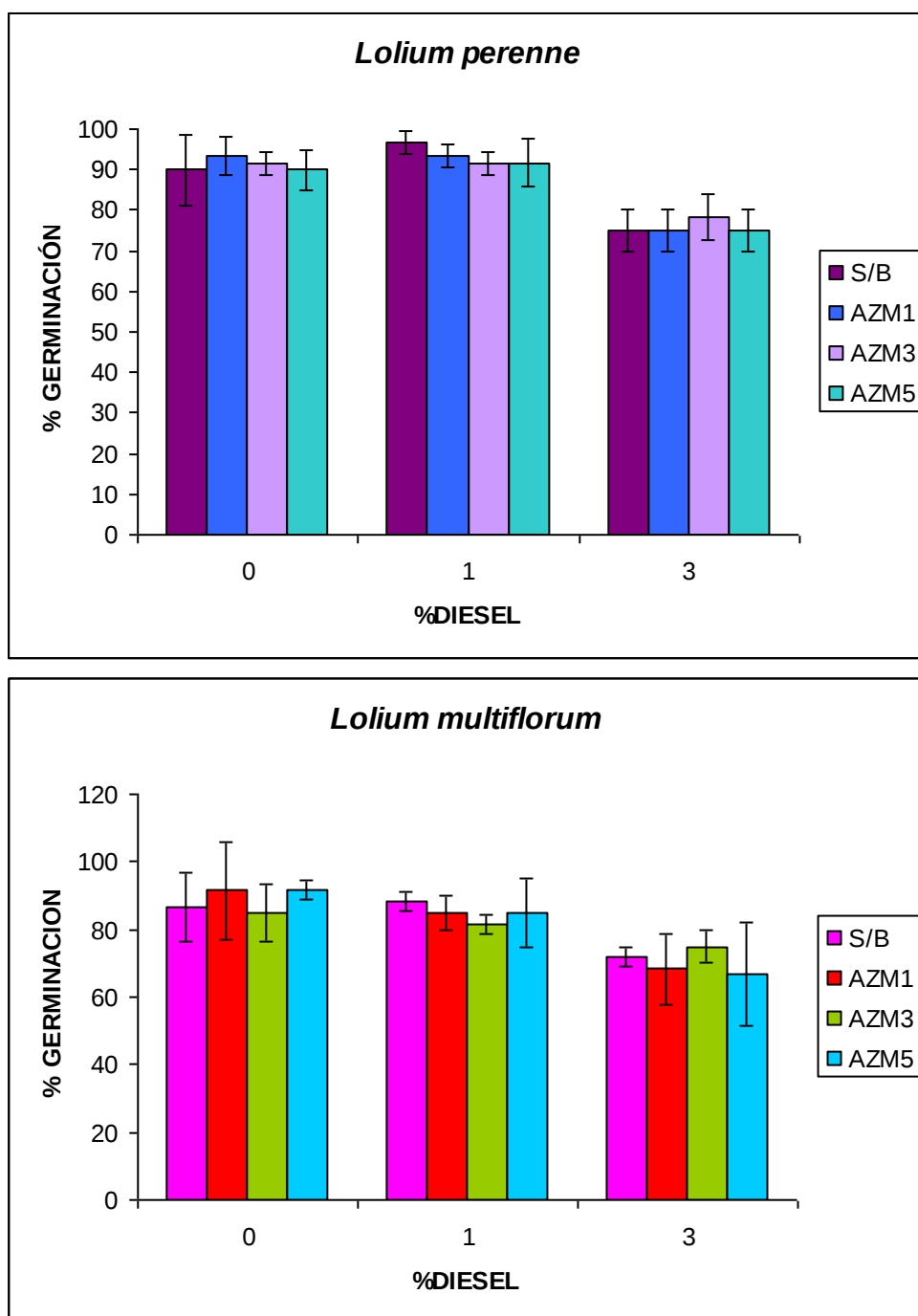


**Gráfica 2.** Efecto del diesel en la Germinación de semillas de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

En las dos especies de pasto se observa que la germinación se ve afectada por la concentración mayor, para el caso de *L. perenne* tiene

una disminución del 22 % y para *L. multiflorum* es del 20% con respecto al control. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 1 y 3) se observa que existe una diferencia significativa en los valores de germinación de *L. perenne* y *L. multiflorum* con respecto a la concentración de diesel; la prueba de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 2 y 4) indica que solo la concentración del 3% afecta de manera significativa a la germinación de *L. perenne* y *L. multiflorum* ., estos resultados coinciden con lo reportado por Adam y Duncan, 1999, 2002; Palmroth M, 2002; Etsuko *et al*; 2007 y Greemberg *et al*; 2007, que indican que la inhibición de la germinación aumenta conforme se incrementa la concentración de diesel.

7.4 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la germinación de las semillas de *L. perenne* y *L. multiflorum*.



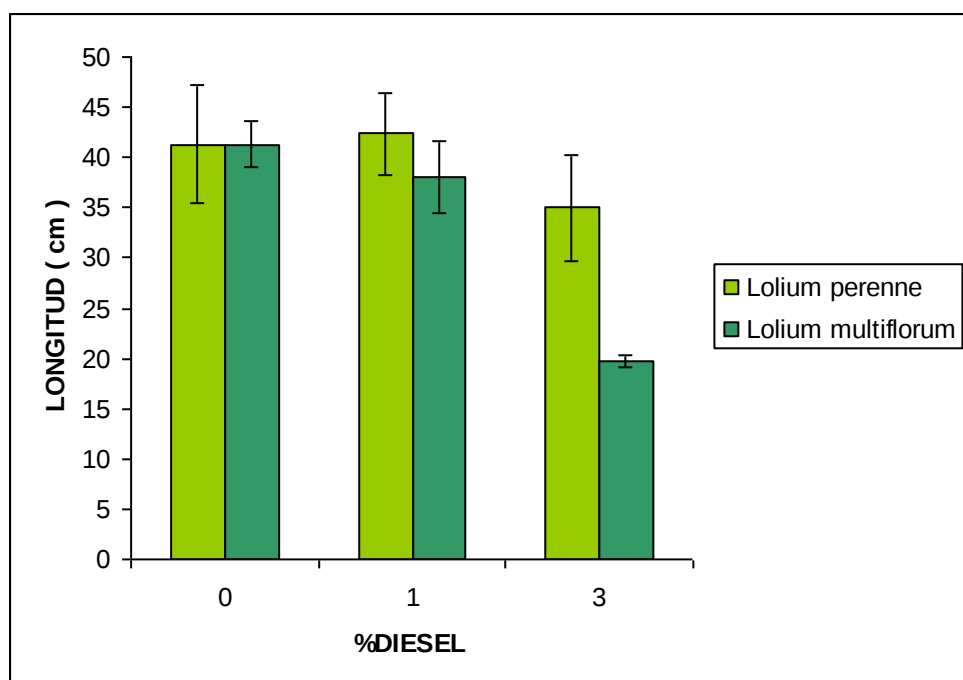
**Gráfica 3.** Efecto de la cepas de *A. lipoferum* en el % de Germinación de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

En las dos especies de pastos se observa que la inoculación de las tres cepas de *A. lipoferum* no tienen efecto en la germinación, lo que se

confirma con el análisis estadístico (ver anexo 1, cuadros: 5, 6, 7 y 8), en donde se muestra que la única diferencia significativa es la que promueve la presencia del 3% de diesel.

Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Huang *et al.*, 2004 que indican que la inoculación de bacterias promotoras del crecimiento favorecen la germinación de las semillas.

#### 7.5 Efecto de la presencia de diesel en la longitud de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

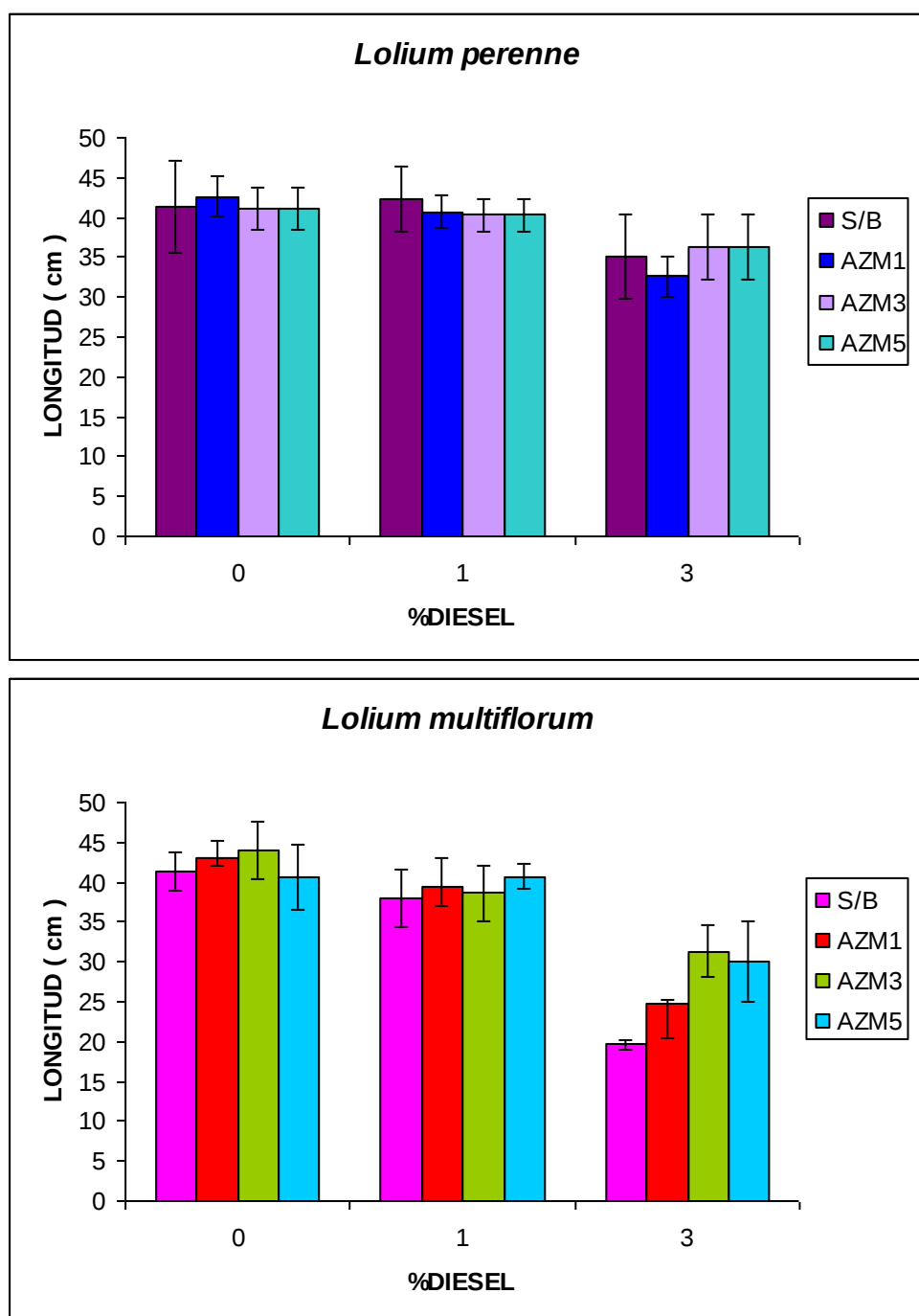


**Gráfica 4.** Efecto del diesel en la longitud de la parte aérea de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*.

En la gráfica 4 vemos una disminución del 15% de la longitud de la parte aérea de *L. perenne* con respecto al control en presencia de la concentración mayor de diesel, y de 52% en *L. multiflorum*. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza y de la separación de medias (ver anexo 1, cuadros 9, 10, 11 y 12), se observa que solo la concentración del 3% afecta de manera significativa la longitud de la parte aérea de estas dos especies de pasto, y es más marcado en *L. multiflorum*.

Estos resultados no concuerdan con los reportados por Binet *et al.*, 2000 quienes mencionan que *L. perenne* es tolerante a la presencia de hidrocarburos, Tampoco existe concordancia con lo publicado por Adam y Duncan, 2002; Palmroth, 2002; Etsuko *et al.*; 2007 y Greemberg *et al.*; 2007 quienes reportan que *Lolium multiflorum* es uno de los pastos más tolerante a la presencia de diesel. Cabe mencionar que dichos autores no indican la variedad utilizada por lo que esta discrepancia en los resultados pudiera deberse a que no utilizan la variedad usada en este bioensayo.

7.6 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.



**Gráfica 5.** Efecto de la inoculación cepas de *A. lipoferum* en longitud de la parte aérea de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*

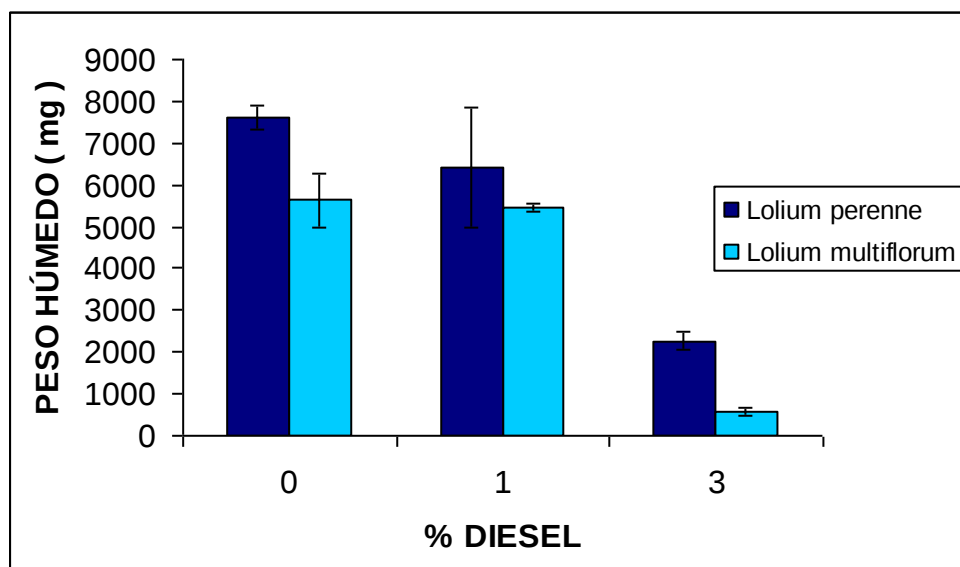
La gráfica 5 muestra que no hay efecto de la inoculación de las cepas de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea de *L. perenne*, ya que

los valores de longitud con respecto al control están en los mismos rangos. El análisis estadístico (ver anexo 1, cuadros: 13y 14) indica que la diferencia significativa de la longitud de la parte aérea corresponde a la presencia del diesel en la mayor concentración y la presencia de la cepa no tiene efecto.

Para el caso de *L. multiflorum* se observa que el efecto de la inoculación de las cepas de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea solo se expresa en la concentración mayor de diesel, cuando se inocula con AZM1 hay un incremento del 25% en esta variable con AZM3 59% , y con AZM5 se incrementa en un 53% con respecto al control.

El análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 15) muestra diferencia significativa con respecto a la inoculación de cada una de las cepas y la prueba de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 16 ) indica que en la concentración del 3% de diesel, las cepas AZM3 y AZm5 incrementan el desarrollo de la planta en presencia del contaminante. Esta respuesta puede deberse a que las condiciones adversas provocadas por la más alta concentración de diesel, activa en las cepas la producción de la ACC desaminasa, la enzima que disminuye el estrés químico en las plantas. Aún cuando se ha reportado que las tres cepas de *Azospirillum* tienen la capacidad de sintetizar la ACC desaminasa (Camarillo, 2006) únicamente se expresa en las cepas AZm3 y AZm5 cuando estas se asocian con *L. multiflorum* en presencia de elevada concentración de diesel.

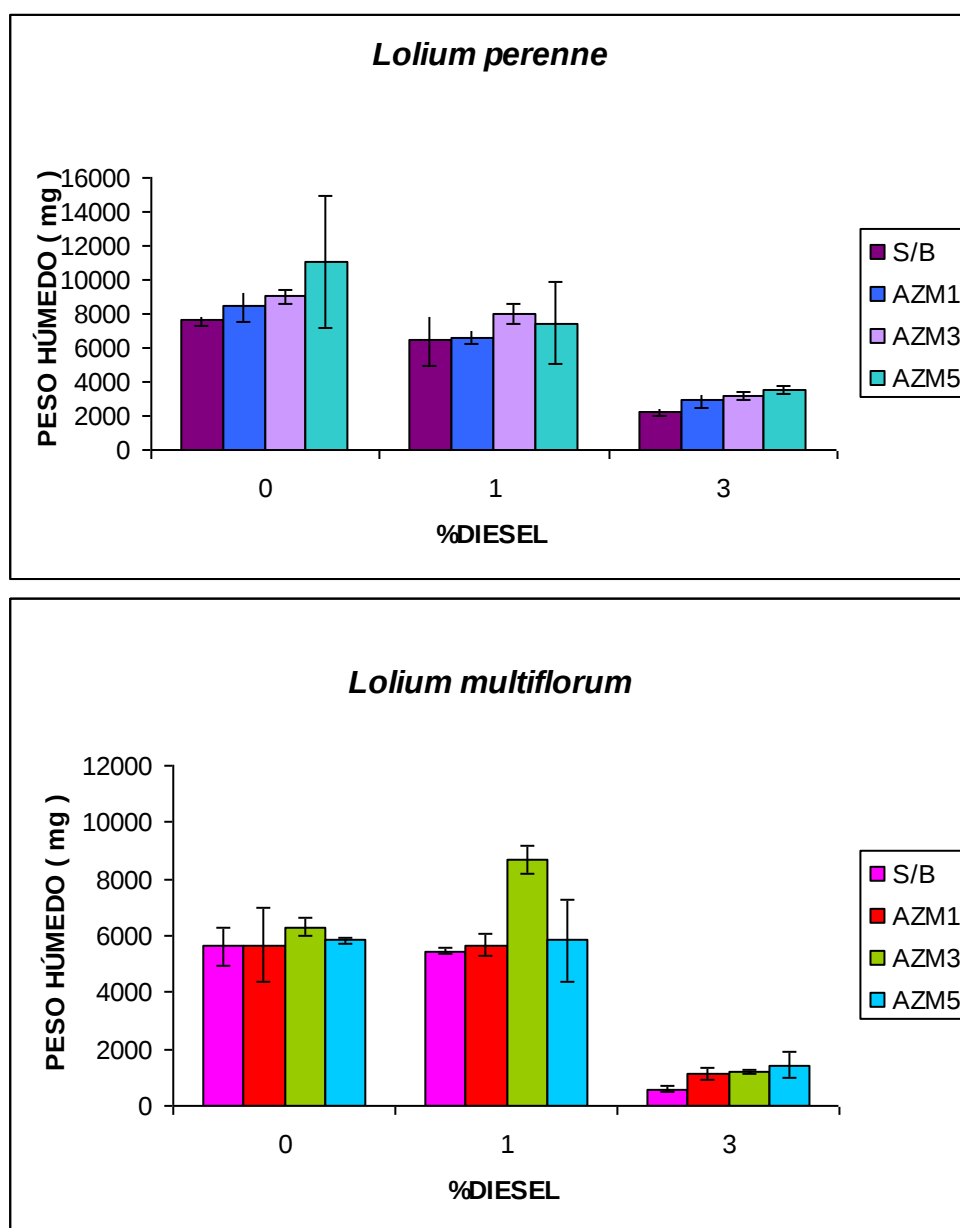
7.7 Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de la parte aérea en *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*



**Gráfica 6.** Efecto del diesel en el peso húmedo de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*

En la gráfica 6 se observa que el peso húmedo de *L. perenne* y *L. multiflorum* disminuye conforme aumenta la concentración de diesel; a la concentración mayor, el primero disminuye en un 70% y en la segunda especie en un 96% con respecto al control. El análisis estadístico (anexo1, cuadros: 17, 18, 19 y 20) confirma que la concentración del 3% de diesel afecta de manera significativa a los dos tipos de pasto.

7.8 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

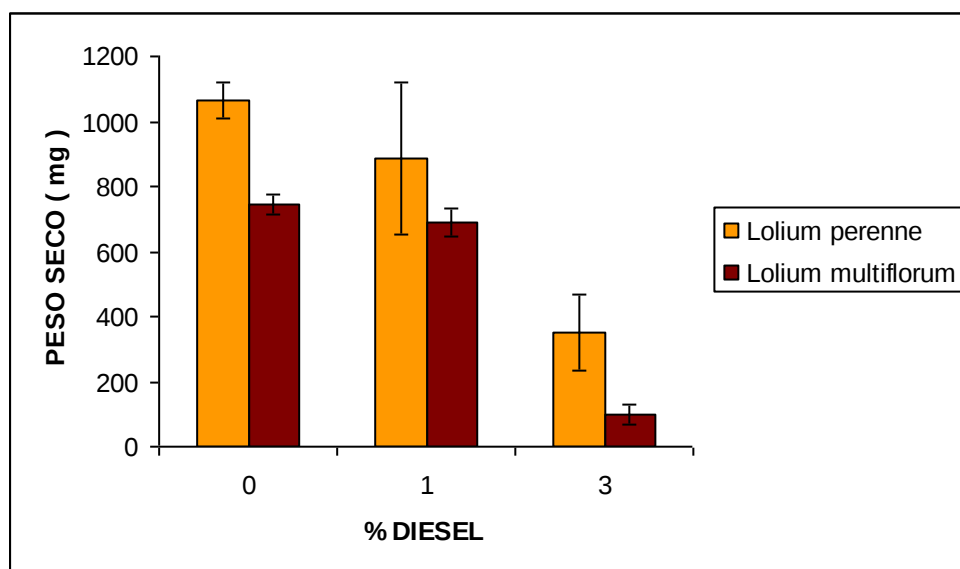


**Gráfica 7.** Efecto de la inoculación de las cepas *A. lipoferum* en el peso húmedo de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*

En la Gráfica 7 se puede observar que el mayor efecto sobre esta variable es la concentración de diesel. Con respecto al efecto de las cepas no son contundentes debido a la gran variabilidad que presentan los valores de las medias.

De acuerdo a las desviaciones estándar tan grandes que se observan en la gráfica ya no se les aplicó el análisis estadístico.

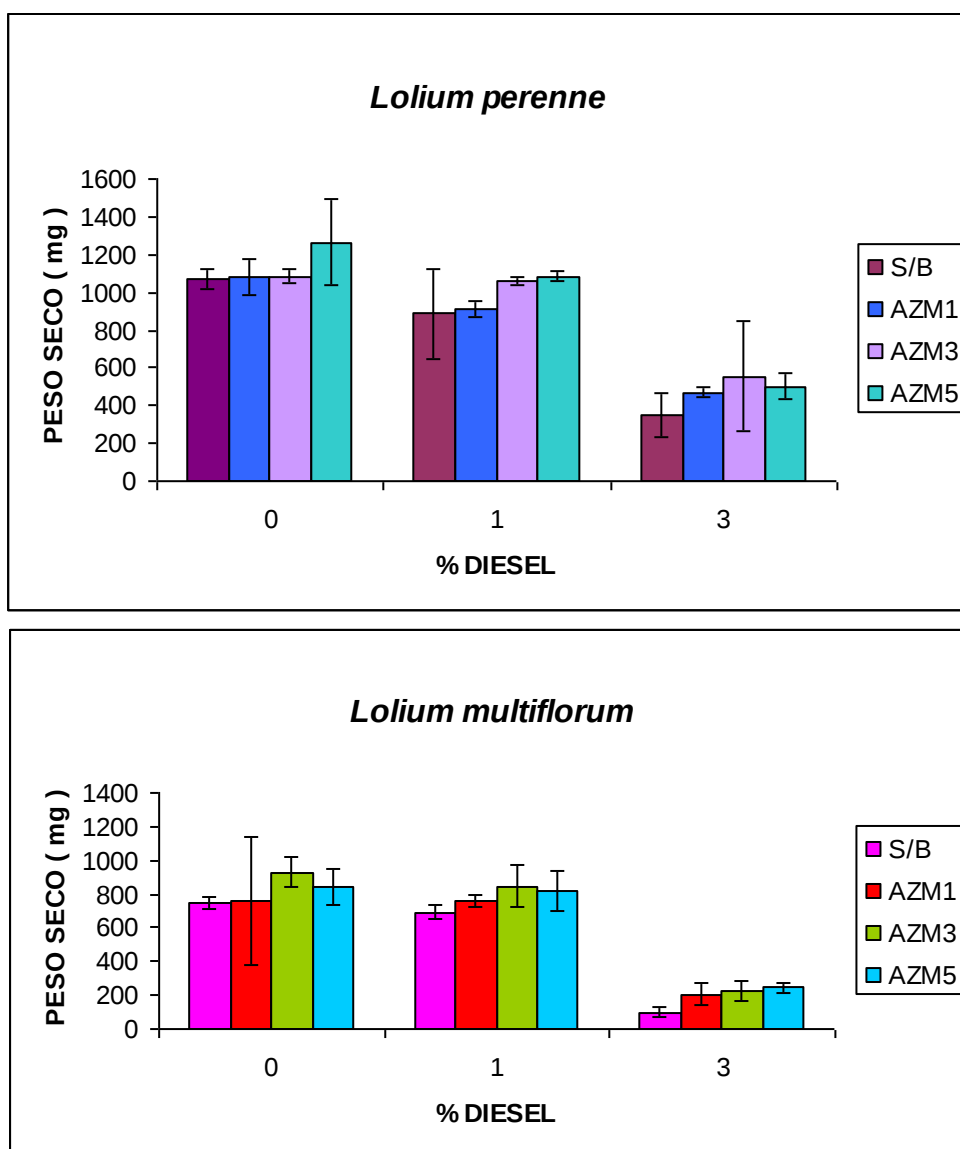
### 7.9 Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte aérea de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*



**Gráfica 8.** Efecto del diesel en el peso seco de la parte aérea.  
*Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*

Se observa que el peso seco de *L. perenne* se ve afectado por la presencia de diesel, la disminución en la concentración menor es de 17 % y en la concentración mayor es del 67 % con respecto al control, y en el peso seco de *L. multiflorum* hay una disminución de un 86% ,lo que implica que esta especie es más sensible al diesel que *L. perenne* De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 21 y 23 ) y la prueba de rango múltiple Duncan, (ver anexo 1 , cuadro 22 y 24) se confirma que la concentración del 3% afecta significativamente a estas especies de pasto. Estos resultados coinciden con lo que indica la bibliografía, que a pesar que son miembros de la misma familia de las gramíneas, y del mismo género se comportan de manera diferente (Glick, 2001, 2003).

7.10 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso seco de la parte aérea de *L.perenne* y *L.multiflorum*

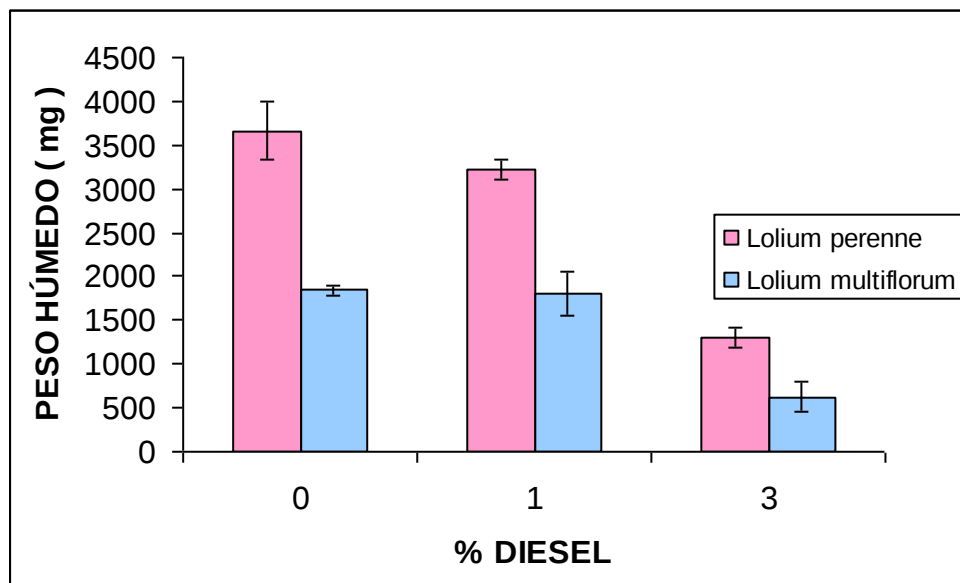


**Gráfica 9.** Efecto de la inoculación de las cepas de *A.lipoferum* en el peso seco de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

La gráfica 9 indica que el mayor efecto sobre esta variable es la concentración de diesel, con respecto al efecto de las cepas no son contundentes debido a la gran variabilidad que presentan los valores de las medias.

De acuerdo a las desviaciones estándar tan grandes que se observan en la gráfica ya no se les aplicó el análisis estadístico

7.11 Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de la parte radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

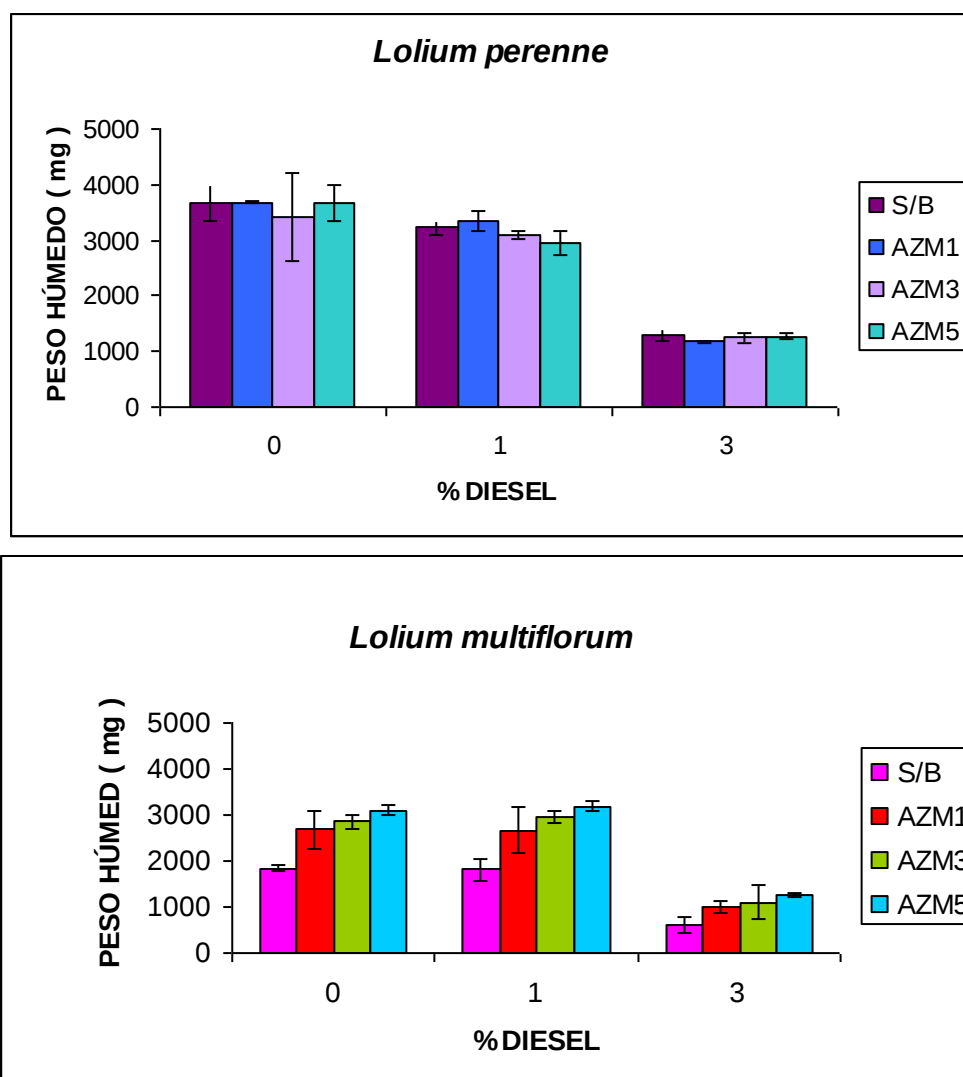


**Gráfica 10.** Efecto del diesel en el peso húmedo de la parte radical de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*

Se observa en la gráfica 10 que el peso húmedo de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum* disminuye conforme aumenta la concentración de diesel.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 25) se observa que existe diferencia significativa en el peso húmedo de *L. perenne*, al realizar la prueba de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 26) muestra que los tres tratamientos son diferentes estadísticamente. En el caso de *L. multiflorum* los resultados (ver anexo 1, cuadros 27 y 28) muestran que esta especie solo se ve afectada de manera significativa por la concentración 3%.

7.12 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*



**Gráfica 11.** Efecto de la inoculación de las cepas de *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

La gráfica 11 muestra que en *L. perenne* no hay efecto de la presencia de las cepas de *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical, esto expresa que no hay una interacción exitosa entre las cepas de *A. lipoferum* y *L. perenne* y el único efecto observado se debe al diesel, el cual en la concentración de 3% disminuyó la biomasa radical de las plantas en todos los tratamientos.

En el caso de *L. multiflorum* los resultados indican que las cepas de *A. lipoferum* tienen un efecto positivo en el desarrollo de la raíz aún en presencia del diesel, ya que al inocular con AZM1 se incrementó el peso, en la concentración menor de diesel, en un 47 %, con AZM3 el incremento es de 63% y con AZM5 es de 76 %; en la concentración mayor el incremento con la presencia de AZM1 es de 60%, con AZM3 es de 76% y con AZM5 101 % con respecto al control. Esta respuesta expresa que existe una buena interacción entre el genotipo de la planta y el de las tres cepas inoculadas, ya que como se observa en la gráfica, en ausencia de diesel, comparando con el control, el efecto de las tres cepas es evidente. El análisis estadístico de esta variable en *L. perenne* (ver anexo 1, cuadro 29) muestra que existen diferencias significativas entre los tratamientos, y la prueba de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 30) indica que la diferencia se debe solo a la presencia del diesel y no a la presencia de las cepas.

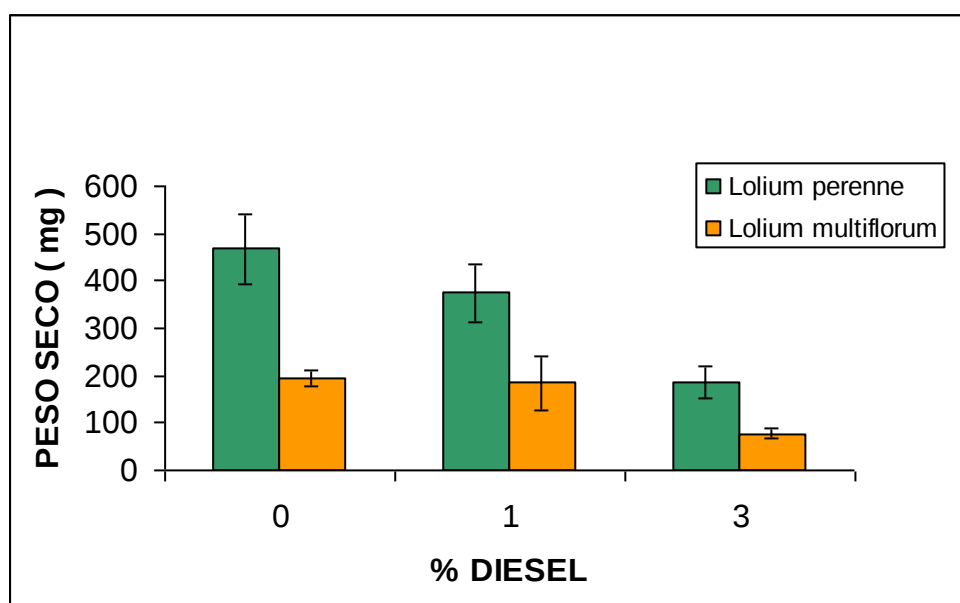
Para *L. multiflorum*, el análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 31) también muestra diferencias significativas entre los tratamientos; al realizar la separación de medias (ver anexo 1, cuadro 32) se observa que en la concentración 3% de diesel la cepa AZM5 tiene un efecto significativo.

En los controles y la concentración 1% se observa que las cepas AZM1, AZM3 y AZM5 tienen un efecto significativo.

Estos resultados coinciden con lo que indica Glick,1995, Glick et al , 1998 , que uno de los mecanismos utilizados por las RPCP que facilitan el crecimiento y desarrollo de plantas que están bajo condiciones de estrés como lo es la presencia del contaminante, es precisamente bajar los niveles de etileno mediante la acción de la enzima ACC desaminasa., la que al hidrolizar el ACC precursor inmediato del etileno, realiza una desaminación y produce  $\alpha$ -cetobutirato y amonio, acción que determina la disminución de la síntesis de etileno y por lo tanto disminuye el daño que produciría en la planta la presencia del contaminante. (Glick, 1995).

Las cepas utilizadas en este estudio fueron aisladas de plantas cultivadas en suelos contaminados con aguas residuales (Esquivel, 1997), por lo que están adaptadas a vivir en condiciones adversas y presentan un valor alto de actividad ACC –desaminasa (Camarillo, 2006 )

### 7.13 Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

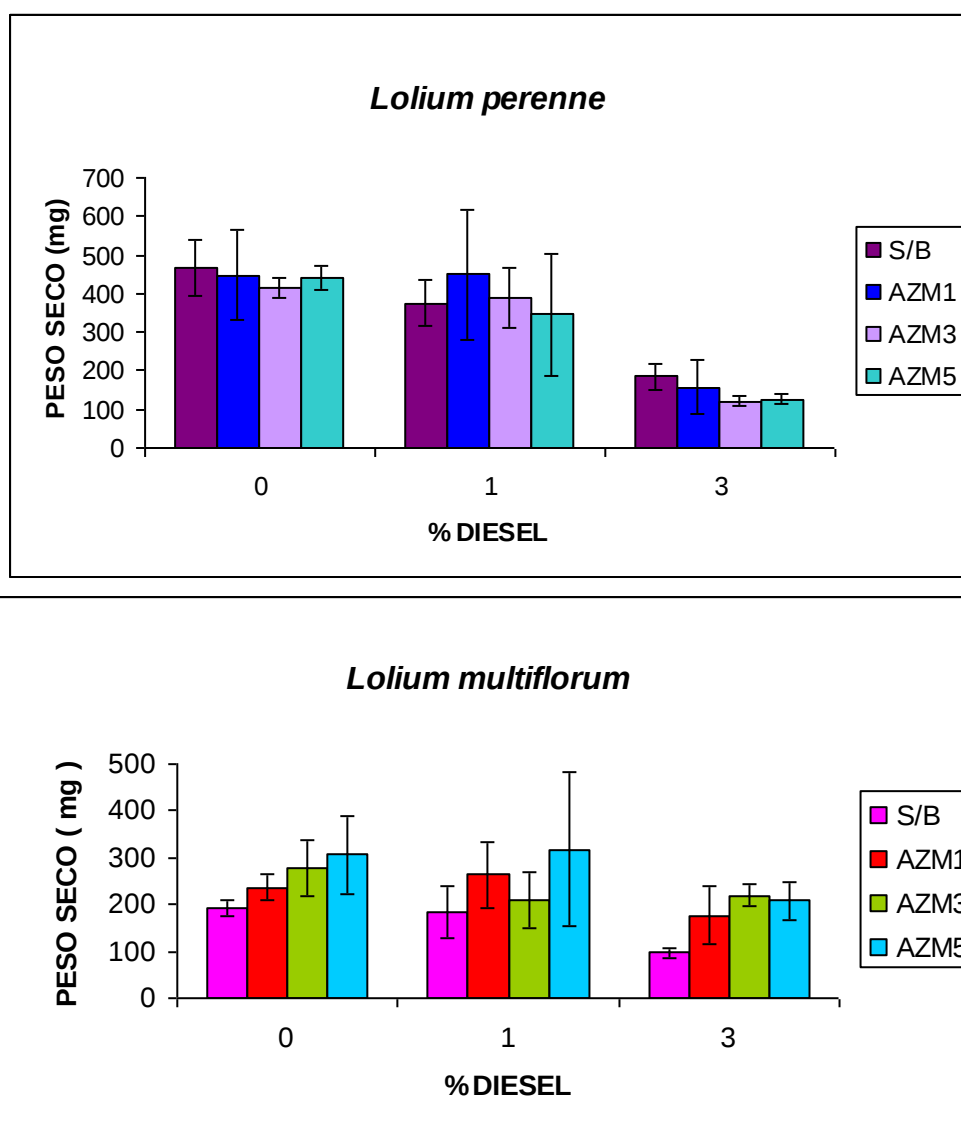


**Gráfica 12.** Efecto del diesel en el peso seco de la parte radical de *Lolium multiflorum* y *Lolium perenne*.

Se observa en la gráfica 12 que el peso seco de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum* disminuye conforme aumenta la concentración de diesel lo cual sugiere que el desarrollo de la raíz se ve afectada por la presencia del contaminante.

De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 33 y 35) se observa que existe diferencia significativa en el peso seco de *L. perenne* y *L. multiflorum*, al realizar la prueba de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 34 y 36) se observa que solo la concentración 3% afecta de manera significativa en ambas especies.

7.14 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso seco de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*



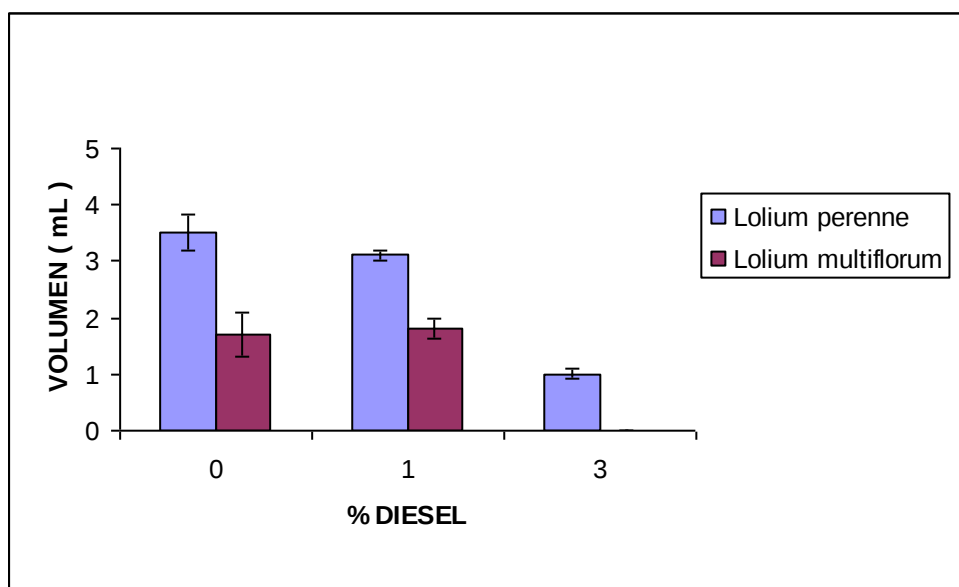
**Gráfica 13.** Efecto de la inoculación de las cepas de *A. lipoferum* en el peso seco de la parte radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

La gráfica 13 muestra que para *L. perenne* no hay efecto de la presencia de las cepas de *A. lipoferum* en el peso seco de la parte radical, esto indica que no hay una interacción exitosa entre las cepas de *A. lipoferum* y *L. perenne*. De acuerdo a los resultados del análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 37) a pesar de que presenta diferencia significativa en el peso seco de *L. perenne*, al realizar el análisis de rango

múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 38) se observa que la diferencia está dada por la presencia del diesel y no por la presencia de las cepas.

En los resultados para *L. multiflorum* se observa una tendencia positiva con la inoculación de las tres cepas, sin embargo las pruebas estadísticas indican que no hay diferencia significativa excepto en la concentración 3%, en la que la inoculación de las tres cepas presenta un incremento estadísticamente significativo. (ver anexo 1, cuadro 39 ), estos resultados coinciden con lo que indica Glick,1995, Glick et al , 1998 ,quienes indican que bajo condiciones de estrés, las plantas se ven beneficiadas por la presencia de RPCP con capacidad para sintetizar la enzima ACC desaminasa.

7.15 Efecto de la presencia de diesel en el volumen radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.



**Gráfica 14.** Efecto del diesel en el volumen radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*

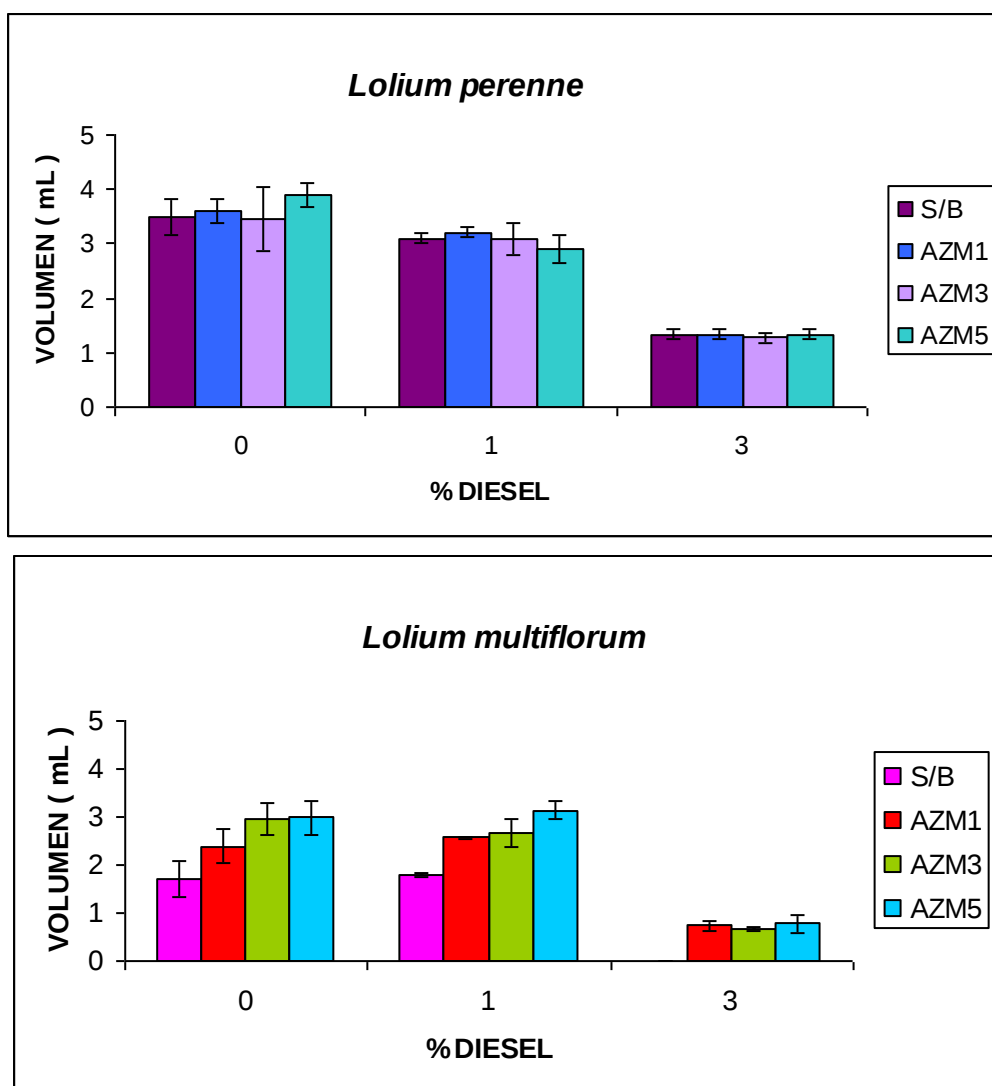
Se observa en la gráfica 14 que el volumen radical de *L. perenne* y *L. multiflorum* disminuye conforme aumenta la concentración de diesel;

para el caso de la primera especie, en la concentración mayor disminuye en un 61 % con respecto al control, lo cual nos indica que la presencia del diesel tiene un efecto adverso en el volumen radical de ésta. Así mismo, *L. multiflorum* se ve afectado al grado que en la concentración del 3% ya no es detectable el volumen.

El análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 41) muestra diferencia significativa en el volumen de la raíz de *L. perenne*, al realizar el análisis de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 42) se observa que los dos tratamientos de diesel son estadísticamente diferentes al control.

El análisis estadístico de los resultados con *L. multiflorum* (ver anexo 1, cuadros 43 y 44) indica que solo la concentración del 3% afecta de manera significativa.

7.16 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el volumen radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*.



**Gráfica 15.** Efecto de la inoculación de las cepas de *A. lipoferum* en el volumen radical de *Lolium perenne* y *Lolium multiflorum*.

La gráfica 15 muestra que para *L. perenne* no hay efecto de la presencia de las cepas de *A. lipoferum* en el volumen radical, esto nos indica que no hay una interacción exitosa entre las cepas de *A. lipoferum* y *L. perenne*. Por otra parte, se observa el efecto proporcional de la concentración del diesel sobre la disminución del volumen radical,

En *L. multiflorum* las cepas de *A. lipoferum* tienen un efecto positivo en el desarrollo de la raíz, aún en presencia del diesel, ya que en la concentración del 1%, al inocular con AZM1 se incrementó el volumen radical en 234%, con AZM3 el incremento es de 200% y con AZM5 es de 250 %.

En la concentración 3% se observa que aun cuando la planta se ve severamente afectada por el diesel (volumen prácticamente no detectable), la presencia de las bacterias disminuye parcialmente el efecto del contaminante sobre las raíces, debido probablemente, a que las cepas utilizadas en este ensayo tienen actividad ACC-desaminasa la cual puede estar interfiriendo en la síntesis de etileno, causante del estrés en las plantas (Glick, 1995).

Estos resultados nos muestran que las cepas de *Azospirillum* favorecen el desarrollo de la raíz en condiciones adversas y que este efecto es mucho más evidente con *L. multiflorum*

El análisis de varianza (ver anexo 1, cuadro 45) detecta diferencias significativas en el volumen de la raíz de *L. perenne*, y el análisis de rango múltiple Duncan (ver anexo 1, cuadro 46) indica que el volumen de la parte radical se ve afectada de manera significativa solo por la presencia del diesel.

El análisis estadístico de los resultados con *L. multiflorum* (ver anexo 1, cuadros 47 y 48) muestra diferencias significativas en el volumen de la raíz inducido por la inoculación con las diferentes cepas. En ausencia de

diesel y en la concentración de 1%, los mayores incrementos en esta variable se deben a las cepas AZm3 y AZm5, en tanto que en la concentración de 3% de diesel las tres cepas incrementan de manera significativa el volumen radical, comparadas con el control sin bacterias.

#### 7.17 Presencia de *Azospirillum* en la etapa final del experimento.

Se observó la presencia de *Azospirillum* en las raíces de las plantas al final del experimento. Sin embargo en el control no inoculado también se detectó la presencia de *Azospirillum* que era parte de la microbiota nativa del sustrato utilizado, no obstante, se considera que este no es muy competitivo ya que en los controles de *L. multiflorum* que no fueron inoculados no se observa efecto en las variables medidas.

## 8 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### CONCLUSIONES:

- ✓ La concentración mayor de diesel afecta significativamente en todas las variables medidas en ambas especies de pasto, pero es más marcado en *L. multiflorum*.
- ✓ La inoculación de las cepas de *Azospirillum* en *L. perenne* no promueve efecto significativo en las variables evaluadas, en tanto que en *L. multiflorum* se observa incremento en las variables longitud de la parte aérea, peso seco y húmedo de la parte radical y en el volumen de la raíz, lo que indica que se establece una buena interacción entre las cepas y esta última especie de pasto.
- ✓ *L. multiflorum* es más sensible al diesel y en este se expresa mejor la interacción con las cepas de *Azospirillum* que poseen actividad ACC-desaminasa, ya que en presencia de éstas se detectan incrementos en todas las variables medidas en la condición de mayor estrés (3% de diesel), sin embargo la planta no acumula la biomasa requerida para estimular las actividades bioquímicas involucradas en la fitorremediación.
- ✓ *L. perenne* produce mayor biomasa que *L. multiflorum*, pero no responde a la inoculación con ninguna de las cepas de *Azospirillum* ensayadas.

## RECOMENDACIONES

1. Realizar bioensayos con *L. perenne* (variedad Rye grass tetraploide) y otras cepas con actividad ACC-desaminasa, para seleccionar la que interactúe mejor con esta especie de pasto.
2. Realizar experimentos con otras plantas que la bibliografía indica que son resistentes a la presencia de hidrocarburos (Por ejemplo: Pasto alemán *Echinochloa polystachya* y alfalfa *Medicago sativa* ) e inocularlas con las cepas utilizadas en este bioensayo para estudiar el tipo de interacción que pueden establecer.

## 9 BIBLIOGRAFÍA

- ✓ Adam, G y Duncan, HJ. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*. 21: 353-357.
- ✓ Adam, G y Duncan, HJ. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution* 120:363-370.
- ✓ Al-Ghazawi, Ziad; Saadouni, Ismail y Al-Shak`ah, Abdalia. 2005. Selection of bacteria and plant seeds for potential use in the remediation of diesel contaminated soils. *J. Basic Microbiol.* 4: 251-256.
- ✓ Ajithkumar, P.V; Gangadhara, K.P; Manilal, P y Kunhi, A.A.M. 1998. Soil inoculation with *Pseudomonas aeruginosa* 3mT eliminates the inhibitory effect of 3-chloro-and 4-chlorobenzoate on tomato seed germination. *Soil Biol.Chem.* 30,1053-1059.
- ✓ Alexander, M. 1999. Biodegradation and bioremediation. Academic Press Inc, San Diego, USA.
- ✓ Atlas, R.M y Bartha, R. 1993. *Microbial Ecology: Fundamental and application*. Benjamin/Cummings, Redwood City, CA. pp 69-74, 334-335.
- ✓ BBSRC, 2003. <http://www.plant-hormone.info>.
- ✓ Barea, J.M. y Brown M.E. 1974. Effect on plant growth produced by *Azotobacter paspali* related to synthesis of plant. *J. Appl. Bacteriol.* 40:583-593.
- ✓ Bartel, B. 1997. Auxin biosynthesis. *Annu. Rev. Plant Physiol, Plant Mol. Biol.* 48:49-64.
- ✓ Bashan, Y y Carrillo, A. 1996. Inoculantes microbianos para la agricultura sostenible. En: Pérez -Moreno J. y Ferrera-Cerrato R. *Nuevos Horizontes en Agricultura: Agroecología y Desarrollo Sostenible*. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México. pp 125-155.

- ✓ Basham, Y y de Bashan, L. E. 2005. Plant growth –promoting. Emcyclopedia of soils in the environment. 1:103-115.
- ✓ Basham, Y; Puente, M.E; y de Bashan L. E y Hernandez, J.P. 2008. Enviromental uses of plant growth-promoting bacteria. Plant-Microbe Interactions: 69-93 ISBN: 978-81-308-0212-1.
- ✓ Binet, P; Portal, J.M. y Leyva, C. 2000. Dissipation of 3-6-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in the rhizosphere of ryegrass. Soil Biology & Biochemistry 32:2011-2017.
- ✓ Brown, M.R. 1976. Role of *Azotobacter paspali* in asociation with *Paspalum notatum*. J.Appl. Bacterial.40:341-348.
- ✓ Burd, G.I; Dixon, D y Glick, B.G. 1998. Plant Growth promoting bacteria that decrease heavy metal toxicity in plants. Applied Environ.Microbial.64,3663-3669.
- ✓ Camarillo, A. 2006. Determinación de la actividad de la ACC deaminasa en cepas de *Azospirillum*. Tesis de licenciatura. Facultad de Química .UNAM.
- ✓ Diaz, V.P; Ferrera-Cerrato, R; Almaraz, S y Alcántar, G.G. 2001. Inoculación de bacterias promotoras de crecimiento en lechuga. Terra. 19:327-325.
- ✓ Döbereiner, J y Day, J.M. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In prodeedings of the first International Symppsium on Nitrogen Fixation. 2: 518-538.
- ✓ El-Khawas, H.M. 1995. Indoleacetinc acid production by natural soil micro-residentes, Egyph J.Appl.Sci-10:575-582.
- ✓ El-Khawas, H y Adachi, K. 1999. Identifcation and quantification of auxins in cultura media of *Azospirillum* and *Klebsiella* and their effect on rice roots. Biol Fertil Soils 28:377-381.
- ✓ Esquivel-Cote, R. 1997. Selección e identificación de rizobacterias promotoras de desarrollo vegetal aisladas de cultivos regados con agues residuals y su efecto sobre el desarrollo del jitomate

(*Lycopersicon esculentum*).Tesis de maestria en ciencias (Edafología) Facultad de Ciencias .UNAM-.

- ✓ Etsuko, K; Tsukasa, M y Masaiko, T. 2007. Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil.Plant Prod.Sci 10(2):211-218.
- ✓ Garcia de Salamone, Hynes, R.K. y Nelson, L.M. 2001. Cytokinin production by plant growth promoting rhizobacteria and selected mutants. Can.J. Microbiol.47:404-411.
- ✓ Glick, B.R. 1995.The enhancemet of plant growth by free-living bacteria. Can J Microbiol.41:109-107.
- ✓ Glick B.R; Penrose, D.M. y Li, J. 1998. A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth –promoting bacteria. J.Theor Biol. 190:63-8.
- ✓ Glick, B.R; Holguin, G. 1998. The use of plant growth promoting rhizobacteria to improve productivity.In:Connor,TH(Ed.),Biotechnology International II.University Medical Press,San Francisco,pp246-249.
- ✓ Glick, B.R.; Penrose, D.M. y Wenbo, M. 2001.Meeting report.Bacterialpromotions of plant growth.Biotechnology Advances.19.19:135-138.
- ✓ Glick, B.R. 2003. Phytoremedation: synergistic use of plantas and bacteria to clean up the enviroment. Enviromental Pollution 145 68-74
- ✓ Glick, B.R. 2005.Modulation of plant ethylene levels by the bacterial enzyme ACC deaminase. FEMS Microbiol. Lett. 251:1-7.
- ✓ Greenberg,B;Huang,X;Gerhardt,K;Glick,B;Gurska,J;Wang,W;Lampi, M;Khalid,M;Isherwood,D;Chang,P;Wang,H;Wu,Shanm;Ming,Yu,Dixon,G;Gerwing;P.2007.Field and laboratory tests of multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils. Proceedings of the Ninth International In Situ and On-Site Remediation Symposium. 2007. Batelle Press.

- ✓ Huang, X; El-Alawi, Y; Penrose, D.M; Glick, B.R; Greenberg, B.M. 2004. A multi- process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils, *Environmental Pollution* 130:465-476.
- ✓ Huang, X., ElAlawi, Y; Gurska, J, Glick, B.R; Greenberg, B.M. 2005. A multi -process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPH`s) from soils.. *Microchemical Journal*. 81:139-147.
- ✓ Jiménez, D.R; Virgen, C.G; Tabares, F. S. y Olalde, P.V. 2001. Bacterias promotoras del crecimiento de plantas agro-biotecnología. *Avance y Perspectiva*, 20:395-400.
- ✓ Kechavararzi, C. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (L, perenne) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution* 145:68-74.
- ✓ Kloepper, J.W; Schroth, M.N. 1978. Plant growth -promotin rhizobacteria on radishes. *Proceedings of the fourth international conference on plant pathogen. Bacteria*, Vol 2 INR:879-882.
- ✓ Lambrecht, M; Okon, Y; Vande Broek, A; Vanderleyden, J. 2000. Indol-3-acetic acid a reciprocal signalling molecule in bacteria-plant interactions. *Trends in Microbiology*. 8:298-300.
- ✓ Lorence, Q.A. 1999. Agro-biologicos. Cuaderno de Vigilancia Biotecnológica No.5. Ed. Cambiotec. Dirección de Investigación y Posgrado Universidad Autónoma de Chihuahua, México pp 3-21.
- ✓ Madigan, M.T; Martinko, J.J; Dunlap, P.V. y Clark, D.P. 2009. Brock. *Biología de los microorganismos*. Madrid. Pearson Educación, S. A
- ✓ Murotova, A.Y; Turkovskaya, O.V; Antonyuk, L.P; Makarov, O.E; Pozdnyakova, L.I, Ignatov, V.V. 2005. Oil-oxidizing potencial of associative rhizobacteria of the fenus *Azospirillum*. *Microbiology*. 132:146-153.
- ✓ NCBI (National Center for Biotechnology Information). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy/Browser/wwwtax.cgi>

- ✓ Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000 que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis.
- ✓ Okon, Y; Albrecht, S.L; Burris, R.H. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*. J.Bacterio. 127:1248-1254.
- ✓ Okon, Y; Kapulnik. 1986. Development and function of *Azospirillum*-inoculated roots. Plant Soil. 90:3-16
- ✓ Paul, E; F, Clark. 1996. Soil microbiology and biochemistry Academic Press, San Diego, p 69-74.
- ✓ Palmroth, M. 2002. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. Bioresource Technology. 84:221-228.
- ✓ Patten, C.L; Glick, B.R. 1996. Bacterial biosynthesis of indole-3 acetic acid. Can.J.Microbio. 42:207-220.
- ✓ Postgate, J. 1981. Fijación de nitrógeno. Ed. Omega. Barcelona. España. pp.83.
- ✓ Proyecto del programa nacional de remediación de sitios contaminados. 2008. Secretaria de Medio ambiente y Recursos naturales. Dirección general de gestión integral de Materiales y actividades riesgosas.
- ✓ Radamacher, W. 1994. Gibberellin formation in microorganisms. Plant growth regulation. 15:303-314.
- ✓ Ramírez -Gama R.M. y Luna -Millan B. 1995. Simbiosis asociativas. En: Ferrera-Cerra R. y J. Pérez Moreno ( eds) Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable. Colegio de Posgraduados en Ciencias Agrícolas, Montecillo, México pp.143-165.
- ✓ Rock, S. 1997. Phytoremediation In: Freeman, H (Ed), Standard, Handbook of Hazardous Waste Treatment and disposal, second ed. Mac Graw Hill Inc; New York, USA; pp 93-112.
- ✓ Rojas, M.G. y Ramírez, H. 1993. Control hormonal del desarrollo de las plantas Fisiología Tecnología Experimentación 2da. Edición. Limusa. Noriega editores. México.

- ✓ SEMARNAT .2002. Dirección General de Manejo Integral de contaminantes, Página web, <http://www.semarnat.gob.mx>.
- ✓ Siciliano, S.D; Germida, J.J. 1997.Bacteria inoculants of forage grasses enhance degradation of 2-chlorobenzoic acid in soil. *Environ.Toxicol.Chem.*16, 1098-1104.
- ✓ Steenhoudt, D. y Vanderleyden, J. 2000. *Azospirillum* a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24:487-506
- ✓ Suthersan, S.S. 2002.Natural and enhanced remediation systems. Boca Raton: CRC Press; pp. 239– 67.
- ✓ Tal, S. y Okon, Y.1985. Production of the reserve material Poly-β-hydroxybutyrate and its function in *Azospirillum brasilense*. *Cd. Can. J.Microbiol. Releases.* 31:608-613.
- ✓ Tarrand, J.J;Krieg, R. y Döbereiner, J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with description of a new genus. *Azospirillum* gen.nov.and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb.nov. and *Azospirillum brasilense* sp nov. *Can. J.Microbiol.*24:967-98.
- ✓ Tien, M; Gaskins, H. y Hubell, H. 1979.Plant growth . Substances produced by *Azospirillum brasilense* and their effect on the growth of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L). *Appl. Environ.Microbiol.*37:1016-1024.
- ✓ Torres-Rubio, M.G; Valencia-Plata, S.A; Bernal-Castollo, J. y Martínez -Nieto, P(2000. Isolation of *Enterobacteria*, *Azotobacter* sp, and *Pseudomonas* sp; Producers of Indole-3-Acetic Acid and Siderophores , from Colombian Rice Rhizosphere . *Revista Latinoamericana de Microbiología* 42:171-176.
- ✓ USA, EPA. 2000. *Introduction to Phytoremediation*.EPA/600/R-99/107.Washington DC, February.

- ✓ Vande Broek, A. 1999. Auxins upregulate expression of the indole-3-pyruvate decarboxylase gene in *Azospirillum brasilense*. *J. Bacteriol.* 181:1338-1342.
- ✓ Wang, X; Yu, X. y Bartha, R. 1990. Effect of bioremediation on PAH residues in soil, *Environmental Science and Technology* **24**: 1086–1089.
- ✓ Zhuang, Xuliang; Chen, Jian; Shim, Hojae y Bai, Zhihui.2007.New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Enviromental International*.33:406-413.

## 10 ANEXO 1

### 1. Efecto del diesel en la Germinación de la semilla de *L. perenne* y *L. multiflorum*

#### 1.1 Efecto del diesel en la Germinación de la semilla de *L. perenne*.

Cuadro1. ANOVA efecto del diesel en la Germinación de la semilla de *L. perenne*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 2193,056          | 2   | 1096,528       | 50,638 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 714,583           | 33  | 21,654         |        |      |
| Total                      | 2907,639          | 35  |                |        |      |

Cuadro 2. Prueba de rango múltiple Duncan

Duncan<sup>a</sup>

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |         |
|---------------|----|-------------------------|---------|
|               |    | 1                       | 2       |
| 3%            | 12 | 75,83<br>33             |         |
| 0%            | 12 |                         | 91,2500 |
| 1%            | 12 |                         | 93,3333 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,281    |

## 1.2 Efecto del diesel en la Germinación de la semilla de *L. multiflorum*.

Cuadro3 ANOVA efecto del diesel en la Germinación de la semilla de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 2251,389          | 2   | 1125,694       | 17,447 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 2129,167          | 33  | 64,520         |        |      |
| Total                      | 4380,556          | 35  |                |        |      |

Cuadro 4 Prueba de rango múltiple Duncan

| Duncan        |    |                         |         |
|---------------|----|-------------------------|---------|
| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |         |
|               |    | 1                       | 2       |
| 3%            | 12 | 70,4167                 |         |
| 1%            | 12 |                         | 85,0000 |
| 0%            | 12 |                         | 88,7500 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,261    |

2 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la germinación de las semillas de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 5 ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en la germinación de las semillas de *L. perenne*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F     | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|-------|------|
| Entre tratamientos         | 2290,972          | 11  | 208,270        | 8,106 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 616,667           | 24  | 25,694         |       |      |
| Total                      | 2907,639          | 35  |                |       |      |

Cuadro 6 Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA -CONCENTRACION   | N | Subset for alpha = 0.05 |         |
|-----------------------|---|-------------------------|---------|
|                       |   | 1                       | 2       |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 75,0000                 |         |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 75,0000                 |         |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | 75,0000                 |         |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | 78,3333                 |         |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         | 90,0000 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         | 90,0000 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         | 91,6667 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         | 91,6667 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         | 91,6667 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         | 93,3333 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | 93,3333 |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         | 96,6667 |
| Sig.                  |   | ,470                    | ,175    |

Cuadro 7. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en la germinación de las semillas de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 1980,556          | 11  | 180,051        | 17,758 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 243,333           | 24  | 10,139         |        |      |
| Total                      | 2223,889          | 35  |                |        |      |

Cuadro 8 Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |
|-----------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|
|                       |   | 1                       | 2       | 3       | 4       |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 19,6667                 |         |         |         |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 24,6667                 | 24,6667 |         |         |
| AZM5 Concentración 3% | 3 |                         | 30,0000 | 30,0000 |         |
| AZM3 Concentración 3% | 3 |                         |         | 31,3333 |         |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         |         |         | 38,0000 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 38,6667 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 39,3333 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 40,6667 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 40,6667 |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |         |         | 41,3333 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 43,0000 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 44,0000 |
| Sig.                  |   | ,066                    | ,051    | ,613    | ,056    |

3 Efecto de la presencia de diesel en la longitud de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 9. ANOVA efecto del diesel en la longitud de la parte aérea de *L. perenne*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 302,167           | 2   | 151,083        | 14,458 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 344,833           | 33  | 10,449         |        |      |
| Total                      | 647,000           | 35  |                |        |      |

Cuadro 10 Prueba de rango múltiple Duncan

Duncan<sup>a</sup>

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |         |
|---------------|----|-------------------------|---------|
|               |    | 1                       | 2       |
| 3%            | 12 | 35,0833                 |         |
| 1%            | 12 |                         | 40,9167 |
| 0%            | 12 |                         | 41,5000 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,661    |

Cuadro11. ANOVA efecto del diesel en la longitud de la parte aérea de *L. multiflorum*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 1691,056          | 2   | 845,528        | 52,366 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 532,833           | 33  | 16,146         |        |      |
| Total                      | 2223,889          | 35  |                |        |      |

Cuadro 12 Prueba de rango múltiple Duncan

Duncan<sup>a</sup>

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |         |
|---------------|----|-------------------------|---------|
|               |    | 1                       | 2       |
| 3%            | 12 | 26,4167                 |         |
| 1%            | 12 |                         | 39,1667 |
| 0%            | 12 |                         | 42,2500 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,069    |

4. Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 13. ANOVA efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea de *L. perenne*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F     | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|-------|------|
| Entre tratamientos         | 343,000           | 11  | 31,182         | 2,462 | ,032 |
| Dentro de los tratamientos | 304,000           | 24  | 12,667         |       |      |
| Total                      | 647,000           | 35  |                |       |      |

Cuadro 14 Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |
|-----------------------|---|-------------------------|---------|---------|
|                       |   | 1                       | 2       | 3       |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 32,6667                 |         |         |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 35,0000                 | 35,0000 |         |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | 36,3333                 | 36,3333 | 36,3333 |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | 36,3333                 | 36,3333 | 36,3333 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         | 40,3333 | 40,3333 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         | 40,3333 | 40,3333 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | 40,6667 | 40,6667 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         | 41,0000 | 41,0000 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         | 41,0000 | 41,0000 |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         | 41,3333 | 41,3333 |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         |         | 42,3333 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |         | 42,6667 |
| Sig.                  |   | ,260                    | ,072    | ,073    |

Cuadro 15. ANOVA efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en la longitud de la parte aérea de *L. multiflorum*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 1980,556          | 11  | 180,051        | 17,758 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 243,333           | 24  | 10,139         |        |      |
| Total                      | 2223,889          | 35  |                |        |      |

Cuadro 16 Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPACONCENTRACION     | N | Subset for alpha = 0.05 |         |         |         |
|-----------------------|---|-------------------------|---------|---------|---------|
|                       |   | 1                       | 2       | 3       | 4       |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 19,6667                 |         |         |         |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 24,6667                 | 24,6667 |         |         |
| AZM5 Concentración 3% | 3 |                         | 30,0000 | 30,0000 |         |
| AZM3 Concentración 3% | 3 |                         |         | 31,3333 |         |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         |         |         | 38,0000 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 38,6667 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 39,3333 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 40,6667 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         |         |         | 40,6667 |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |         |         | 41,3333 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 43,0000 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         |         |         | 44,0000 |
| Sig.                  |   | ,066                    | ,051    | ,613    | ,056    |

5. Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 17. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso húmedo de *L. perenne*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 218,150           | 2   | 109,075        | 44,847 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 75,398            | 31  | 2,432          |        |      |
| Total                      | 293,548           | 33  |                |        |      |

Cuadro 18 Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|--------|
|               |    | 1                       | 2      | 3      |
| 3%            | 10 | 3,0420                  |        |        |
| 1%            | 12 |                         | 7,1208 |        |
| 0%            | 12 |                         |        | 9,3175 |
| Sig.          |    | 1,000                   | 1,000  | 1,000  |

Cuadro 19. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso húmedo de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F       | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|------|
| Entre tratamientos         | 207,049           | 2   | 103,524        | 104,247 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 32,771            | 33  | ,993           |         |      |
| Total                      | 239,820           | 35  |                |         |      |

Cuadro 20 Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|
|               |    | 1                       | 2      |
| 3%            | 12 | 1,0783                  |        |
| 0%            | 12 |                         | 5,8683 |
| 1%            | 12 |                         | 6,4183 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,186   |

6. Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte aérea de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 21. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso seco de *L. perenne*

|                            | Suma de cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 2,952             | 2   | 1,476          | 68,083 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | ,715              | 33  | ,022           |        |      |
| Total                      | 3,668             | 35  |                |        |      |

Cuadro 22. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|--------|
|               |    | 1                       | 2      | 3      |
| 3%            | 12 | ,4683                   |        |        |
| 1%            | 12 |                         | 1,0008 |        |
| 0%            | 12 |                         |        | 1,1300 |
| Sig.          |    | 1,000                   | 1,000  | 1,000  |

Cuadro 23. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso seco de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F       | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|------|
| Entre tratamientos         | 2,942             | 2   | 1,471          | 157,833 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | ,308              | 33  | ,009           |         |      |
| Total                      | 3,250             | 35  |                |         |      |

Cuadro 24. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |       |
|---------------|----|-------------------------|-------|
|               |    | 1                       | 2     |
| 3%            | 12 | ,1942                   |       |
| 1%            | 12 |                         | ,7792 |
| 0%            | 12 |                         | ,8200 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,308  |

7. Efecto de la presencia de diesel en el peso húmedo de la parte radical *L. perenne* y *L. multiflorum*

Cuadro 25. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso húmedo de la raíz de *L. perenne*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F       | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|---------|------|
| Entre tratamientos         | 37,849            | 2   | 18,925         | 268,878 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 2,323             | 33  | ,070           |         |      |
| Total                      | 40,172            | 35  |                |         |      |

Cuadro 26. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|--------|
|               |    | 1                       | 2      | 3      |
| 3%            | 12 | 1,2467                  |        |        |
| 1%            | 12 |                         | 3,1550 |        |
| 0%            | 12 |                         |        | 3,6150 |
| Sig.          |    | 1,000                   | 1,000  | 1,000  |

Cuadro 27. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso húmedo de la raíz de *L. multiflorum*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 21,470            | 2   | 10,735         | 38,914 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 9,103             | 33  | ,276           |        |      |
| Total                      | 30,573            | 35  |                |        |      |

Cuadro 28. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|
|               |    | 1                       | 2      |
| 3%            | 12 | ,9992                   |        |
| 0%            | 12 |                         | 2,6192 |
| 1%            | 12 |                         | 2,6550 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,868   |

8 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 29. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical de *L. perenne*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 38,302            | 11  | 3,482          | 44,700 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 1,870             | 24  | ,078           |        |      |
| Total                      | 40,172            | 35  |                |        |      |

Cuadro 30. Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPACONCENTRACION     | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|-----------------------|---|-------------------------|--------|--------|
|                       |   | 1                       | 2      | 3      |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 1,1733                  |        |        |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | 1,2433                  |        |        |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | 1,2733                  |        |        |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 1,2967                  |        |        |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         | 2,9433 |        |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         | 3,1067 |        |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         | 3,2233 | 3,2233 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | 3,3467 | 3,3467 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         | 3,4167 | 3,4167 |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |        | 3,6567 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |        | 3,6767 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |        | 3,7100 |
| Sig.                  |   | ,627                    | ,073   | ,070   |

Cuadro 31. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en el peso húmedo de la parte radical de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 28,095            | 11  | 2,554          | 24,730 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 2,479             | 24  | ,103           |        |      |
| Total                      | 30,573            | 35  |                |        |      |

Cuadro 32. Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |        |
|-----------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|
|                       |   | 1                       | 2      | 3      | 4      |
| S/B Concentración 3%  | 3 | ,6267                   |        |        |        |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 1,0000                  | 1,0000 |        |        |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | 1,1067                  | 1,1067 |        |        |
| AZM5 Concentración 3% | 3 |                         | 1,2633 |        |        |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         |        | 1,8100 |        |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |        | 1,8433 |        |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         |        |        | 2,6600 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |        |        | 2,6800 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         |        |        | 2,8500 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         |        |        | 2,9567 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |        |        | 3,1033 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         |        |        | 3,1933 |
| Sig.                  |   | ,095                    | ,353   | ,900   | ,084   |

9. Efecto de la presencia de diesel en el peso seco de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*

Cuadro 33. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso seco de la raíz de *L. perenne*

|                               | Suma de<br>cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|-------------------------------|----------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos            | ,570                 | 2   | ,285           | 45,147 | ,000 |
| Dentro de los<br>tratamientos | ,208                 | 33  | ,006           |        |      |
| Total                         | ,779                 | 35  |                |        |      |

Cuadro 34. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCE<br>NTRAC<br>ION | N  | Subset for alpha = 0.05 |       |
|-----------------------|----|-------------------------|-------|
|                       |    | 1                       | 2     |
| 3%                    | 12 | ,1492                   |       |
| 1%                    | 12 |                         | ,3908 |
| 0%                    | 12 |                         | ,4358 |
| Sig.                  |    | 1,000                   | ,175  |

Cuadro 35. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el peso seco de la raíz de *L. multiflorum*.

|                               | Suma de<br>cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F     | Sig. |
|-------------------------------|----------------------|-----|----------------|-------|------|
| Entre tratamientos            | ,043                 | 2   | ,022           | 3,676 | ,036 |
| Dentro de los<br>tratamientos | ,194                 | 33  | ,006           |       |      |
| Total                         | ,237                 | 35  |                |       |      |

Cuadro 36. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |       |
|---------------|----|-------------------------|-------|
|               |    | 1                       | 2     |
| 3%            | 12 | ,1767                   |       |
| 1%            | 12 |                         | ,2442 |
| 0%            | 12 |                         | ,2550 |
| Sig.          |    | 1,000                   | ,732  |

Cuadro 37. ANOVA efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el peso seco de la parte radical de *L. perenne*

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F     | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|-------|------|
| Entre tratamientos         | ,599              | 11  | ,054           | 7,270 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | ,180              | 24  | ,007           |       |      |
| Total                      | ,779              | 35  |                |       |      |

Cuadro 38. Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |       |
|-----------------------|---|-------------------------|-------|
|                       |   | 1                       | 2     |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | ,1233                   |       |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | ,1267                   |       |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | ,1600                   |       |
| S/B Concentración 3%  | 3 | ,1867                   |       |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         | ,3500 |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         | ,3767 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         | ,3867 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         | ,4133 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         | ,4233 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         | ,4433 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | ,4500 |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         | ,4633 |
| Sig.                  |   | ,422                    | ,177  |

Cuadro 39. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en el peso seco de la parte radical de *L. multiflorum*

|                               | Suma de<br>cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F     | Sig. |
|-------------------------------|----------------------|-----|----------------|-------|------|
| Entre tratamientos            | ,125                 | 11  | ,011           | 2,411 | ,035 |
| Dentro de los<br>tratamientos | ,113                 | 24  | ,005           |       |      |
| Total                         | ,237                 | 35  |                |       |      |

Cuadro 40 Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |       |       |
|-----------------------|---|-------------------------|-------|-------|
|                       |   | 1                       | 2     | 3     |
| S/B Concentración 3%  | 3 | ,1000                   |       |       |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | ,1800                   | ,1800 |       |
| S/B Concentración 1%  | 3 | ,1833                   | ,1833 |       |
| S/B Concentración 0%  | 3 | ,1933                   | ,1933 | ,1933 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 | ,2100                   | ,2100 | ,2100 |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | ,2100                   | ,2100 | ,2100 |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | ,2167                   | ,2167 | ,2167 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         | ,2400 | ,2400 |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | ,2633 | ,2633 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         | ,2767 | ,2767 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         | ,3100 | ,3100 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         |       | ,3200 |
| Sig.                  |   | ,080                    | ,057  | ,062  |

10. Efecto de la presencia de diesel en el volumen de la parte radical *L. perenne* y *L. multiflorum*

Cuadro 41. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el volumen de la raíz de *L. perenne*

|                               | Suma de<br>cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F       | Sig. |
|-------------------------------|----------------------|-----|----------------|---------|------|
| Entre tratamientos            | 50,889               | 2   | 25,444         | 503,800 | ,000 |
| Dentro de los<br>tratamientos | 1,667                | 33  | ,051           |         |      |
| Total                         | 52,556               | 35  |                |         |      |

Cuadro 42 Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|--------|
|               |    | 1                       | 2      | 3      |
| 3%            | 12 | 1,0000                  |        |        |
| 1%            | 12 |                         | 3,0000 |        |
| 0%            | 12 |                         |        | 3,8333 |
| Sig.          |    | 1,000                   | 1,000  | 1,000  |

Cuadro 43. ANOVA efecto de la presencia del diesel en el volumen de la raíz de *L. multiflorum*

|                            | Suma de cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 26,889            | 2   | 13,444         | 44,000 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 10,083            | 33  | ,306           |        |      |
| Total                      | 36,972            | 35  |                |        |      |

Cuadro 44. Prueba de rango múltiple Duncan

| CONCENTRACION | N  | Subset for alpha = 0.05 |        |
|---------------|----|-------------------------|--------|
|               |    | 1                       | 2      |
| 3%            | 12 | ,7500                   |        |
| 0%            | 12 |                         | 2,5833 |
| 1%            | 12 |                         | 2,5833 |
| Sig.          |    | 1,000                   | 1,000  |

11 Efecto de la inoculación de *A. lipoferum* en el volumen de la parte radical de *L. perenne* y *L. multiflorum*.

Cuadro 45. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en el volumen de la parte radical de *L. perenne*

|                            | Suma de cuadrados | G.I | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 51,222            | 11  | 4,657          | 83,818 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 1,333             | 24  | ,056           |        |      |
| Total                      | 52,556            | 35  |                |        |      |

Cuadro 46. Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |
|-----------------------|---|-------------------------|--------|--------|
|                       |   | 1                       | 2      | 3      |
| S/B Concentración 3%  | 3 | 1,0000                  |        |        |
| AZM1 Concentración 3% | 3 | 1,0000                  |        |        |
| AZM3 Concentración 3% | 3 | 1,0000                  |        |        |
| AZM5 Concentración 3% | 3 | 1,0000                  |        |        |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         | 3,0000 |        |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         | 3,0000 |        |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         | 3,0000 |        |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         | 3,0000 |        |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |        | 3,6667 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         |        | 3,6667 |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |        | 4,0000 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |        | 4,0000 |
| Sig.                  |   | 1,000                   | 1,000  | ,125   |

Cuadro 47. ANOVA efecto de la inoculación *A. lipoferum* en el volumen de la parte radical de *L. multiflorum*.

|                            | Suma de cuadrados | G.l | Cuadrado Medio | F      | Sig. |
|----------------------------|-------------------|-----|----------------|--------|------|
| Entre tratamientos         | 34,972            | 11  | 3,179          | 38,152 | ,000 |
| Dentro de los tratamientos | 2,000             | 24  | ,083           |        |      |
| Total                      | 36,972            | 35  |                |        |      |

Cuadro 48. Prueba de rango múltiple Duncan

| CEPA CONCENTRACION    | N | Subset for alpha = 0.05 |        |        |        |        |        |
|-----------------------|---|-------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                       |   | 1                       | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      |
| S/B Concentración 3%  | 3 | ,0000                   |        |        |        |        |        |
| AZM1 Concentración 3% | 3 |                         | 1,0000 |        |        |        |        |
| AZM3 Concentración 3% | 3 |                         | 1,0000 |        |        |        |        |
| AZM5 Concentración 3% | 3 |                         | 1,0000 |        |        |        |        |
| S/B Concentración 0%  | 3 |                         |        | 1,6667 |        |        |        |
| S/B Concentración 1%  | 3 |                         |        | 2,0000 | 2,0000 |        |        |
| AZM1 Concentración 1% | 3 |                         |        |        | 2,3333 | 2,3333 |        |
| AZM1 Concentración 0% | 3 |                         |        |        |        | 2,6667 | 2,6667 |
| AZM3 Concentración 0% | 3 |                         |        |        |        |        | 3,0000 |
| AZM5 Concentración 0% | 3 |                         |        |        |        |        | 3,0000 |
| AZM3 Concentración 1% | 3 |                         |        |        |        |        | 3,0000 |
| AZM5 Concentración 1% | 3 |                         |        |        |        |        | 3,0000 |
| Sig.                  |   | 1,000                   | 1,000  | ,170   | ,170   | ,170   | ,217   |