



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS

“Efecto de diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas  
de frijol (Phaseolus vulgaris) y de jitomate (Lycopersicum  
esculentum) en suelo de uso industrial”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

IMURIS URBINA ISLAS

TUTORA

DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA

2012





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

HOJA DE DATOS DEL JURADO

DATOS DEL ALUMNO:

URBINA ISLAS IMURIS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
CARRERA: BIOLOGÍA  
NUMERO DE CUENTA: 400086857

DATOS DEL TUTOR:

DR. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ

JURADO ASIGNADO

PROPIETARIO: DR. GUILLERMO LAGUNA HERNÁNDEZ

PROPIETARIO: DRA. MARISA MAZARI HIRIART

PROPIETARIO: DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ

SUPLENTE: DR. JOSÉ EDUARDO RODRÍGUEZ BUSTAMANTE

SUPLENTE: BIÓL. CLAUDIA VALLEJO ALBARRÁN

DATOS DEL TRABAJO ESCRITO:

**“Efecto de diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas de frijol (Phaseolus vulgaris) y de jitomate (Lycopersicum esculentum) en suelo de uso industrial”. 114 p.  
2012.**

LUGAR DONDE SE REALIZÓ LA TESIS:

INSTITUTO DE INGENIERIA. GRUPO DE CARACTERIZACIÓN Y  
BIORREMEDIACIÓN DE SUELOS Y ACUÍFEROS

## DEDICATORIA

- ✓ **A LOS QUE NO DEJAMOS DE SOÑAR, A LOS QUE NOS DETUVIMOS EN EL CAMINO Y REGRESAMOS A TERMINAR NUESTROS SUEÑOS!**
- ✓ **A MI HERMANO OVIDIO A QUIEN AMO CON TODO MI CORAZÓN, ADMIRO Y RESPETO, CON QUIEN PASE TODA MI NIÑEZ APRENDIENDO, JUGANDO, RIENDO Y CON QUIEN PASARE MI VEJEZ RECORDANDO MOMENTOS.**
- ✓ **A MIS PAPAS: POR DARMER LA OPORTUNIDAD DE TERMINAR MI CARRERA, POR SIEMPRE ESTAR AHÍ, EN LAS BUENAS Y EN LAS MALAS, POR ESCUCHARME Y DARMER CONSEJOS, ASÍ COMO PALABRAS DE ALIENTO, POR VERME CRECER Y BRINDARME TODO ESE CARIÑO DE MADRE Y DE PADRE.**
- ✓ **A LA PULGS POR ESAS BATALLAS EN EL LABO, CON LA DINO, POR ESAS MARAVILLOSAS CHARLAS EN DONDE SIEMPRE ARREGLABAMOS EL MUNDO Y NOS DABAMOS CUENTA DE NUESTRO MUNDO PARALELO, POR LOS ENOJOS, POR LAS RISAS, POR LAS PERDIDAS Y POR TODO AQUELLO QUE HA HECHO CRECER NUESTRA AMISTAD.**
- ✓ **A OVI Y A MARIE. NUNCA DEJES DE SOÑAR Y SI ALGUNA VEZ TE DISTRAES EN EL CAMINO, DIVIERTETE, VIVVELO, DISFRUTALO Y CUMPLE TODOS TUS SUEÑOS.**
- ✓ **A PAME QUE ME DA SIEMPRE MOMENTOS DE RISA, TU PRESENCIA ES UNA LUZ EN MI VIDA, A FLAN POR ENSEÑARME A NO RENDIRSE EN LOS MOMENTOS MÁS DIFÍCILES, A PAOLA POR LA PACIENCIA PARA HACERME ESOS PROGRAMAS PARA MI TESIS. Y A GERARDO POR ESOS MOMENTOS DE ALEGRÍA, LOS QUIERO MUCHO.**
- ✓ **A ISRA, GRACIAS POR TUS SONRISAS, ABRAZOS Y REALIDADES, QUE SIEMPRE ME COMPARTÍAS.**
- ✓ **A MARIANA POR HABERNOS ACOMPAÑADO EN EL CAMINO EXPERIMENTAL, POR HABER COMPARTIDO ACIERTOS Y ERRORES AL REALIZAR NUESTRA TESIS.**

## AGRADECIMIENTOS

- ✓ A la Máxima Casa de Estudios, la UNAM, que me brindó la oportunidad de iniciar y terminar un ciclo más de mi vida.
- ✓ A la **Doctora Susana Saval Bohórquez** por haberme brindado la confianza y el apoyo para la realización de este trabajo. Por haberme dado la oportunidad de aprender y trabajar con ella.
- ✓ A los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y por dedicarle tiempo e interés a este trabajo.
- ✓ A todo **el equipo que colabora con la Doctora Susana Saval**, en especial a **Raúl López Bravo** por la asesoría y el tiempo dedicado a la revisión de mi proyecto.
- ✓ A **Isabel Ramírez Ramírez**, investigadora del CIGA/UNAM campus Morelia por el enorme apoyo otorgado.
- ✓ Al **Dr. David Flores** por el asesoramiento en el diseño del experimento.
- ✓ Al laboratorio de edafología de la Facultad de Ciencias.
- ✓ A todas las personas, compañeros y amigos que ayudaron en el montaje del experimento.

---

---

**INDICE**

RESUMEN.....	1
CAPITULO I	
1. INTRODUCCIÓN.....	3
OBJETIVO GENERAL.....	4
OBJETIVOS PARTICULARES.....	4
HIPÓTESIS.....	4
CAPITULO II	
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1 El suelo.....	5
2.2 Hidrocarburos en el suelo.....	8
2.3 Diesel.....	11
2.4 Efecto de los hidrocarburos sobre el desarrollo de las plantas.....	12
2.5 Pruebas ecotoxicológicas.....	15
2.6 Uso de frijol y de jitomate para pruebas ecotoxicológicas.....	16
2.6.1 Frijol.....	16
2.6.2 Jitomate.....	19
CAPITULO III	
3. ANTECEDENTES.....	23
JUSTIFICACIÓN.....	32
CAPITULO IV	
4. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	33
4.1 Obtención de lotes de suelo.....	33

4.2 Unidades experimentales.....	33
4.3 Diseño experimental.....	33
4.4 Selección de las semillas.....	34
4.5 Condiciones experimentales.....	35
4.6 Siembra de las semillas y desarrollo de las plantas.....	36
4.7 Cosecha de las plantas.....	37
4.8 Prueba de toxicidad en la germinación de las semillas in vitro.....	37
4.9 Determinación de la producción de bióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) como indicador de actividad microbiana.....	38
4.10 Seguimiento de las características del suelo.....	40
4.11 Procesamiento de la información.....	44

## CAPITULO V

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	45
5.1. Análisis fisicoquímico de las muestra de suelo industrial y control.....	45
5.2 Evaluación de la germinación de semillas de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en el suelo iniciales.....	49
5.3 Evaluación de la productividad de las plantas de frijol y jitomate.....	53
5.3.1 Altura de tallo.....	53
5.3.2 Longitud de raíz.....	55
5.3.3 Hojas flor y fruto.....	57
5.3.4 Biomasa.....	59
5.4 Efectos de la contaminación con diesel sobre los parámetros fisicoquímicos en el suelo.....	60
5.4.1 pH en el suelo.....	60

5.4.2 Concentración de fósforo en forma de fosfatos.....	62
5.4.3 Concentración de nitrógeno total (N <sub>T</sub> ).....	64
5.4.4 Concentración de diesel en las muestras de suelo.....	65
5.5 Producción de bióxido de carbono (CO <sub>2</sub> ) como indicador de actividad microbiana.....	66

## CAPITULO VI

CONCLUSIONES.....	69
RECOMENDACIONES.....	70
REFERENCIAS.....	71
ANEXOS.....	vi

## LISTA DE TABLAS

## CAPITULO V

V.1 Características de los suelo empleados.....	48
V.2 Longitud de tallo en la planta de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo.....	54
V.3 Longitud de raíz en frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo.....	55
V.4 Biomasa de las plantas de frijol y jitomate desarrolladas a diferentes concentraciones de diesel en suelo.....	59
V.5 pH en suelo a diferentes concentraciones de diesel para frijol y jitomate.....	61

V.6 Variación de fosfatos en suelo a diferentes concentraciones de diesel en los diferentes tiempos experimentales para las plantas de frijol y jitomate.....	63
V.7 Variación de nitrógeno total en suelo a diferentes concentraciones de diesel en suelo y a diferentes tiempos para las plantas de frijol y jitomate.....	64
V.8 Concentración de hidrocarburos fracción media (diesel) en suelo a diferentes tiempos experimentales para las plantas de frijol y jitomate.....	65

## LISTA DE FIGURAS

### CAPITULO II

II.1 Perfil típico de suelo en el que se muestran los horizontes.....	7
II.2 Morfología de la planta de frijol.....	17
II.3 Morfología de la planta de jitomate.....	20

### CAPITULO IV

IV.1 Semillas de frijol variedad <u>Strike</u> .....	34
IV.2 Semillas de jitomate variedad <u>Superdade</u> .....	35
IV.3 Montaje del experimento.....	36
IV.4 1) matraz biométrico con muestra de suelo contaminado 2) matraz Erlenmeyer con agua 3) trampa alcalina (NaOH), 4) jeringa para retirar solución saturada 5) tubo capilar 6) manguera de latex.....	38
IV.5 Toma de muestras de suelo para determinar parámetros fisicoquímicos.....	40

### CAPITULO V

V.1 Porcentaje de germinación de semillas de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo.....	49
V.2 Prueba de germinación para frijol y jitomate en suelo contaminado a diferentes concentraciones de diesel.....	50
V.3 Desarrollo de raíces y nódulos en la planta de frijol a los 84 días.....	56
V.4 Desarrollo de la raíz en la planta de jitomate a los 84 días.....	56

---

---

V.5 Desarrollo de hojas en la planta de frijol.....	58
V.6 Desarrollo de fruto y flor en las plantas de frijol.....	58
V.7 Desarrollo de hojas en plantas de jitomate.....	59
V.8 Producción de CO <sub>2</sub> como respuesta de la actividad metabólica.....	67

## **RESUMEN**

La presencia de hidrocarburos en los suelos puede tener efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas. De ahí que se han desarrollado ensayos biológicos, enfocados a conocer y evaluar en forma directa los posibles efectos tóxicos o de estimulación de los hidrocarburos sobre los diferentes procesos que llevan a cabo las plantas, como son: la germinación, la formación de la raíz, la emergencia, la formación de follaje, el crecimiento y la formación de frutos, entre otros, además de identificar si los efectos son consecuencia de la absorción de los hidrocarburos.

En este estudio se evaluó el efecto que produce la concentración de diesel en un suelo extraído de una instalación industrial en la Ciudad de México, la cual almacena y distribuye combustibles, sobre el proceso de germinación y el desarrollo de las plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*) y de jitomate (*Lycopersicon esculentum*). El suelo de uso industrial utilizado presentó una concentración residual de diesel de 1,247.36 mg/kg y a partir de ahí se contaminó con cuatro concentraciones más de diesel: 20,000, 35,000, 50,000 y 70,000 mg/kg. Los datos se compararon con un suelo no contaminado. Se llevaron a cabo tres experimentos, en el primero, se evaluó el porcentaje de germinación en cajas Petri con suelo contaminado en las diferentes concentraciones de diesel establecidas inicialmente para las plantas de frijol y jitomate. En el segundo se evaluó el desarrollo de éstas en donde se utilizaron las macetas con suelo contaminado a cinco diferentes concentraciones; se sembraron 10 semillas de frijol y para el jitomate se colocaron 20 semillas al voleo. Al establecerse las plántulas, se seleccionaron cinco para dar seguimiento a su crecimiento. Para conocer las condiciones de los suelos se determinaron los parámetros fisicoquímicos iniciales. Además se obtuvieron muestras de suelo durante el experimento (28, 56 y 84 días) para evaluar el pH, el nitrógeno total y los fosfatos en el suelo. También se determinó la concentración de diesel residual. Y en el tercer experimento se determinó la producción de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana en el suelo de uso industrial contaminado a diferentes concentraciones de diesel.

En el primer experimento, la presencia de diesel en suelo afectó la germinación de frijol y de jitomate, en el caso de frijol el porcentaje de germinación se redujo a 67.7% a una

concentración de diesel de 70,000 mg/kg, para el jitomate se redujo a 61.3% en la misma concentración. En el segundo experimento, el desarrollo de las plantas de frijol se vio afectado por la presencia de diesel y las plantas no sobrevivieron a partir de 20,000 mg/kg; sí se presentó floración y fruto. En la planta de jitomate, aunque no se completó su ciclo de vida, se observó una disminución en el desarrollo del tallo, de la raíz y de la biomasa, al aumentar la concentración de diesel en el suelo. Los análisis fisicoquímicos realizados al inicio del experimento en los suelos industrial y control, indicaron que los suelos eran fértiles para el desarrollo de planta. Los análisis fisicoquímicos realizados durante el experimento en los suelos industrial y control, variaron a lo largo del experimento. Se observó una tendencia a la disminución en la concentración de diesel en ambos tipos de suelo, que pudo ser debida a procesos de volatilización o de degradación microbiana. En el tercer experimento, la producción de bióxido de carbono fue un indicador de la actividad microbiana, pero no estuvo relacionada con la concentración de diesel al inicio de cada condición

# CAPÍTULO I

## 1. INTRODUCCIÓN

Por ser México un país productor de petróleo, gran parte de las actividades industriales están orientadas al procesamiento y transporte a través de ductos, del crudo y de algunos de sus productos refinados, principalmente gasolina y diesel. En México existen poco más de 50 mil kilómetros de ductos instalados en tierra y cerca de dos mil en el mar; todos se encuentran sometidos a presión y algunos a altas temperaturas, además de otros factores ambientales extremos como humedad y salinidad, los cuales promueven su corrosión, con las consecuentes fugas que ocurren sobre terrenos naturales y en el mar.

Otras causas de derrames se deben al manejo del petróleo y de sus derivados, ya sea en instalaciones industriales para proceso y almacenamiento, en tomas clandestinas o en accidentes de vehículos de transporte. Según cifras oficiales publicadas en 2006 por la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente, en México se registraron 278 accidentes de derrames y 126 fugas de hidrocarburos en los que el diesel estuvo presente. El diesel es uno de los principales hidrocarburos utilizados en la industria de proceso y de transporte, y los derrames ocasionados por este combustible han afectado suelos destinados a la agricultura.

La presencia de hidrocarburos en los suelos puede tener efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas, los cuales dependen del tipo y volumen de producto derramado, del tiempo de exposición, factores ambientales y sensibilidad de los organismos que se vean afectados. De ahí que se han desarrollado ensayos biológicos enfocados a conocer y evaluar en forma directa los posibles efectos tóxicos o de estimulación de los hidrocarburos sobre los diferentes procesos que llevan a cabo las plantas, como la germinación, la formación de la raíz, la emergencia, la formación de follaje, el crecimiento y la formación de frutos, entre otros, además de identificar si los efectos son consecuencia de la absorción de los hidrocarburos. Por lo que la aplicación de ensayos biológicos en suelos que han sido contaminados con hidrocarburos, representa una alternativa para identificar el tipo de afectación.

## **OBJETIVO GENERAL**

- ✓ Evaluar el efecto que produce la concentración de diesel en un suelo de uso industrial sobre el proceso de germinación y el desarrollo de las plantas de frijol (Phaseolus vulgaris) y de jitomate (Lycopersicum esculentum).

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- ✓ Evaluar el porcentaje de germinación de las semillas de frijol y de jitomate que fueron colocadas en un suelo de uso industrial contaminado a cinco diferentes concentraciones de diesel: 1,247.36 mg/kg, 20,000 mg/kg, 35,000 mg/kg, 50,000 mg/kg y 70,000 mg/kg de suelo.
- ✓ Evaluar el desarrollo (altura, longitud de raíz, hojas, flores, frutos y biomasa) de las plantas de frijol y de jitomate al término del experimento, en el suelo de uso industrial que fue contaminado a diferentes concentraciones de diesel.
- ✓ Evaluar si existe diferencia en el desarrollo de las dos especies de plantas que crecieron en el suelo de uso industrial contaminado a diferentes concentraciones de diesel.
- ✓ Determinar para las dos especies de plantas si hay una concentración de diesel en el suelo en donde su desarrollo no se vea afectado.
- ✓ Relacionar las características fisicoquímicas del suelo de uso industrial y de un suelo no contaminado con el crecimiento de plantas.
- ✓ Determinar la producción de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como indicador de la actividad microbiana en el suelo de uso industrial contaminado a diferentes concentraciones de diesel.

## **HIPÓTESIS**

- ✓ Se espera que la germinación y el desarrollo de las plantas se vea afectado de manera negativa al aumentar la concentración de diesel en el suelo de uso industrial.

## CAPÍTULO II

### 2. MARCO TEÓRICO

#### 2.1 El suelo

El suelo ha sido definido de diferentes maneras según el enfoque de los diversos autores. Para Bottomley (1993) el suelo es un cuerpo natural tridimensional que ocupa un lugar en el espacio, es el resultado de procesos complejos que le permiten dar soporte a las plantas y energía a los microorganismos; es una matriz heterogénea, en la cual se presentan procesos físicos y químicos complejos. Según Aguilera (1989), el suelo es un medio en el cual se desarrollan las plantas y muchas formas de vida animal; como parte del ecosistema, es un cuerpo natural que lleva a cabo procesos de entrada (el agua y el aire), de salida (evaporación del agua o el aire del suelo) y de energía. Una definición más extensa es la de Conell y Miller (1984) quienes lo consideran un recurso natural no renovable que desempeña varias funciones de acuerdo al lugar donde se encuentre:

- ✓ Actúa como regulador del ciclo del agua y los ciclos biogeoquímicos.
- ✓ Es el medio filtrante del agua que recarga los acuíferos y por lo tanto es una capa de protección.
- ✓ Provee una superficie de absorción.
- ✓ Actúa como un amortiguador en el sistema.
- ✓ Sirve como filtro para los contaminantes.
- ✓ Es el espacio para actividades agrícolas, ganaderas, forestales y recreativas.
- ✓ Alberga una gran diversidad de organismos.
- ✓ Alberga parte de la riqueza cultural y es un documento de la historia del paisaje.

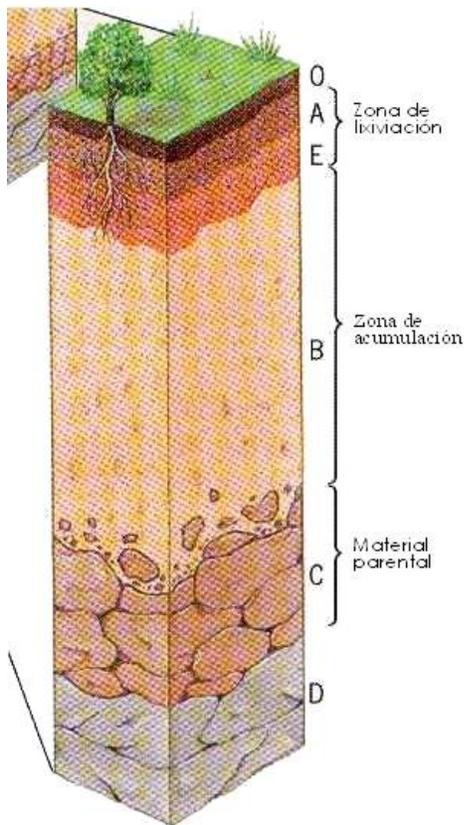
El suelo se forma por la acción de agentes físicos, químicos y biológicos que actúan conjuntamente según el medio en el que se encuentren. Por ejemplo, las rocas y minerales que se encuentran sobre la superficie terrestre, debido a su contacto con la atmósfera, sufren la acción permanente de procesos físicos exógenos, como la meteorización y la erosión por el viento o el agua. Por otro lado, la degradación biológica de las plantas genera el humus del suelo, que representa la parte orgánica.

También se sabe que los líquenes, musgos y plantas transforman al suelo por la disgregación fisicoquímica de las rocas (Flores *et al.*, 2004).

A través de un corte vertical del suelo, se pone en evidencia una estratificación típica, que se denomina perfil del suelo. En este perfil se distinguen capas u horizontes, las cuales son producto de los procesos de formación del suelo que presentan características distintas (Porta *et al.*, 1994) (Figura II.1):

- ✓ Horizonte O: mide de 0 a 3 cm; capa superior oscura rica en materia orgánica.
- ✓ Horizonte A: de 5 a 30 cm, es la capa de color menos oscuro donde la materia orgánica es transformada o humificada y presenta actividad biológica.
- ✓ Horizonte E: o eluvial es de color más claro, caracterizado por una remoción de nutrientes y materia orgánica, mediante el agua.
- ✓ Horizonte B: de 15 a 50 cm, de iluviación o acumulación de componentes minerales como el óxido de hierro y material aluminico provenientes del horizonte superior.
- ✓ Horizonte C: de 15 a 100 cm, es el más profundo y constituye el origen de los otros dos horizontes, donde se encuentran fragmentos de la roca madre.
- ✓ Horizonte R: es la roca consolidada.

El suelo está compuesto por la fracción mineral y contribuye con poco menos de la mitad del volumen, proviene de la desintegración y descomposición de las rocas y está compuesta por partículas de una gran variedad de tamaños, las cuales se clasifican con base en sus dimensiones, de la siguiente manera, rocas y grava, mayores a 2 mm; arenas, que son de 0.050 a 2 mm; limos entre 0.002 y 0.050 mm y arcillas < 0.002 mm (2  $\mu$ m) (Alexander, 1990). La arena en el suelo permite el movimiento del agua y del aire (Larson y Weber, 1994). Las partículas de limo ejercen una influencia menor en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, mientras que las partículas de arcilla, debido a que presentan un área superficial grande y usualmente de carga negativa, son un potente adsorbente de los cationes y posibilitan el intercambio catiónico en el suelo, además de tener una mayor capacidad de retención de agua (Aguilera y Martínez, 1996).



**Figura II.1. Perfil típico de suelo en el que se muestran los horizontes. Tomado de [http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000088/lecciones/seccion1/capitulo04/tema03/01\\_04\\_03htm](http://www.virtual.unal.edu.co/cursos/ciencias/2000088/lecciones/seccion1/capitulo04/tema03/01_04_03htm).**

Los suelos se pueden clasificar según las características que presentan:

- ✓ Por el tamaño de sus partículas o textura. Por ejemplo los suelos arenosos, compuestos principalmente de arena, son muy permeables y de textura gruesa, debido a su gran porosidad y presentan una coloración gris; en los suelos arcillosos, predomina la arcilla, lo que les permite tener una mayor capacidad de absorción de nutrientes, son pesados y compactos, poco permeables, aptos para la agricultura. Su textura es fina, probablemente la textura del suelo más importante en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es ésta, debido a que aportan gran área superficial para la absorción de contaminantes (Aguilera y Martínez, 1996). En los suelos limosos, aunque predominan los limos son una mezcla de arena, limo y arcilla, son de los suelos más aptos para la agricultura (Flores *et al.*, 2004).

- ✓ La Base de Referencia Mundial para Recursos de Suelos (FAO, 1998) estableció dentro de su clasificación, el grupo de suelos de los antropoles para describir a aquellos que han sufrido modificaciones muy importantes debido a las actividades antropogénicas, diferenciando: materiales áricos, gárbico, redúcticos, espólicos y úrbicos. Éstos últimos principalmente pueden haber sido compactados o removidos por excavaciones para construcciones. El suelo industrial empleado en este estudio corresponde a esta clasificación (Porta, 1994).

## 2.2 Hidrocarburos en el suelo

La industrialización ha incrementado la producción de sustancias químicas naturales y xenobióticas, muchas de las cuales tienen como destino final el suelo.

Debido a que los componentes del suelo tienen una gran capacidad para retener compuestos químicos, el suelo es considerado como receptor para toda clase de sustancias químicas. Esta situación puede inducir un impacto en las funciones del suelo como ecosistema, entre las que se encuentran la descomposición de la materia orgánica, la mineralización de nutrimentos y la síntesis de sustancias húmicas (Verhoef y Van Gestel, 1995).

Los hidrocarburos contaminantes en el suelo pueden encontrarse en diferentes formas: los volátiles estarán en forma gaseosa ocupando el espacio poroso, otros estarán adsorbidos en la fase sólida del suelo, otros se encontrarán disueltos en el agua intersticial o en el agua subterránea y probablemente otros estarán formando una capa de producto libre que flota sobre el agua subterránea (Saval, 1999).

Los hidrocarburos pueden afectar diferentes propiedades del suelo como se describe a continuación (Munguía y Martínez, 1991 en Semarnap, 1996):

- ✓ Aumento del carbono orgánico, ya que el 75 % del carbono del petróleo crudo es oxidable. Un efecto inmediato del aumento de este parámetro es el incremento de

los sitios de adsorción, disminuyendo la concentración en la fase acuosa y gaseosa del contaminante orgánico como también su transporte y su biodisponibilidad.

- ✓ Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos.
- ✓ Aumento del manganeso y hierro intercambiable.
- ✓ Aumento de fósforo disponible

Los mismos autores (Munguía y Martínez, 1991 en Semarnap, 1996), concluyen que la propiedad física del suelo más afectada por presencia de hidrocarburos es la pérdida de su estructura, debido a la ruptura de los agregados.

Cuando los hidrocarburos se derraman sobre la superficie del suelo, los parámetros que determinan su migración hacia las capas más profundas son: densidad, solubilidad, presión de vapor, número y tipo de grupos funcionales, así como su polaridad. Otros parámetros propios del suelo como: contenido y retención de agua, porosidad, densidad, permeabilidad, contenido de arcilla, contenido de materia orgánica, pH, capacidad de intercambio catiónico, temperatura y profundidad del agua subterránea, así como parámetros ambientales de temperatura, precipitación y evapotranspiración también determinan el destino final de los hidrocarburos (Saval, 1999).

Una vez en el suelo, los hidrocarburos están expuestos a una transformación física como:

- ✓ Volatilización. Proceso mediante el cual un contaminante pasa de la fase líquida a la fase gaseosa. Los hidrocarburos disueltos en agua, responden a la Ley de Henry. La constante de la Ley de Henry ( $\text{atm}\cdot\text{m}^3/\text{moles}$ ) es igual a  $P^\circ$  de atmósfera dividida por la solubilidad en agua del compuesto ( $\text{moles}/\text{m}^3$ ) por lo que hidrocarburos de bajo peso molecular, son los más volátiles ya que presentan altos valores de la constante de la Ley de Henry (el benceno) y alta presión de vapor. La presión de vapor significa una tendencia del compuesto a la evaporación y es esencialmente la solubilidad de un disolvente orgánico en un gas.

- ✓ Fotólisis. Cualquier hidrocarburo, puede ser fototransformado tanto como pueda absorber luz solar y esto puede ocurrir en el suelo superficial. La velocidad de fotólisis puede determinar la persistencia en el ambiente, así entre más rápida sea la degradación es menos probable que continúe en el ambiente (Nely, 1990).

Los contaminantes están expuestos a una transformación química en el suelo; mediante procesos de:

- ✓ Oxidación: muchos hidrocarburos aromáticos experimentan oxidación de radical libre.
- ✓ Reducción: involucra a hidrocarburos en sistemas de agua-arcilla. El efecto se acelera al aumento de agua sugiriendo la existencia del mecanismo de transferencia de un electrón donde la arcilla actúa como un aceptor.

Los hidrocarburos están expuestos a una degradación biológica llevada a cabo por los microorganismos en el suelo, los cuáles tienen un papel fundamental en la ausencia y/o permanencia de compuestos orgánicos, ya que las enzimas extracelulares que estos secretan, conducen las reacciones metabólicas de descomposición de la materia orgánica y los ciclos de nutrimentos esenciales (Domínguez, 2001; Gibson y Subramanian, 1984).

Cuando en el suelo existen hidrocarburos del petróleo, sobreviven especies de bacterias que utilizan estos contaminantes como fuente de carbono y energía degradándolos hasta CO<sub>2</sub> y agua (Atlas, 1981). El proceso de biodegradación se lleva a cabo de manera natural en el suelo; sin embargo, algunas condiciones microambientales pueden disminuir o retardar el proceso de biodegradación. Éstas condiciones incluyen: la biodegradabilidad y biodisponibilidad de los hidrocarburos, la presencia de microorganismos degradadores en cantidad suficiente y que dichos microorganismos expresen suficiente actividad catabólica, que haya un contacto adecuado microorganismo-sustrato, que sea baja o nula la toxicidad de los hidrocarburos, que exista un flujo ilimitado de elementos nutritivos (macronutrimentos: nitrógeno y fósforo, así como micronutrimentos: elementos traza, azufre) y de aceptores finales de electrones (oxígeno, nitratos, sulfatos), disponibilidad de agua, así como

temperatura adecuada y ausencia de metales pesados que inhiban la actividad microbiana (Nely, 1990; Sims *et al.*, 1990; Romantschuk *et al.*, 2000).

Entre los microorganismos que pueden utilizar hidrocarburos para su desarrollo están las bacterias, hongos y levaduras.

## 2.3 Diesel

El diesel que se emplea en México se le conoce con el nombre comercial de PEMEX diesel. Es el producto de mayor demanda y con el que se han observado los mayores problemas de contaminación de suelos. Es ampliamente usado en la industria del transporte de carga, en general vía carretera, barco o ferrocarril y como combustible para mover motores de plantas generadoras de energía eléctrica.

El diesel es producido en las refinerías en columnas fraccionadoras como un destilado medio de hidrocarburos del petróleo. La composición química específica y sus propiedades varían dependiendo de las características del crudo a partir del cual se destilan (Block *et al.*, 1991).

El diesel es una mezcla compleja de hidrocarburos con un número promedio de átomos de carbonos de C<sub>8</sub> a C<sub>26</sub>, tiene un intervalo de ebullición de 282 a 338 °C. Su viscosidad es de 2.2 a 2.4 centistokes, es decir es cuatro veces más viscoso que la gasolina (Stone, 1991).

Las parafinas (alcanos lineales, ramificados y cíclicos) son los hidrocarburos más abundantes en el diesel (entre 65% y 85%). También presenta hidrocarburos aromáticos (10-30%), incluyendo monoaromáticos volátiles como benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos (BTEX), los cuales representan una proporción del 3% y poliaromáticos como el pireno, criseno, cresol, naftaleno (Wang *et al.*, 1990).

Algunos de los hidrocarburos presentes en el diesel pueden provocar efectos a la salud, debido a su toxicidad. Por ejemplo, la exposición al benceno es de particular importancia ya que ha demostrado ser carcinogénico por las vías de exposición de inhalación e ingestión. Los xilenos y el tolueno afectan el sistema nervioso central en altas dosis. El naftaleno, ha sido reportado como causante de anemia hemolítica en humanos que han estado expuestos. El criseno y fenantreno han causado tumores en la piel cuando se entra en contacto directo con ellos. Benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, quinolina y N-Nitrosidifenilamina se han reportado como carcinógenos en animales de laboratorio. Los cresoles y fenoles no son carcinógenos (Stone, 1991).

En el suelo, el diesel presenta una migración vertical limitada debido a sus propiedades físicas ya que sólo se desplaza unos cuantos metros a partir de la superficie del suelo y su distribución no es uniforme (Adam y Duncan, 2002). Bajo condiciones normales el diesel puede ser absorbido en la superficie de un suelo rico en materia orgánica, impidiendo su migración vertical. Esto hace que sea un candidato a la remediación con plantas, ya que se puede mantener en la superficie y en la zona radicular de algunas especies de plantas (Kruger *et al.*, 1997). Además, algunos de los alcanos contenidos son susceptibles al ataque microbiano (Atlas y Bartha, 1993).

## **2.4 Efecto de los hidrocarburos sobre el desarrollo de las plantas**

Es bien conocido que el ciclo de vida de una planta tiene efectos en los procesos químicos, físicos y biológicos que ocurren a su alrededor. El proceso de elongación y crecimiento de la raíz, la adquisición de agua y nutrimentos, así como la senescencia y muerte alteran los procesos en el suelo (Cunningham y Ow, 1996).

Las plantas han mostrado gran capacidad para la degradación y mineralización de contaminantes (Adam y Duncan, 1999), ya que proporcionan un ambiente óptimo para la proliferación microbiana en la rizósfera la cual está constituida por las raíces de la planta, la comunidad microbiana y la porción de suelo (Kruger *et al.*, 1997). Esta zona ecológica crítica garantiza el desarrollo vegetal, ya que de aquí la raíz toma los nutrientes del suelo y en ella

actúa el ciclo del nitrógeno por la interacción de organismos fijadores que va de la atmósfera al suelo (Boyle y Shann, 1998).

El proceso de degradación está influenciado no sólo por los microorganismos de la rizósfera sino también por las propiedades únicas de la planta (Walton *et al.*, 1994; leído en Adam y Duncan, 1999). Si la planta tiene éxito en su establecimiento en suelos contaminados, entonces la interacción entre planta y los microorganismos en la rizósfera proporciona las condiciones para degradar contaminantes (Adam y Duncan, 2002).

Por analogía de la fitoextracción de los metales, las plantas absorben de forma directa los hidrocarburos, es decir, las raíces de las plantas absorben sobre sus estructuras lipídicas de la membrana celular los hidrocarburos de bajo peso molecular dando como resultado dos posibles efectos: el primero, es tóxico, ya que actúan como disolventes de la membrana lipídica de las células y en el segundo pueden ser parcial o totalmente degradados y transformados a compuestos menos tóxicos que son limitados a los tejidos de las plantas. Otro proceso presente en las plantas es la translocación de los contaminantes al tallo y subsecuentemente su volatilización en la superficie de las hojas (Cunningham y Ow, 1996). Además, a diferencia de los contaminantes químicos inorgánicos, los cuales son inmutables a un nivel elemental, los contaminantes orgánicos pueden ser mineralizados por plantas o por los microorganismos asociados a las raíces, por efecto de las enzimas metabólicas.

Las plantas absorben hidrocarburos en forma indirecta: los hidrocarburos pueden ser degradados por medio de la secreción de exudados en la raíz, mediante la ayuda de la actividad metabólica realizada por hongos y bacterias presentes en la rizósfera (Anderson *et al.*, 1993; Shimp *et al.*, 1993). En los exudados radicales, algunos compuestos orgánicos como ácidos orgánicos, alcoholes y proteínas pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno para el desarrollo y crecimiento de los microorganismos que presentan la capacidad de degradar estos compuestos contaminantes.

Debido a la poca disponibilidad de oxígeno en el suelo ocasionada por la presencia de hidrocarburos, los microorganismos degradadores compiten por éste, generando condiciones anóxicas y ocasionando daño a las raíces de las plantas, lo que además provoca la producción microbiana de compuestos fitotóxicos como son ácidos grasos, fenólicos, terpenos y H<sub>2</sub>S. Además, los microorganismos degradadores también compiten con los microorganismos de la rizósfera por los nutrimentos minerales (DeJong, 1986).

Se sabe que en suelos saturados con hidrocarburos, las plantas herbáceas mueren o pueden presentar síntomas similares al efecto de la sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua, aunque esto no sucede con todas las especies de plantas (Anderson *et al.*, 1994); en cambio los efectos en los árboles y matorrales se manifiestan hasta varios meses después del derrame. Los efectos de los hidrocarburos en las plantas dependen en gran medida de la concentración y tipo, además del tipo de suelo, las especies de plantas afectadas y el clima de la zona. (Wang *et al.*, 1990). Por ejemplo, en los suelos de clima frío se requieren largos períodos de tiempo para el restablecimiento de las plantas. En climas templados las plantas tienen una mayor recuperación que en los climas árticos y subárticos.

Algunos estudios muestran que debido a la descomposición de los hidrocarburos, se pueden presentar efectos benéficos y actuar como hormonas de crecimiento, dando como resultado el aumento en el contenido de humus y en la capacidad de retención de agua en el suelo (Bossert y Bartha, 1984). Otros efectos benéficos incluyen el incremento de la agregación en la estructura física ya que favorecen a la diversidad microbiana y a la fijación de nitrógeno (Frankenberger, 1992).

## 2.5. Pruebas ecotoxicológicas

El concepto de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia de producir un efecto dañino sobre un organismo. En el año de 1969 surgió el término ecotoxicología, con el objetivo de preservar a las plantas, suelo, cuerpos de agua y otros componentes que integran un ecosistema (Duffus, 1983).

Las propiedades tóxicas de un compuesto químico pueden ser evaluadas mediante estudios utilizando plantas, bacterias o animales, así como un ecosistema a nivel de organismos unicelulares o de estructuras moleculares. Los estudios se pueden realizar considerando una sola dosis del contaminante, se determina entonces la toxicidad aguda; este tipo de estudios permite calcular las dosis que son letales para los organismos, así como para realizar pruebas de mayor duración. Otros estudios de toxicidad están enfocados a determinar la toxicidad crónica, en este caso, los organismos son expuestos repetidas veces a una dosis de contaminante, los resultados permiten conocer los niveles de contaminación que ocasionan daño en los organismos (Pepper *et al.*, 1996).

Las pruebas de toxicidad realizadas con plantas son usadas para evaluar suelos contaminados, ya sea para asegurar la limpieza de un sitio que fue sometido a remediación, para evaluar la compatibilidad de suelos ya remediados con la flora natural y para determinar la reducción de los niveles de toxicidad de contaminantes en el suelo (Wang, 1991).

Un aspecto importante al evaluar los resultados obtenidos mediante pruebas de ecotoxicidad es el hecho de que cada especie vegetal tiene un intervalo de sensibilidad diferente para cada compuesto y proveen puntos de referencia útiles para definir límites máximos permisibles o límites de remediación (Safferman, 1998). Estos ensayos son simples, versátiles y útiles para evaluar la toxicidad de contaminantes en suelo, sedimentos y aguas (Lewis, 1995).

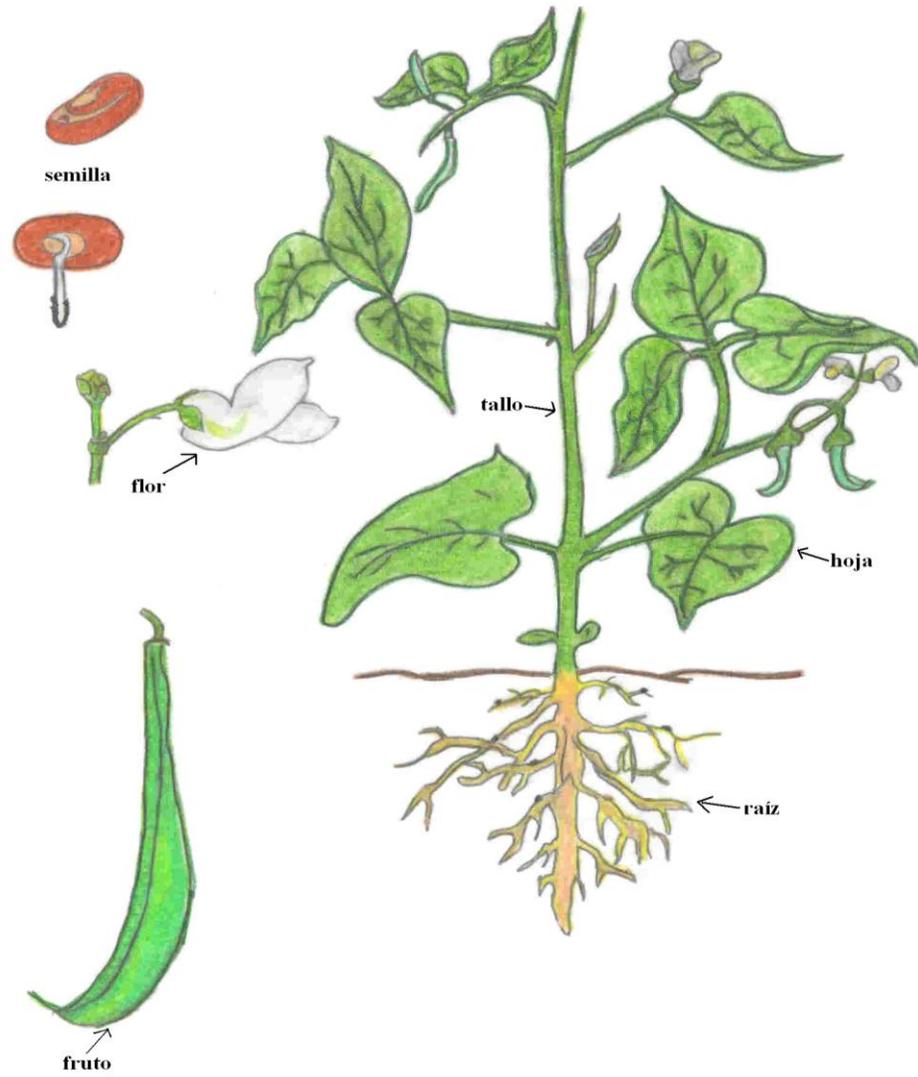
Plantas fijadoras de nitrógeno como las leguminosas han sido usadas en pruebas de remediación, así como en la mineralización de contaminantes orgánicos en suelos. Los hidrocarburos del petróleo, añaden un estímulo de carbono a cierto tipo de microorganismos, ocasionando un desequilibrio en el suelo de la proporción carbono-nitrógeno (C:N), esto trae como consecuencia la inmovilización del nitrógeno realizada por la masa microbiana, la cual no deja residuos disponibles para que la planta crezca. Debido a que las leguminosas fijan nitrógeno atmosférico para su crecimiento por asociación microbiana, los microorganismos pueden tener éxito y desarrollarse en suelos contaminados con hidrocarburos. En apoyo a esto, se ha encontrado que especies de leguminosas son abundantes para rehabitar suelos contaminados con diesel (Gudin y Syrratt, 1975).

## **2.6. Uso de frijol y de jitomate para pruebas ecotoxicológicas**

### **2.6.1 Frijol**

El Frijol ejotero, cuyo nombre científico es Phaseolus vulgaris, pertenece a la familia de las Leguminosae. Es una planta anual, de 50 a 70 cm de altura; se desarrolla a temperaturas óptimas entre 20 y 25°, es tolerante a la sequía, a la sombra y poco tolerante a inundaciones. Se desarrolla en un pH óptimo de 5.8 a 6.7, pero se ha visto que tiene una tolerancia con un rendimiento satisfactorio en pH de 5.5 a 7.5 (Porta *et al.*, 1994). Presenta un ciclo de vida corto, ya que las vainas del frijol pueden ser cosechadas entre 45 y 90 días después de haberse sembrado. Se desarrolla en suelos ricos en materia orgánica, arenosos o arcillosos.

Morfología de la planta de frijol (Figura II.2)



*Figura II 2. Morfología de la planta de frijol.*

- ✓ Establecimiento de la semilla. La germinación de la semilla es epígea, es decir, que sus cotiledones salen a la superficie del suelo formando lo que se llama hojas-cotiledones. La semilla germina después de dos o tres días de la siembra y contiene cerca del 22% de proteínas, muy poca fibra o grasas y el resto de la semilla contiene carbohidratos, además de factores tóxicos como hemaglutininas, las cuales destruyen las células de los glóbulos rojos en animales que la ingieren cruda. La semilla presenta una variedad de coloraciones, puede ser roja, café con pintas, amarilla, negra o blanca.
  
- ✓ Crecimiento vegetativo. El frijol tiene raíces bien desarrolladas, con raíz principal y raíces secundarias ramificadas, cercanas de la superficie, las cuales presentan nódulos donde se encuentran las bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire; tallos delgados y pueden crecer hasta tres metros, además contienen aproximadamente de cuatro a ocho nodos; las primeras hojas se forman después de la emergencia de los cotiledones y son de forma acorazonada, sencillas y opuestas (Parsons, 1990). Las hojas verdaderas son pinnadas, trifoliadas, pecioladas, están cubiertas de pelos finos y terminan en punta, la talla promedio de las hojas es de 15 x 10 cm.
  
- ✓ Floración y fruto. El frijol desarrolla flores que crecen en racimos axilares y se forman cerca del ápice del pedúnculo pequeños pedicelos, presentan coloraciones variadas, que pueden ser rojas, rosas, blancas, amarillas, crema o violetas. Su fruto presenta forma de vaina y mide de 8 a 20 cm, suavemente curvado, puede ser de color verde, amarillo, blanco o plateado; semillas de 2 a 15, reniformes oblongas a ovals o redondeadas, poco comprimidas. La floración y el fruto comprenden un periodo corto de tiempo.
  
- ✓ Cultivos y usos. Los cultivos de frijol mejoran los suelos, incorporando el nitrógeno atmosférico que se fija por simbiosis con bacterias del género Rhizobium, siempre y cuando en el suelo exista menor cantidad de nitrógeno que en el aire. Los rizobios infectan los pelos absorbentes de las raíces de las leguminosas. Las bacterias toman la energía de la planta a la cual han infectado y ésta a su vez recibe el nitrógeno que la bacteria ha logrado fijar. Es recomendable cosechar los cultivos después de una o dos semanas de que florece. El frijol constituye uno de los principales cultivos para la

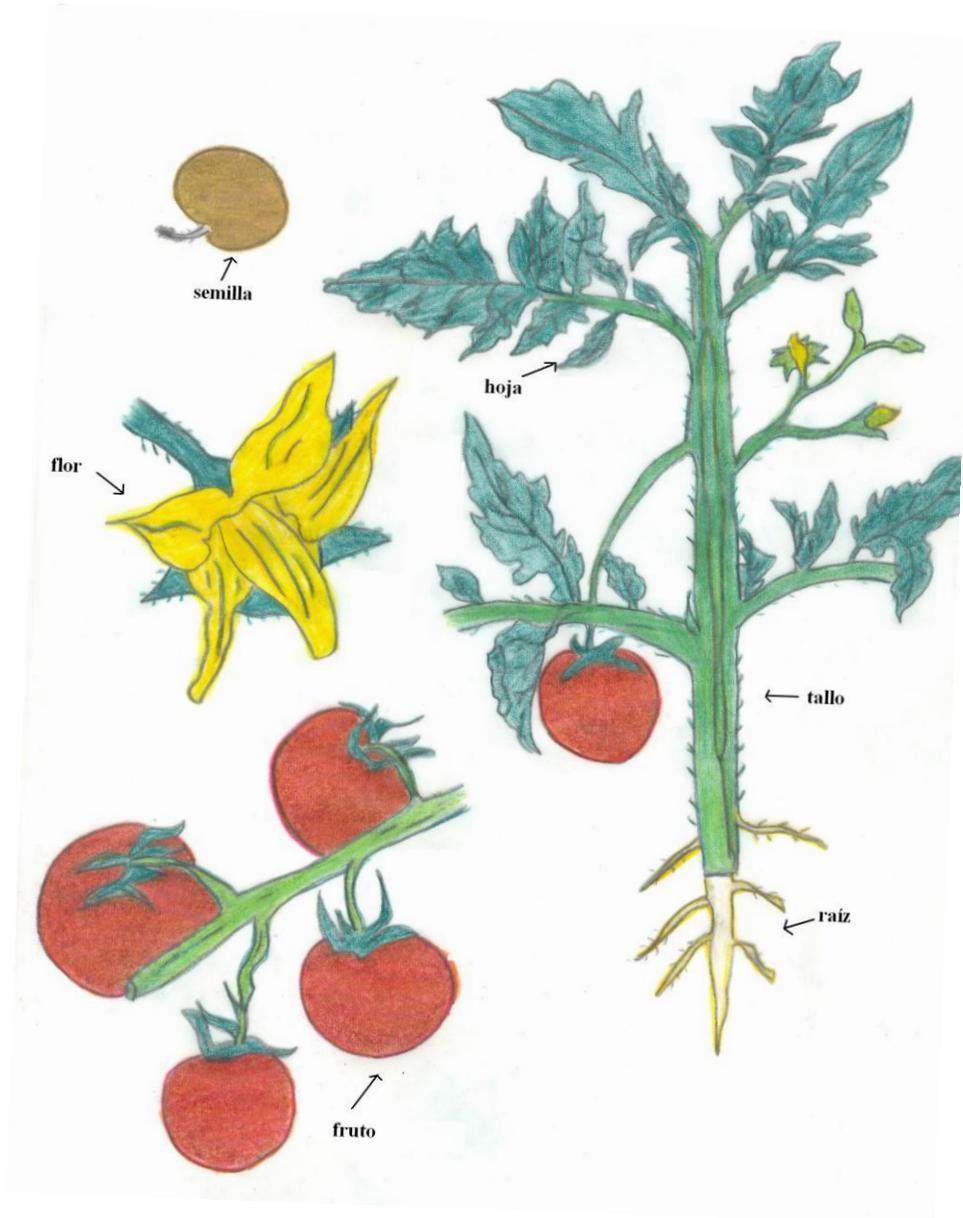
---

alimentación humana, se utilizan los granos secos o tiernos; las vainas enteras y verdes se consumen como verdura. Puede utilizarse como abono verde en rotación, intercalado como cobertura con otros cultivos y como forraje de corte para animales. Pueden estar expuestos a enfermedades ocasionadas por hongos como: chahuistle (las hojas y vainas presentan pústulas de color café rojizo); antracnosis (manchas negras alargadas en tallos, hojas y vainas); pudriciones radiculares (amarillamiento del follaje); moho blanco (pequeñas manchas blancas que cubren toda la planta) y cenicilla (aparece un polvo blanco en las partes aéreas de la planta). Así como a plagas como: chicharritas, conchuela, mosca blanca, doradillas, picudo del ejote, minador de la hoja, pulgones o áfidos. Una deficiencia de nutrientes también puede ocasionar efectos negativos en la planta, por ejemplo: la ausencia de nitrógeno y hierro ocasionan amarillamiento de las hojas, la deficiencia de fósforo en las hojas hacen que se tornen color verde oscuro, la falta de potasio ocasiona que las hojas se vuelvan moteadas y manchadas, una limitada cantidad de magnesio produce clorosis, y la ausencia de zinc impide el crecimiento de las plantas (Parsons, 1990).

### 2.6.2 Jitomate

Además de las plantas fijadoras de nitrógeno otras plantas de cultivos comestibles también han sido utilizadas para pruebas de toxicidad, tal es el caso del jitomate bola cuyo nombre científico es Lycopersicum esculentum, pertenece a la familia de las Solanaceae, planta herbácea anual, semileñosa, crece de 50 cm a un metro de altura. Se desarrolla en un pH óptimo de 6.0 a 6.7, sin embargo, se ha visto que tiene tolerancia para un rendimiento satisfactorio de 6.0 a 8.2 (Porta *et al.*, 1994). Esta planta completa su ciclo de vida entre 80 y 120 días. El frío o calor extremo afecta su desarrollo.

Morfología de la planta (Figura II.3)



*Figura II 3. Morfología de la planta de jitomate.*

- ✓ Establecimiento de la semilla. La germinación del jitomate se lleva a cabo en condiciones óptimas de temperatura de 18°C a 26°C y se da entre 6 y 10 días. En este período se desarrolla un sistema con una raíz principal y raíces secundarias. Cuando las raíces encuentran un drenaje pobre en el suelo donde los niveles del oxígeno son muy bajos para crecer, las plantas usualmente producen raíces de fibras muy pequeñas y cercanas a la superficie. Lo mismo sucede cuando está en suelo muy compacto, donde el crecimiento de las raíces es lento, poco profundo y queda en desventaja, haciendo a la planta más vulnerable al estrés hídrico y hace más difícil el manejo del agua. Durante el desarrollo inicial, la porción de la planta de tomate que crece sobre la tierra es pequeña comparada a las raíces, las hojas jóvenes son esenciales como fuente de energía.
  
- ✓ Crecimiento vegetativo. Durante el crecimiento vegetativo del jitomate, antes de la floración, la energía de la planta se va a las raíces y hojas. Los tallos y las hojas están cubiertos por numerosos pelos cortos que cuando se golpean emiten un olor distintivo de esta planta. La base del tallo principal tiende a formar raíces adventicias. Los tallos laterales terminan en una floración apical.
  
- ✓ Las hojas son compuestas, largas y dentadas, presenta un follaje de hojas pequeñas y grandes; el daño al follaje en este estado no es crítico a menos que sea muy extensivo. En este período, la porción de la planta sobre suelo se incrementa (Van Haeff, 1990).
  
- ✓ Floración y fruto. El jitomate produce inflorescencias agrupadas en racimos. En un solo racimo pueden haber al mismo tiempo, flores en floración y frutos en pleno desarrollo, además los racimos surgen de las hojas axilares y contienen de 4 a 12 flores que son hermafroditas con un ovario supero. La corola con seis lóbulos, es amarilla generalmente y los estambres (6) forman un cono distintivo que cubre el estigma, asegurando la autopolinización. Las flores finales ya no se desarrollan. Una vez polinizada la flor, forma un fruto y produce racimos sucesivos a lo largo del tallo (Van Haeff, 1990).

- ✓ Su fruto es una baya globosa y lisa que contiene un gran número de semillas aplanadas y reniformes. El fruto se expande por un largo periodo, por lo tanto a todos los frutos les lleva tiempo caer. El fruto madura generalmente al presentar una coloración roja debido a la presencia de caroteno y licopeno (Langer y Hill, 1991).
  
- ✓ Cultivos y usos. El jitomate se utiliza generalmente para fines de consumo fresco, en jugos, pastas, bebidas y otros concentrados, además de que tiene uso industrial para la elaboración de otros alimentos. Los jitomates se cultivan mejor en verano, son sensibles a las heladas y puede ser afectado por enfermedades fúngicas como: sancocho (las plantas tienden a marchitarse); pata negra (las plantas afectadas presentan una pudrición seca en la raíz y en el tallo, las plantas se desarrollan lentamente y mueren sin producir cosecha); tizón tardío (las hojas se chamuscan); mancha de septoria o viruela (se presentan lunares de aspecto acuoso) y pudrición radicular (sin amarillamiento, la planta se marchita, seguida por la muerte rápida). La presencia de plagas como: hormigas, pulgillas, minador de hoja, pulgas o áfidos afectan a las plantas. La deficiencia o exceso de nutrientes y las condiciones del ambiente afectan el desarrollo de la planta de jitomate, por ejemplo: una deficiencia de magnesio provoca amarillamiento de hojas a media altura de la planta; las grietas concéntricas son causadas por exceso de sol; las grietas radiales (fruto agrietado), malformación de las flores o inflorescencias son producidas por exceso de nitrógeno y el exceso de riego ocasiona la podredumbre apical del fruto por falta de absorción de agua (Van Haeff, 1990).
  
- ✓ El suelo debe tener buena capacidad de retención de agua, el agua para riego y el suelo deben tener una baja salinidad. Los suelos de textura franca tienden a favorecer una producción precoz y una maduración uniforme y simultánea. Los suelos arcillosos provocan un crecimiento lento y parejo.

## CAPÍTULO III

### 3. ANTECEDENTES

En estudios realizados por Chaîneau *et al* (1997), en zonas agrícolas expuestas a una baja contaminación con hidrocarburos, se ha demostrado que algunos cultivos pueden ser sembrados con éxito. La germinación y el desarrollo de siete especies de plantas: girasol (*Helianthus annuus*), maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), lechuga (*Lactuca sativa*) y trébol (*Trifolium repens*) fueron estudiadas en suelo contaminado artificialmente con una mezcla de dos tipos de gasolina, una conteniendo 60% de hidrocarburos saturados (C<sub>9</sub>-C<sub>25</sub>), 30% de aromáticos y 10% de resinas, y otra conteniendo 80% de hidrocarburos saturados, 5% de aromáticos y 15% de resinas. La presencia de gasolina en el suelo inhibió la germinación en las siete especies de diferentes formas: para las semillas de lechuga, cebada, maíz y trébol, no se observó una diferencia significativa en la germinación, sin embargo, las semillas de girasol, frijol y trigo resultaron ser más resistentes a la presencia de gasolina en el suelo. El desarrollo de las siete plantas también se vio afectado por la presencia de gasolina, se inhibió el crecimiento de la raíz y las partes aéreas de las plantas; esta inhibición fue mayor a medida que se aumentaron las concentraciones de hidrocarburos. Las plantas más afectadas en su crecimiento fueron las de trigo y frijol, además se observó la presencia de síntomas de clorosis en las hojas de las plantas. La planta de maíz resultó ser la más tolerante a la presencia de gasolina en el suelo. Respecto a la fitodisponibilidad, sobre la planta de maíz, no se detectaron los compuestos saturados, ni aromáticos de las gasolinas.

Adam y Duncan (1999) evaluaron el efecto del diesel sobre la germinación y el crecimiento de 22 especies de plantas, como: pastos (para aves, pastos altos, pastos negros, pasto para ovejas y pastos anuales), herbáceas, leguminosas (trébol rojo, trébol blanco, trébol amarillo, arveja, alfalfa) y granos comerciales (canola y lino). El suelo fue impregnado con dos concentraciones de diesel, 25,000 y 50,000 mg/kg, se utilizó un suelo no contaminado como control. Las diferencias más notables en el porcentaje de germinación se presentaron entre los pastos, ya que algunas especies como *Agrostis stolonifera*, crecieron en la concentración baja de diesel, mientras que otras especies como *Poa trivialis*, fueron

intolerantes a la presencia de diesel. A una concentración de diesel de 25,000 mg/kg todos los granos, tres herbáceas y seis pastos presentaron un porcentaje de germinación mayor o igual a 50%, mientras que a una concentración de 50,000 mg/kg sólo tres especies de granos, una herbácea (alfalfa) y un pasto presentaron un porcentaje de germinación mayor o igual al 50%. La mayor resistencia al diesel se observó en dos especies de granos: Brassica napus var. Olifera con un porcentaje de germinación del 95% en la mayor concentración de contaminante y Linum usitatissimum con 98% de germinación en 50,000 mg/kg de diesel. Con respecto a la emergencia y crecimiento de las plantas se encontró que en ambas concentraciones, una semilla de cultivo comercial (Brassica napus var. Olifera) disminuyó su crecimiento en altura y largo de raíz en menos del 20% con relación al control y se observó también la presencia de las raíces adventicias y laterales las cuales se cree que rechazan zonas del suelo con la mayor concentración del contaminante.

Páez (2000) evaluó el porcentaje de germinación y el desarrollo vegetativo de tres plantas: frijol (Phaseolus vulgaris), maíz (Zea mays) y trigo (Triticum aestivum) para conocer el nivel de toxicidad prevaleciente en un suelo de textura franco arenosa contaminado artificialmente con petróleo a concentraciones de hidrocarburos de 1.5, 3, 6, 12, 25 y 50%. La germinación de las plantas resultó afectada en las tres especies probadas, siendo la más sensible el frijol, para la cual el porcentaje de germinación fue de 93% en la concentración de 50% de suelo contaminado y el porcentaje más bajo fue de 30% en la concentración de 1% de suelo contaminado. Para el maíz se obtuvo un porcentaje de germinación del 100% en las concentraciones más altas de suelo contaminado (25 y 50%), mientras que el porcentaje de germinación más bajo (86.7%) se registro para la concentración del 12%. En el caso del trigo, se observó un 100% de germinación en tres de las concentraciones probadas (3, 25 y 50%) y el porcentaje de germinación más bajo (76.7%) se observó en la concentración de 12%. Por otra parte, el efecto de la contaminación sobre el desarrollo de las plantas fue mayor en la planta de frijol, donde se observó amarillamiento, marchitez y pérdida de hojas. Para la planta de trigo los efectos sobre el crecimiento de tallo y raíz fueron significativamente diferentes en las distintas diluciones de suelo contaminado, observándose un efecto de estimulación en las concentraciones más altas. El efecto para el maíz fue muy similar a la respuesta de la planta

de trigo, lo que implica que las monocotiledóneas presentan mayor resistencia a los hidrocarburos y por lo tanto pueden ser candidatas para estudios de fitorremediación.

En 2001, Domínguez realizó pruebas de biotratibilidad en un suelo de tipo industrial que fue contaminado con diesel 12 años atrás. Como control se usó una muestra de suelo limpio obtenida de un sitio cercano al contaminado. Las pruebas de biotratibilidad, tuvieron como objetivo, probar el efecto de la adición de agentes texturizantes como composta, fibra de coco y harina de hueso, con y sin adición de fertilizantes, se realizaron en dos etapas y se evaluaron diferentes parámetros a los 40 y 80 días. En la primera etapa, se realizó una prueba biológica para determinar el porcentaje de germinación y emergencia de dos especies, una considerada resistente a condiciones de estrés como el alpiste (*Phalaris canariensis* L) y otra muy sensible que es el jitomate (*Lycopersicon esculentum* L). Cada tratamiento fue comparado con un testigo. En la prueba testigo (55,475 mg/kg) el porcentaje de germinación del alpiste fue alto (84%) del cual, el 74% emergió de la superficie. El jitomate se vio más afectado ya que presentó el 8% de la germinación del cual sólo emergió el 1%. La concentración de diesel al final del tratamiento sin fertilizantes fue de 8,553 mg/kg y con fertilizantes de 20,481 mg/kg, el porcentaje de germinación del alpiste fue muy similar, del 90% y 88%, respectivamente, con un porcentaje de emergencia de 80 y 72% para cada tratamiento. El porcentaje de germinación del jitomate también fue alto, sin fertilizantes donde germinó el 66% y emergió el 55%, y con fertilizantes con un porcentaje de germinación y emergencia de 85 y 63%, respectivamente. En el tratamiento con fibra de coco, en ausencia de fertilizantes, con una concentración de diesel de 11,893 mg/kg al final del tratamiento, se observó un porcentaje de germinación de alpiste alto, de 88% y de emergencia del 82%, de manera similar al tratamiento con composta. Los porcentajes de germinación y emergencia del jitomate fueron del 67% y 56%, respectivamente. En general, las semillas de alpiste germinaron eficientemente en concentraciones de 55,000 mg/kg de diesel lo que indicó que son muy resistentes a altas concentraciones de hidrocarburos. En cambio, las semillas de jitomate resultaron ser muy sensibles a concentraciones superiores a 20,000 mg/kg de diesel. Para la segunda etapa se adicionaron composta y fibra de coco en mezcla. En los tratamientos sin fertilizantes la concentración de diesel residual fue de 11,459 mg/kg. El porcentaje de germinación de semillas de alpiste fue del 78% y 67% de emergencia, mientras que el

porcentaje de germinación de semillas de jitomate fue de 64% con un 25% de emergencia. En el tratamiento en donde se adicionaron fertilizantes, el porcentaje de germinación de alpiste fue del 85% del cual el 93% emergió. El porcentaje de germinación de las semillas de jitomate fue muy bajo, del 13% y ninguno emergió. La concentración del diesel residual al final de cada tratamiento fue en promedio de 25,579 mg/kg, mucho más alta que la obtenida en los demás tratamientos. En el tratamiento con harina de hueso la concentración final de diesel fue de 9,835 mg/kg. El porcentaje de germinación de alpiste fue del 86%, de éste, sólo el 7% no emergieron. El porcentaje de germinación del jitomate fue del 59%, muy cercano al obtenido con el tratamiento sin fertilizantes, y aunque la concentración del diesel en presencia de harina de hueso fue menor que sin fertilizantes, el porcentaje de emergencia fue del 41%. En la mayoría de los tratamientos el porcentaje de germinación y emergencia para el caso del alpiste fue muy elevado, a pesar de las diferentes concentraciones de diesel que se tenían al final de cada tratamiento. Las semillas de jitomate fueron muy sensibles a concentraciones superiores a 20,000 mg/kg, por lo que, en el testigo y en los tratamientos en los que la concentración de diesel fue superior a este valor, que corresponden al tratamiento con fibra de coco y fertilizantes, y al tratamiento con texturizantes combinados y fertilizantes, presentaron porcentajes de germinación y emergencia muy bajos, menores al 26%. El tratamiento con composta y fertilizantes presentó los más altos porcentajes de germinación y emergencia, del 85% y 63%. Los tratamientos con composta y fibra de coco con texturizantes combinados, y además adicionados de harina de hueso, presentaron porcentajes de germinación similares, pero más bajos que el tratamiento con composta y fertilizantes.

Palmroth, *et al.*, 2002, evaluó la remoción de diesel en el suelo mediante el uso de varias especies de plantas nativas de la latitud norte. Las plantas utilizadas fueron: pino escocés (*Pinus sylvestris*), álamo (*Populus deltoides*), pasto rojo (*Festuca rubra*) pasto de pradera (*Poa pratensis*), pasto de centeno perenne (*Lolium perenne*), variedades de leguminosas como trébol blanco (*Trifolium repens*) y guisantes (*Pisum sativum*). La emergencia y el desarrollo de las plantas permitieron determinar el efecto fitotóxico del diesel. El diesel desapareció más rápido en el tratamiento con leguminosas que en los otros tratamientos con las diferentes plantas. La presencia de álamo y pino aumentó la remoción del contaminante, pero la remoción con pasto fue similar a la del control (sin vegetación). Para

determinar la presencia de fitoacumulación o fitodegradación del diesel, se analizaron los tejidos de raíces y tallos de las especies utilizadas. El estudio concluyó que la utilización de plantas acelera la remoción del diesel en el suelo, además es viable para utilizar como tecnología de remediación para suelos contaminados con diesel en la región del subártico.

Adam y Duncan, 2002, estudiaron el desarrollo de la planta de centeno (Lolium multiflorum) y la arveja (Vicia sativa), además se observó la formación de nódulos en las plantas de arveja a diferentes concentraciones de diesel en un suelo (0, 5, 10 y 15 g/kg) con una textura franca. El porcentaje de germinación se obtuvo a los cinco días; la altura de la planta, el largo de la raíz, la biomasa (tallo y raíz) y la remoción de diesel en el suelo fueron medidos después de cuatro meses. A los dos meses, se evaluó el número de nódulos por planta. El experimento se realizó por triplicado para cada concentración de diesel utilizada. Veinte semillas de arveja común y pasto fueron sembradas en ollas de plástico de siete pulgadas, las ollas fueron cubiertas con plástico negro para favorecer la germinación y prevenir que la superficie del suelo perdiera humedad. Después de cuatro días la cubierta se removió. De acuerdo con los resultados obtenidos, el porcentaje de germinación de la arveja y el centeno resultaron muy similares en el control y a una concentración de diesel de 10 g/kg; el porcentaje de germinación disminuyó en el centeno a una concentración de 15 g/kg. La biomasa en el tallo fue mayor para la arveja, a una concentración de 5 a 10 g/kg. La biomasa radicular fue mayor para el centeno en las diferentes concentraciones de diesel. La altura no se vio tan afectada a una concentración entre 5 y 10 g/kg en ambas especies. La remoción de diesel después de cuatro meses fue mayor en la arveja, por lo que esto indicó que la arveja puede ser una especie de planta exitosa para utilizar en la fitorremediación. Los nódulos que se desarrollaron en las diferentes concentraciones de diesel en el suelo de las plantas de arveja presentaron diferencias fisiológicas con respecto al control. La mayoría de los nódulos que se desarrollaron en el control eran esféricos y presentaban estados iniciales de desarrollo, lo que indicó que los nódulos eran inmaduros y que la fijación de nitrógeno atmosférico no fue tan efectiva para las plantas. Los nódulos que se desarrollaron en las plantas que crecieron en suelo contaminado con diesel eran elongados y el tejido de la masa central del nódulo mostró diferentes estados en las células hospederas, además se identificó Rhizobium en forma abundante, en la parte central del nódulo. Los resultados indicaron que a bajas

concentraciones de diesel (5 a 10 g/kg) la presencia de fuente de carbono estimula a la población de microorganismos, permitiendo el establecimiento de las leguminosas.

Quiñones *et al.*, 2003, utilizaron once especies de maíz (MV01 a MV10 y JOR) para evaluar su capacidad de emergencia y crecimiento en suelo contaminado artificialmente a diferentes concentraciones de petróleo crudo en suelo: 0; 15,000, 25,000 y 35,000 mg/kg. A partir del quinto día después de la siembra (DDS), se evaluó el porcentaje de emergencia de las plántulas. Al final del experimento (22 DDS), se evaluaron la altura de las plantas, longitud de la raíz principal, volumen radical, peso seco total, índice de crecimiento en longitud de tallo y raíz e índice de acumulación de biomasa seca. De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó la variación del porcentaje de emergencia en las once especies de maíz, en suelo contaminado a 25,000 mg/kg. La recolección de la especie de maíz MV8 presentó los valores más altos de emergencia (mayor al 80%) en todas las concentraciones de petróleo crudo, las demás especies de maíz presentaron una emergencia mayor a 40% en todas las concentraciones. Estos resultados demostraron el potencial que tiene el maíz para utilizarse para la fitorremediación de suelos agrícolas contaminados con petróleo. Las concentraciones de petróleo a 25,000 y 35,000 mg/kg de suelo favorecieron la emergencia de la semilla de maíz, esto indicó que a concentraciones mayores de 15,000 mg/kg las semillas no se ven afectadas por el efecto tóxico del petróleo. El crecimiento de las plantas de maíz en suelo sin contaminar fue significativamente superior en los seis parámetros a las plantas desarrolladas en las diferentes concentraciones, sin embargo, se observó que las recolecciones de maíz MV6 y MV8 mostraron mayor potencial para utilizarse en este tipo de experimentos. La concentración de petróleo de 25,000 mg/kg suelo favoreció el crecimiento de las plantas de maíz.

Plaza *et al.*, 2004, evaluaron el proceso de biorremediación en el suelo de una refinería contaminado con petróleo; se utilizaron seis especies de plantas: centeno (*Secale cereale* L.), lechuga (*Lactuca sativa*), maíz (*Zea mays*), mastuerzo (*Lepidium sativu*), trigo (*Triticum vulgare*) y repollo (*Brassica oleracea*) para realizar bioensayos basados en la germinación y la elongación de la raíz. Los ensayos se realizaron en cajas Petri, se colocaron 50 g de suelo contaminado, junto con las diferentes semillas, se cubrieron con papel filtro Whatman No. 1,

los resultados se compararon con un control. Las cajas Petri fueron incubadas a 25°C en la obscuridad. Todos los ensayos se realizaron por cuadruplicado. De acuerdo con los resultados de germinación y crecimiento de raíz, la respuesta de fitotoxicidad fue diferente para las seis especies de plantas empleadas; la lechuga resultó ser la más sensible con respecto a su elongación de raíz. En este estudio, la elongación de raíz fue el mejor parámetro indicador de toxicidad en comparación con la germinación de las semillas.

Rivera *et al.*, 2005, realizaron dos ensayos de fitotoxicidad en cuatro leguminosas: guaje (*Leucaena* sp), zarza (*Mimosa pigra*), dormilona (*Mimosa* sp) y chipilín (*Crotalia* sp), en donde se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de petróleo nuevo e intemperizado, en el crecimiento vegetativo (altura medida cada 30 días), en la biomasa total, en el número de nódulos y en la presencia o ausencia de leghemoglobina del nódulo, además se encontraron especies fitoindicadoras de la toxicidad del petróleo en el suelo (índice relativo e índice absoluto) y se identificaron las variables más sensibles de la planta a la toxicidad del petróleo en el suelo. El ensayo 1 se realizó durante 120 días con plantas de la leguminosa chipilín silvestre a diferentes concentraciones de petróleo en el suelo: 150 mg/kg (suelo testigo), 7,500mg/kg, 25,000 mg/kg y 50,000 mg/kg de petróleo nuevo y 79,457 mg/kg de petróleo intemperizado. El ensayo 2 se realizó durante 150 días con plantas de las leguminosas dormilona, guaje y zarza y se evaluaron las concentraciones de 150 mg/kg (suelo testigo), 50,000mg/kg; 100,000 mg/kg y 150,000 mg/kg de petróleo nuevo y 79,457 mg/kg de petróleo intemperizado. En ambos ensayos se realizaron cuatro repeticiones por cada concentración de petróleo utilizada. Para el experimento se colectaron cinco muestras de suelo de textura migajón-arcillosa en dos áreas de Huimanguillo, Tabasco. De acuerdo con los resultados, la mayor reducción en la altura se presentó en las leguminosas dormilona y zarza, donde las plantas no lograron sobrevivir al efecto de la concentración más alta de petróleo (150,000 mg/kg) en el suelo; la planta de guaje fue menos sensible a la exposición de la concentración más alta de petróleo nuevo, ya que sobrevivió a su efecto y creció 13 cm después de 120 días de exposición. La mayor producción de biomasa seca total en las cuatro leguminosas se encontró en el suelo testigo. La especie más sensible fue el chipilín silvestre que disminuyó en seis veces la producción de biomasa a una concentración de 7,500 mg/kg. Las dos especies más tolerantes fueron las leguminosas: guaje y zarza donde a una concentración de 50,000

mg/kg redujo la biomasa total en 31% y 25%, respectivamente. La nodulación fue inhibida en las cuatro leguminosas y se observó que la disminución del número de nódulos aumentó con la mayor concentración de petróleo. La especie más sensible fue el chipilín silvestre que no formó nódulos cuando fue expuesta a una concentración de 50,000 mg/kg. El guaje fue la especie más tolerante a la exposición del petróleo, ya que formó nódulos en concentraciones altas de petróleo nuevo (100,000 mg/kg) e intemperizado (79,457 mg/kg). La zarza aunque tuvo menos infección de rizobios, también fue tolerante al petróleo y la reducción de los nódulos fue menos acentuada que en las otras tres leguminosas. Todos los nódulos de las leguminosas chipilín silvestre, dormilona y zarza establecidos en suelo testigo tuvieron leghemoglobina, en cambio en el guaje el número de nódulos sanos con leghemoglobina disminuyó en 34% (116 a 77 nódulos). Los nódulos localizados en los pelos radiculares de la leguminosa zarza establecida en suelo a 50,000 mg/kg fueron afectados por el petróleo ya que el interior del nódulo fue de color blanco lo que indicó la ausencia de iones de hierro. Las concentraciones mayores de petróleo nuevo (100,000 mg/kg y 150,000 mg/kg) y de petróleo intemperizado (79,457 mg/kg) originaron daños más severos en el nódulo, ya que no se encontró el color característico y el tamaño disminuyó hasta cinco veces respecto al tamaño del nódulo en el suelo testigo. Estos resultados confirman que la formación de nódulos puede ser un indicador confiable utilizado en la evaluación ecotoxicológica de suelos contaminados. Los índices relativos de fitotoxicidad de chipilín silvestre, dormilona y zarza fueron mayores en los tres suelos más contaminados con petróleo nuevo (50,000 mg/kg, 100,000 mg/kg y 150,000 mg/kg), los índices más grandes representan mayor efecto fitotóxico. Los índices absolutos de fitotoxicidad de las cuatro leguminosas mostraron que el efecto del petróleo en el crecimiento y la formación de la biomasa vegetal es directamente proporcional al incremento de la concentración de petróleo. El chipilín silvestre fue la especie más sensible, ya que las concentraciones de 50,000 mg/kg de petróleo nuevo y 79,457 mg/kg de petróleo intemperizado inhibieron el crecimiento vegetativo y consecuentemente la formación de biomasa. La leguminosa dormilona, guaje y zarza fueron más tolerantes al petróleo; la inhibición del crecimiento y de la acumulación de biomasa fue mayor por el efecto de la exposición de 150,000 mg/kg de petróleo nuevo. La inhibición absoluta del crecimiento de formación de tejido y de la nodulación ocurrió en las cuatro leguminosas, dado que no sobrevivieron las plantas al efecto del petróleo. La leguminosa chipilín silvestre fue la especie

más sensible y evidenció mejor la fitotoxicidad originada por el petróleo en el suelo, por lo que podría ser utilizada como especie fitoindicadora de suelos contaminados con petróleo

Juárez (2007) evaluó la eficiencia de degradación de hidrocarburos en suelos contaminados, empleando tres especies de plantas (Cyperus elegans, Cyperus odoratus y Paspalum virgatum) que se han adaptado a las condiciones de contaminación. Se evaluó la tolerancia de las tres plantas en un suelo contaminado con hidrocarburos a una concentración de 221,347 mg/kg. En el caso de C. elegans, para evaluar la dosis de sobrevivencia, se empleó un rango de concentración de 297 a 221,347 mg/kg. Se realizaron diferentes diluciones del suelo contaminado y no contaminado, cuantificando el efecto provocado en las tres especies durante 14 semanas, usando los siguientes parámetros: velocidad de crecimiento, longitud de la parte aérea, longitud radical, peso seco y volumen radical. Se determinó el efecto de la fitorremediación, a nivel de la rizósfera mediante un experimento factorial 5 x 3 en una distribución completamente al azar. Los factores fueron dilución en el suelo (0%, 5%, 10%, 25% y 50%) y tres tipos de plantas (C. elegans, C. odoratus y P. virgatum), con cuatro repeticiones; se realizaron análisis de varianzas para ver diferencias entre tratamientos (ANOVA y Prueba de Tukey (software SPSS v.10). Se utilizó una matriz para establecer la planta más eficiente, utilizando los parámetros antes mencionados. La plantas fueron afectadas por la presencia de hidrocarburos ( $P < 0.05$ ) en la longitud total de la parte aérea, longitud radical, volumen radical y biomasa en peso seco. P. virgatum presentó mayor degradación de hidrocarburos en promedio con un 22.82%, en la dilución 5%. P. virgatum, C.odoratus y C. elegans toleran altas concentraciones de hidrocarburo obteniendo buen crecimiento hasta una concentración de 22,712 mg/kg. La presencia de las plantas favoreció el desarrollo de microorganismos degradadores de hidrocarburos, C. elegans presentó un número considerable de microorganismos degradadores de hidrocarburos asociados a su rizósfera. C. elegans y P. virgatum fueron las más eficientes.

Rivera, 2008, evaluó el efecto del diesel sobre la germinación y desarrollo de dos especies de plantas de alfalfa (Medicago sativa) y de rábano (Raphanus sativus). La experimentación se llevó a cabo en dos etapas, en la primera utilizó un suelo industrial y en la segunda un suelo agrícola. El suelo industrial se colocó en 60 macetas de 2.5 kg distribuidas

en cinco grupos a los que se les aplicó una determinada concentración de diesel (20,000, 35,000, 50,000 y 70,000 mg/kg) además de un control con una mínima concentración de diesel residual (1,243 mg/kg). En la segunda etapa, el suelo agrícola se colocó en 45 macetas y solamente se aplicaron dos concentraciones de diesel (20,000 y 50,000 mg/kg), además de un control sin diesel y sin plantas. Las semillas de alfalfa y rábano se sembraron y una vez germinadas las semillas, se dejaron solamente cinco plantas hasta terminar el experimento. Se tomaron muestras de suelo de las macetas, al inicio y cada mes, para dar seguimiento a ciertos parámetros: como humedad, pH, nitrógeno y fósforo. El tiempo del experimento fue de 56 días para el rábano por tener un ciclo corto y 84 días para la alfalfa. Las plantas se cosecharon, se midieron y pesaron en seco; los resultados se compararon mediante análisis de varianza y pruebas de rango múltiple. De manera paralela se realizaron pruebas de toxicidad en la germinación de las semillas, a nivel de caja Petri, en los dos suelos y con los mismos tratamientos aplicados en el experimento. Los resultados indicaron que el rábano tiene una mayor resistencia a la presencia de diesel que la alfalfa, tanto en la germinación como en el desarrollo de las plantas. Al comparar el comportamiento en los dos suelos, se observó un mayor crecimiento en el suelo industrial que en el agrícola.

## **JUSTIFICACIÓN**

La presencia de hidrocarburos en los suelos puede tener efectos adversos sobre el crecimiento de las plantas, los cuales dependen del tipo de producto derramado, del volumen derramado, del tiempo de exposición, de factores ambientales y de la sensibilidad de los organismos que se vean afectados. De ahí que se han desarrollado ensayos biológicos, enfocados a conocer y evaluar en forma directa los posibles efectos tóxicos o de estimulación de los hidrocarburos sobre los diferentes procesos que llevan a cabo las plantas, como son: la germinación, la formación de la raíz, la emergencia, la formación de follaje, el crecimiento y la formación de frutos, entre otros, además de identificar si los efectos son consecuencia de la absorción de los hidrocarburos. Por lo que la aplicación de ensayos biológicos en suelos que han sido contaminados con hidrocarburos, representa una alternativa para identificar el tipo de afectación.

## CAPITULO IV

### **4 DESARROLLO EXPERIMENTAL**

#### **4.1 Obtención de lotes de suelo**

Se utilizó un lote de 150 kg de suelo contaminado con diesel, correspondiente al recorte de perforación entre 0.5 y 4.5 m de profundidad, extraído de una instalación industrial en la Ciudad de México, que almacena y distribuye combustibles; el suelo presentó una concentración de diesel residual de 1,247 mg/kg, base seca. El suelo fue depositado en una charola de fibra de vidrio, se homogeneizó con ayuda de una pala, y se tamizó a través de una malla de 4 mm para retirar agregados y pequeñas rocas, se cubrió con polietileno de alta densidad para protegerlo de la lluvia.

Como control para comparar el desarrollo de las plantas, se utilizó un suelo no contaminado que se obtuvo de un terreno agrícola de la zona del Ajusco que corresponde a un suelo formado a partir de ceniza volcánica, conocidos como andosoles. Se tomó un lote de suelo de 112.5 kg, que fue extraído de los primeros 30 cm de profundidad; se homogeneizó y se tamizó de la misma forma que se hizo con el suelo industrial.

#### **4.2 Unidades experimentales**

Como unidades experimentales se eligieron macetas de plástico de forma cónica de 21.5 cm de diámetro mayor, 13.7 cm de diámetro menor y 19.6 cm de profundidad, con capacidad para alojar 2.5 kg de suelo.

#### **4.3 Diseño experimental**

Se aplicó un diseño experimental con un arreglo bifactorial, los factores fueron: la concentración de diesel y las variedades de plantas, seis niveles de concentración y dos niveles de variedades de plantas.

Los niveles de concentración de diesel fueron: 20,000, 35,000, 50,000 y 70,000 mg/kg, para las cuales fue necesario adicionar diesel al suelo; el suelo original con una concentración de diesel residual de 1,247 mg/kg, que sirvió como control y el testigo de suelo no contaminado.

Los niveles de variedades de plantas fueron: frijol y jitomate. En total se tuvieron 12 tratamientos. El experimento se llevó a cabo por triplicado, por lo que se utilizaron 36 unidades experimentales.

#### 4.4 Selección de las semillas

Para el estudio se seleccionaron semillas certificadas de frijol de la variedad Strike con 90% de germinación y pureza 99%, tratada con Tharian, apta para la siembra, proveniente de los Estados Unidos y fácil de adaptar a la zona del Bajío de la República Mexicana (Figura IV.1).



*Figura IV.1. Semillas de frijol variedad Strike*

Las semillas certificadas de jitomate corresponden a la variedad Superdada, con 85% de germinación y pureza 99%, con categoría apta para la siembra; también proveniente de los

Estados Unidos. Esta semilla se adapta bien en zonas de templadas a cálidas de la República Mexicana. Es un producto envasado e importado por Casa Treviño (Figura IV.2).



*Figura IV.2. Semillas de jitomate variedad Superdada*

#### **4.5 Condiciones experimentales**

Para ajustar el volumen de diesel por adicionar a cada unidad experimental, con la finalidad de alcanzar el nivel de concentración previamente establecido, se realizaron cálculos tomando en cuenta la densidad del diesel (0.83 g/mL) y la concentración de diesel residual en el suelo original. Este volumen se agregó a cada maceta en forma individual y se mezcló manualmente con ayuda de una cuchara metálica, hasta observar homogeneidad.

Las 36 macetas utilizadas se distribuyeron al azar, se colocaron en el interior de una charola fabricada de fibra de vidrio; se acondicionó una sombra de plástico transparente para protegerlas de la lluvia. El experimento se realizó durante el periodo de primavera a verano (Figura IV.3).



*Figura IV.3. Montaje del experimento*

#### **4.6 Siembra de las semillas y desarrollo de las plantas**

Se colocaron 10 semillas de frijol en cada maceta, a una profundidad de 2 cm, la distancia entre una semilla y otra fue de 5 cm. Por lo que respecta a las macetas asignadas para sembrar jitomate se sembraron 20 semillas al voleo en cada maceta a una profundidad de 1 cm.

A los 15 días de haberse establecido las plántulas de ambas especies, se eligieron cinco ejemplares de cada maceta para dar seguimiento a su crecimiento. El periodo de cultivo fue de junio a septiembre.

La humedad del suelo se mantuvo en 30% y 40%, proporción sugerida para el desarrollo óptimo de las plantas (Zegarra, 2000; Domínguez, 2001). A cada maceta se le agregaron entre 100 y 200 mL de agua una vez al día.

Se tomó la temperatura ambiental tres veces al día, con un termómetro ambiental (por la mañana entre 9 y 10 h, por la tarde entre 14 y 15 h y por la noche entre 18 y 19 h).

#### **4.7 Cosecha de las plantas**

Debido a la diferencia en el desarrollo de las plantas seleccionadas, se decidió su recolección a los 84 días; para frijol el ciclo llegó hasta la obtención de fruto ejotero y para el jitomate llegó a la floración. Las plantas que sobrevivieron se sacaron de las macetas y se colocaron en bolsas de plástico de 20 cm de largo por 5 cm de ancho, posteriormente se enjuagaron en agua destilada para eliminar los residuos de suelo y se evaluó la productividad a través de la determinación de parámetros que son: longitud de tallo, longitud de raíz, número de hojas, presencia de flor y presencia de fruto. Se obtuvo un registro de todas las observaciones.

Para obtener la biomasa de las plantas, se colocaron en bolsas de papel de estraza y se secaron a 105°C durante dos días, hasta asegurar peso constante; se utilizó una balanza analítica marca OHAUS.

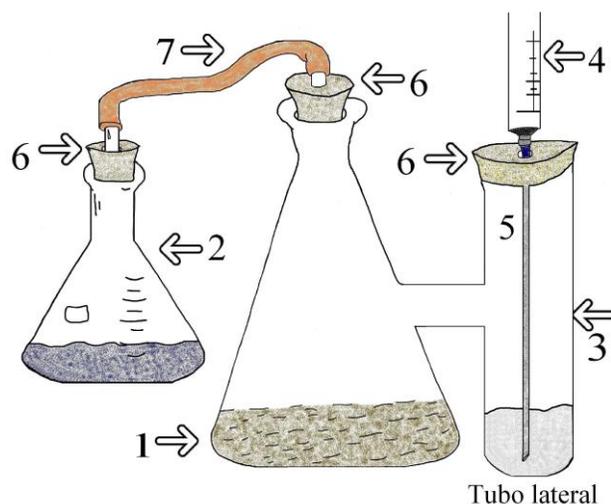
#### **4.8 Prueba de toxicidad en la germinación de las semillas in vitro**

De manera independiente, se llevó a cabo una prueba de germinación para conocer el efecto fitotóxico del diesel residual en el proceso de germinación de las semillas de frijol y de jitomate. Se utilizaron cajas Petri con suelo con las diferentes concentraciones de diesel y se sembraron 100 semillas. Se utilizó el suelo industrial con una concentración de diesel residual de 1,247.36 mg/kg, al cual se le adicionó la cantidad de diesel necesaria para dar las mismas concentraciones que se utilizaron en las macetas (20,000, 35,000, 50,000 y 70,000 mg/kg). La prueba se realizó por triplicado y los resultados obtenidos fueron comparados con el suelo control. El experimento se realizó durante una semana, a temperatura ambiente y las cajas mantuvieron una humedad al 30% aproximadamente.

## 4.9 Determinación de la producción de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como indicador de actividad microbiana

Para llevar a cabo la determinación de la producción de bióxido de carbono y con la finalidad de detectar el efecto que tiene el diesel sobre la actividad microbiana, se realizó otro experimento en donde se utilizó el suelo industrial a cuatro concentraciones de diesel (10,000, 20,000, 30,000 y 40,000 mg/kg diesel en el suelo), y se comparó con la concentración de diesel residual (1,247.36 mg/kg).

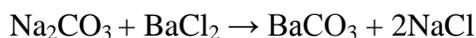
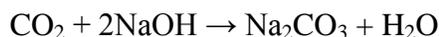
La técnica utilizada del matraz Bartha-Pramer (1965) permite medir de forma sencilla la actividad microbiana en el suelo bajo las condiciones de incubación en un matraz biométrico. Para el experimento, se pesaron 50 g de suelo a las diferentes concentraciones de diesel y se depositaron en el compartimento de oxidación de cada matraz; la humedad del suelo se ajustó a 60%. Cada concentración se realizó por triplicado, en total se usaron 15 matraces. Una vez ajustada la humedad en la muestra, se colocaron 6 mL de agua en un matraz Erlenmeyer y este se unió al matraz biométrico por medio de manguera para que la muestra conservara su humedad. Seguido de esto, se adicionaron 10 mL de NaOH a 0.5N en el tubo anexo al matraz (trampa para CO<sub>2</sub>) y se cerró el sistema con tapones de goma (Figura IV.4).



**Figura IV.4.** 1) matraz biométrico con muestra de suelo contaminado. 2) matraz Erlenmeyer con agua. 3) trampa alcalina (solución de NaOH) 4) jeringa para retirar solución saturada y reponer solución nueva. 5) tubo capilar. 6) tapones de goma. 7) manguera de latex.

Los matraces biométricos se incubaron a temperatura ambiente durante 32 días y se taparon con aluminio para protegerlos de la luz. Cada 48 horas, se extrajo la solución de NaOH 0.5N del tubo lateral con una jeringa de 20 mL y se transfirió a un matraz Erlenmeyer de 250 mL al cual se le colocó un tapón de hule y se conservó hasta el momento de la titulación. Con otra jeringa limpia, se introdujo otra alícuota de 10 ml de solución nueva de NaOH 0.5N en el tubo lateral del matraz biométrico y se tapó de nuevo. Este procedimiento se siguió durante los 32 días.

Las reacciones involucradas fueron: el CO<sub>2</sub> que se produjo como resultado de la actividad microbiana se fijó en la solución de hidróxido de sodio, para formar Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>; a la solución residual se le adicionaron 4 mL de solución de BaCl<sub>2</sub> para precipitar el carbonato y la sosa que no se utilizó se tituló con una solución de HCl 0.1N previamente valorada. Como indicador se utilizó la fenolftaleína. Se tituló un blanco que proporcionó el valor de referencia para calcular el CO<sub>2</sub>.



Para calcular los mg de CO<sub>2</sub> se utilizó la siguiente fórmula:

$$(\text{Vol. gastado de HCl en la titulación del blanco}) - (\text{Vol. de HCl gastado en la titulación de NaOH residual}) = \text{Vol. de NaOH convertido en Na}_2\text{CO}_3$$

$$(\text{Vol. de NaOH convertido en Na}_2\text{CO}_3) \times \text{HCl} \times 22 = \text{mg de CO}_2$$

Al observar y registrar que no había un aumento en los mg de CO<sub>2</sub> obtenidos en la actividad microbiana durante los primeros días, se decidió adicionar un estímulo; en este caso se le adicionaron 0.3 g de sacarosa a cada matraz biométrico en las diferentes concentraciones de diesel y sus respectivas repeticiones; la adición de sacarosa se realizó después de obtener la alícuota de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> y antes de agregar la nueva solución de NaOH en el tubo lateral.

Para realizar los cálculos se utilizaron las curvas acumulativas de CO<sub>2</sub> producido que se obtuvieron para las diferentes concentraciones de diesel, se graficaron contra el tiempo y se compararon antes y después de los 16 días. Los resultados se compararon con la actividad de los microorganismos en el suelo original que contenía diesel residual.

#### 4.10 Seguimiento de las características del suelo

Con la finalidad de conocer la variación de los parámetros físicos y químicos de los suelos en los que crecieron las plantas, se tomaron muestras compuestas obtenidas de los espacios disponibles de la superficie de la maceta hasta 5 cm de profundidad, evitando maltratar las plantas y sus raíces. Las muestras se colocaron en frascos de vidrio de 50 g con tapa hermética y contratapa de teflón, se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su análisis (Figura IV.5).

Al inicio del experimento se determinaron: color; materia orgánica; carbono orgánico; textura; capacidad de retención de agua; porcentaje de humedad total; pH; densidad aparente y real; porosidad; fósforo en forma de fosfatos, nitrógeno total, y diesel residual.

En las muestras correspondientes a los 28, 56 y 84 días se determinaron: pH; fósforo en forma de fosfatos nitrógeno total y diesel residual. A continuación se describen los métodos analíticos que se aplicaron.



*Figura IV.5. Toma de muestras de suelo para determinar parámetros fisicoquímicos.*

**Contenido de humedad.** Se evaluó por método gravimétrico. El método se basa en la determinación de la cantidad de agua que contiene una muestra de suelo expresada en gramos. La determinación de la masa de agua se realiza por la diferencia en peso, entre la masa de suelo húmedo y la masa de suelo seco. Se considera como suelo seco aquel que fue secado en estufa a 105° C hasta obtener un peso constante (NOM-021-RECNAT-2003/AS-05). El secado se realizó en cápsulas de porcelana en un horno marca Felisa modelo 243.

**Capacidad de retención de agua.** Se determinó por saturación del suelo con agua y drenado por gravedad. Se colocó un embudo de vidrio de 17 cm de diámetro dentro de un vaso de precipitados. En el embudo se colocó papel filtro y se llenó con 10 g de suelo. Al suelo se le agregó una cantidad de agua conocida y se dejó drenar; el volumen obtenido se midió y la diferencia de estos valores obtenidos indicó la retención de agua en el suelo. El valor obtenido se utilizó para realizar el ajuste de humedad en el suelo al 30% (Carter, 1993).

**Densidad real ( $\rho_m$ ).** Se determinó por el método del picnómetro. La densidad real de un suelo puede ser calculada a partir del conocimiento de dos parámetros: la masa y el volumen de una cierta cantidad del suelo. La masa es determinada pesando directamente el suelo y el volumen de manera indirecta por el cálculo de la masa y la densidad del agua (o cualquier otro fluido) desplazado por la muestra del suelo (NOM-021-RECNAT-2003/AS-04). La densidad real se determinó en picnómetros de vidrio de 25 mL. Se usó una balanza analítica OHAUS 110.

La densidad real se determinó mediante la fórmula:

$$\rho_m = S / (S + A) - (s + a)$$

donde:

S = peso del suelo

A= peso del agua

s + a = peso del suelo y agua mezclados.

**Densidad aparente ( $\rho_p$ ).** Se utilizó el método de la probeta (Baver, 1956). Se calculó con la siguiente fórmula:

$$\rho_p = \text{Peso del suelo (g)} / \text{Volumen (cc)}$$

**Porosidad.** Se obtuvo por cálculo a partir de la densidad aparente y la densidad real mediante la ecuación:

$$\% \text{ porosidad} = 1 - (\rho_m / \rho_p) \times 100 \text{ (Carter, 1993)}$$

**Color del suelo.** En una placa de porcelana se colocó suelo seco y se comparó con las tablas de color Munsell.

**Textura.** Se determinó mediante el método del Hidrómetro de Bouyoucos (1951), empleando las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ de limos} + \% \text{ arcillas} = \text{primera lectura} \times 100 / \text{g de suelo}$$

$$\% \text{ de arena} = 100 - (\% \text{ de limos} + \% \text{ de arcillas})$$

$$\% \text{ de arcillas} = \text{segunda lectura} \times 100 / \text{g de suelo}$$

$$\% \text{ de limo} = (\% \text{ de limos} + \% \text{ arcillas}) - (\% \text{ de arcilla})$$

**pH del suelo medido en agua.** Se pesaron 10 g de suelo en un vaso de precipitado y se adicionaron 20 mL de agua destilada. Relación 1:2. Con una varilla de vidrio se agitó la muestra de suelo: agua a intervalos de 5 minutos, durante 30 minutos. La mezcla se dejó reposar durante 15 minutos y se tomaron las lecturas al término de este tiempo. Las soluciones de referencia fueron pH 4.00, 7.00 y 10.00; estas soluciones deben estar a temperatura ambiente al momento de calibrar el medidor de pH (NOM-021-RECNAT-2003/AS-02). Se empleó un potenciómetro marca Hanna HI9023C pH/mV/°C con electrodo de vidrio.

**Materia orgánica.** Se determinó por el método de Walkler y Black (NOM-021-RECNAT-2003/AS-07). La determinación de la materia orgánica del suelo se evaluó a través del contenido de carbono orgánico por medio de una disolución de dicromato de potasio y el calor de reacción que se genera al mezclarla con ácido sulfúrico concentrado. Después de cierto tiempo de espera, la mezcla se diluye, se adiciona ácido fosfórico para evitar interferencias de  $\text{Fe}^{3+}$  y el dicromato de potasio residual es valorado con sulfato ferroso. Con este

procedimiento se detecta entre un 70% y 84% del carbono orgánico total por lo que es necesario hacer una corrección; para los suelos de México se recomienda aplicar un factor de corrección 1.298 (1/0.77), según lo indicado por la NOM-021-RECNAT-2003/AS-07.

La materia orgánica se obtuvo a partir de la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Carbono orgánico} = (B-T/g) \times N \text{ real} (0.39) \text{ mcf}$$

donde:

B = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar el blanco de reactivos (mL)

T = volumen de sulfato ferroso gastado para valorar la muestra (mL)

N = normalidad real del sulfato ferroso

g = peso de la muestra empleada (g)

mcf = factor de corrección de la humedad

$$\% \text{ Materia orgánica} = \% \text{ C orgánico} \times 1.724$$

**Nitrógeno total.** Se utilizó el método de análisis por combustión o método Dumas (1826). El análisis consiste en la combustión de la muestra a 1800°C y los gases producidos en la combustión son oxidados y reducidos en un reactor de cuarzo y catalizadores; los gases son separados por cromatografía y cuantificados. Esta técnica se realizó en el laboratorio Ingeniería Creativa S.A. de C.V. (ICREA).

**Fósforo disponible.** Se evaluó por el método Olsen para suelos alcalinos y calizos con un pH mayor a 8, que emplea como solución extractora, una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) 0.5 N. En el caso del suelo agrícola (control) se utilizó el método de Bray I para suelos neutros, el cual emplea una solución de fluoruro de amonio (NH<sub>4</sub>F) y HCl 0.25 N como solución extractora.

**Concentración de diesel.** Se determinó por el método EPA 8015 por cromatografía de gases (USEPA, 1996). Las muestras fueron analizadas por Laboratorios ABC Química Investigación y Análisis, S.A. de C.V.

#### **4.11. Procesamiento de la información**

Con los datos obtenidos para evaluar la productividad de las plantas, los parámetros físicos y químicos del suelo y la producción de CO<sub>2</sub> como indicador de la actividad microbiana, se realizaron Análisis de Varianza (ANDVA) con la finalidad de determinar si existían diferencias significativas entre las variables y las distintas condiciones. En los casos que se encontraron diferencias significativas entre grupos basadas en las medianas de cada tratamiento, se aplicó la prueba de Tukey.

Para la prueba de toxicidad en la germinación de semillas de frijol y jitomate los datos se expresaron como porcentajes; por regla general, tales datos tienen una distribución binomial, en vez de una distribución normal. Por lo tanto en este estudio se realizó la transformación arcoseno para llevar este tipo de datos a una distribución normal (Little y Hills, 1976).

## CAPITULO V

### 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 5.1. Análisis fisicoquímico de las muestras de suelo industrial y control iniciales

Con la finalidad de conocer las características de los suelos, se realizó el análisis fisicoquímico de las muestras. Los resultados que se resumen en la Tabla V.1, se presentan a continuación, haciendo mención si las condiciones eran aptas para la siembra de semillas de frijol y jitomate.

El color es una característica que permite identificar si un suelo es o no fértil, ya que está influido por el porcentaje y tipo de materia orgánica, así como por la presencia de algunos minerales oxidados (Aguilera, 1989). En este estudio, la coloración del suelo control fue parda y la del suelo industrial fue parda grisácea; ambos suelos se consideran fértiles.

El porcentaje de materia orgánica en el suelo control fue de 3.58% y corresponde a *un valor alto* (NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-07). El suelo industrial, con un contenido de materia orgánica de 2.90% corresponde a *un valor medio* (NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-07). El contenido de carbono orgánico, que se calcula a partir de la materia orgánica fue de 2.08% para el suelo control y de 1.71% en el suelo industrial.

De acuerdo con los criterios de clasificación de textura USDA, el suelo control fue franco arenosa; el porcentaje de arenas fue *alto* (68.5%) comparado con el de arcillas fue *bajo*. (8.5%); a pesar del alto contenido de arenas, presenta suficiente limo y arcilla que le confiere un poco de cohesión (Aguilera, 1989; NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-09).

El suelo industrial presentó una textura franco limosa; el mayor porcentaje fue de limos (47%) y el menor porcentaje fue de arcilla (16%); este suelo tiene una cantidad moderada de granos finos de arena y solamente una pequeña cantidad de arcilla ( NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-09). La función que desempeña cada tipo de partícula en el suelo es importante por ejemplo: la presencia de limos favorece la retención de agua, la porción de arenas permite la transferencia de fluidos y garantiza una adecuada aireación, la presencia de arcillas son un potente adsorbente de los cationes tanto orgánicos como inorgánicos y posibilitan el intercambio catiónico en el suelo, además éstas proporcionan una mayor capacidad de retención de agua (Aguilera y Martínez, 1996). La textura de los suelos empleados es adecuada para el desarrollo óptimo de las plantas y microorganismos ya que son suelos permeables al aire y al agua.

En cuanto a la capacidad de retención de agua, el suelo control presentó un valor de 800 ml/kg y el suelo industrial de 600 ml/kg. Ambas cifras corresponden a una buena capacidad de retención de agua, situación que favorece el desarrollo de bacterias y el crecimiento de las plantas (Frankenberger, 1992).

La humedad de ambos suelos fue relativamente baja, 21.3% para el suelo control y 15.1% para el suelo industrial, por lo tanto ésta se ajustó al 30% al inicio del experimento ya que un suelo saturado de agua no permite el intercambio de oxígeno para que se lleve a cabo el metabolismo aerobio de los microorganismos y el desarrollo de las plantas, para un desarrollo óptimo se recomienda mantener la humedad del suelo entre el 30 y 40% (Zegarra, 2000; Domínguez, 2001). El agua del suelo afecta no solamente a la humedad disponible para la actividad metabólica de los microorganismos presentes, sino también el estado de aireación, la cantidad de materiales solubles y el pH del suelo.

El valor de pH del suelo control fue *neutro*, de 7.18 (NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-02), este valor se consideró adecuado para el desarrollo de los microorganismos en el suelo y el desarrollo óptimo de las plantas (Pelkzar *et al.*, 1982).

El suelo industrial presentó un pH de 9.26, considerado como *fuertemente alcalino* (NOM-021-SEMARNAT-2000-AS-02). La alcalinidad en un suelo se presenta cuando existen sales, especialmente de calcio, magnesio y sodio, en forma de carbonatos (Aguilera, 1989). Aunque se ha visto que valores de pH del suelo superiores a 8.5 disminuyen la actividad microbiana (Dibble y Bartha, 1979), la disponibilidad de micronutrientes y la degradación de los hidrocarburos (Porta, 1994), no se consideró necesario modificar el pH encontrado en este estudio, ya que la presencia de contaminantes orgánicos (como el diesel) favorecen la acidificación del suelo siempre y cuando la actividad microbiana no se inhiba (Bossert y Bartha, 1984; Block *et al.*, 1991, Munguía y Martínez, 1991 en SEMARNAP, 1996). Con la adición del diesel al suelo se esperaba que el pH disminuyera, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos a partir de su degradación (Munguía y Martínez, 1991 en SEMARNAP, 1996).

La densidad aparente está relacionada con la compactación del suelo y permite inferir las dificultades para la emergencia y el enraizamiento de las plantas así como la circulación del agua y el aire (Porta *et al.*, 1994). En este estudio, se encontró que la densidad aparente del suelo control fue ligeramente mayor ( $0.99 \text{ g cm}^{-3}$ ) a la del suelo industrial ( $0.89 \text{ g cm}^{-3}$ ); se ha visto que cuando la densidad aparente tiene un valor de  $1.5 \text{ g cm}^{-3}$ , el desarrollo radical de las plantas y la penetración de agua en el suelo se ven limitados de manera significativa (Thompson y Troeh, 1982). En este caso los suelos empleados presentaron valores de densidad aparente favorables para el desarrollo de las plantas. La densidad real del suelo control fue de  $2.44 \text{ g cm}^{-3}$  y el suelo industrial presentó un valor de  $2.63 \text{ g cm}^{-3}$ .

La porosidad en el suelo es un parámetro importante que determina la provisión de agua y oxígeno, que inciden sobre el crecimiento de las plantas y la tasa de movimiento del agua en el suelo (Aguilera, 1989). El porcentaje de porosidad, que se obtuvo a partir de la relación entre las densidades real y aparente en el suelo control fue de 59% y en el suelo industrial de 67%; estos valores se consideraron adecuados en ambos suelos.

El contenido de fosfatos fue de 27.67 mg/kg para el suelo control y de 98.81 mg/kg para el suelo industrial, estos valores se consideran adecuados para el desarrollo de los microorganismos y las plantas.

El contenido de nitrógeno total en el suelo control fue de 927.19 mg/kg, mientras que en el suelo industrial de 719.67 mg/kg, estas cifras caen dentro de la categoría *regular* (Vázquez y Bautista, 1993) por lo que se consideró adecuada.

Debido a que las concentraciones de fosfatos y de nitrógeno total fueron adecuadas no fue necesario adicionar algún fertilizante a los suelos para permitir el desarrollo de las plantas.

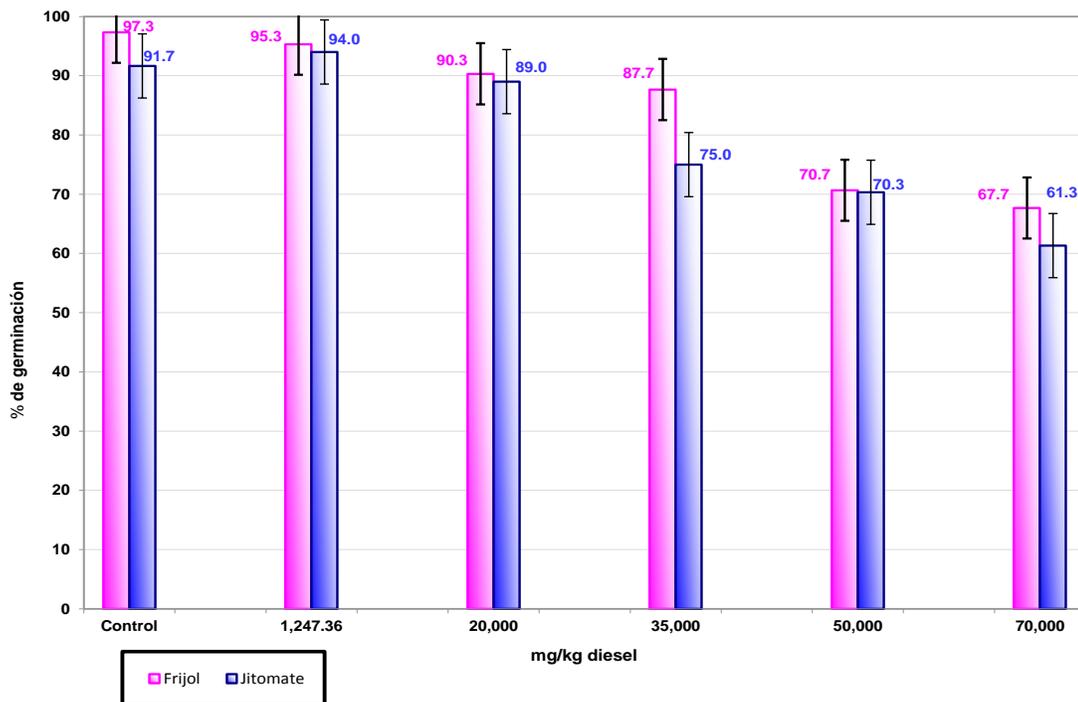
**TABLA V.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS SUELOS EMPLEADOS**

PARÁMETRO	Suelo Control	Suelo Industrial
<b>Color</b>	Pardo (10 YR 5/3)-seco	Pardo grisáceo (2.5Y 5/2)-seco
<b>Materia orgánica</b>	3.58 %	2.90 %
<b>Carbono orgánico</b>	2.08 %	1.71 %
<b>Textura</b>	Franco arenoso	Franco limosa
	Arena: 68.5% Limo: 23% Arcilla: 8.5%	Arena: 37% Limo: 47% Arcilla: 16%
<b>Capacidad de retención de agua</b>	800 lt/ton	600 lt/ton
<b>Humedad total</b>	21.3%	15.1%
<b>pH</b>	7.18	9.26
<b>Densidad aparente</b>	0.99 g·cm <sup>-3</sup>	0.89 g·cm <sup>-3</sup>
<b>Densidad real</b>	2.44 g·cm <sup>-3</sup>	2.63 g·cm <sup>-3</sup>
<b>Porosidad</b>	59%	67%
<b>Fósforo en forma de fosfatos</b>	27.67 mg/kg	98.81 mg/kg
<b>Nitrógeno total</b>	927.19 mg/kg	719.67 mg/kg
<b>Diesel residual</b>	-	1247.36 mg/kg

Se incluye también en la tabla V.1 la concentración del diesel residual del suelo industrial que fue de 1,247.36 mg/kg.

## 5.2. Evaluación de la germinación de semillas de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en el suelo

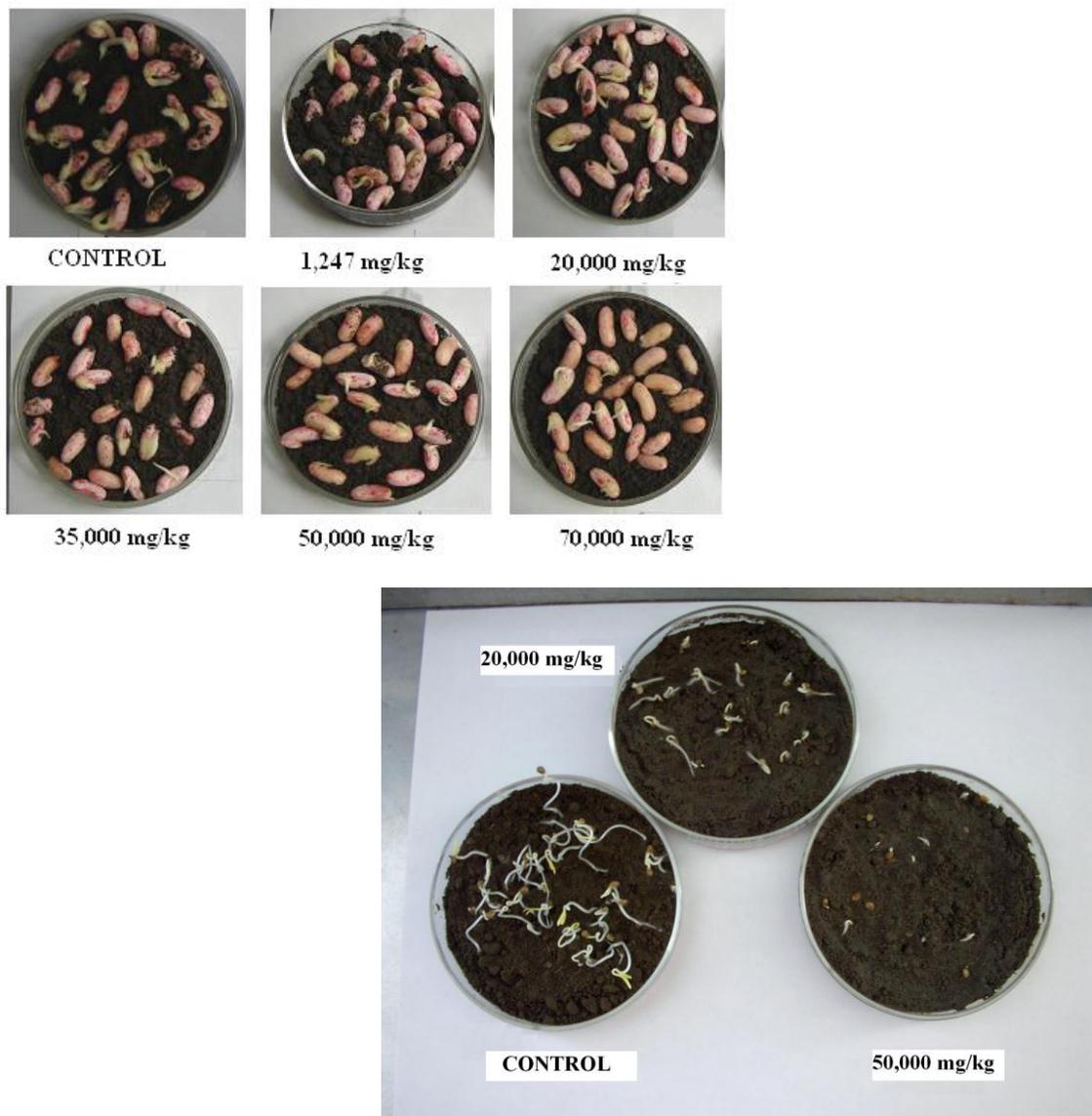
En la Figura V.1 se presenta los porcentajes de germinación obtenidos. Para el frijol, el porcentaje de germinación más alto se presentó con el suelo control (97.3%), y en la concentración de diesel más baja, de 1,247.36 mg/kg (95.3%). Lo mismo sucedió para el jitomate, con el porcentaje de germinación más alto de 91.7%, en el suelo control, y en la más baja concentración de diesel de 1,247.36 mg/kg (94.0%). Los porcentajes de germinación obtenidos para ambas plantas en el suelo control y la concentración de diesel de 1,247.36 mg/kg, son valores muy cercanos. Lo anterior indica que en las zonas expuestas a una baja contaminación con hidrocarburos, algunos cultivos pueden ser sembrados con éxito (Châneau *et al.*, 1997).



*Figura V.1. Porcentaje de germinación de semillas de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo*

Comparando ambas plantas, el frijol resultó tener mayor porcentaje de germinación que el jitomate pero no es una diferencia significativa.

En la Figura V.2 se muestran las fotografías de la germinación de frijol y jitomate en suelo contaminado a diferentes concentraciones de diesel, donde se observó la disminución de la germinación al aumentar la concentración de diesel en el suelo.



*Figura V.2 Prueba de germinación para frijol y jitomate en suelo contaminado a diferentes concentraciones de diesel.*

De acuerdo con los análisis de varianza (ANDVA) que se realizaron utilizando los valores previamente transformados en arcoseno, se encontró que en ambas plantas sí existe una diferencia significativa en el porcentaje de germinación obtenido entre las diferentes concentraciones de diesel en el suelo ( $F_{(5, 12)} = 83.91$ ; Anexo I) y jitomate ( $F_{(5, 12)} = 78.16$ ; Anexo II). Por lo que se concluye que las concentraciones de diesel en el suelo sí afectaron el proceso de germinación de las semillas de frijol.

La prueba de Tukey realizada para las semillas de frijol indicó la presencia de tres grupos. En el primer grupo formado por el control y la concentración inicial de diesel de 1,247.36 mg/kg, el porcentaje de germinación no se vio afectado por la presencia de éste. El segundo grupo formado por la concentración de diesel de 20,000 y 35,000 mg/kg presentó una diferencia significativa con respecto al primer grupo por lo que la presencia del contaminante sí inhibió el proceso de germinación. Y en el tercer grupo formado por las pruebas a 50,000 y 70,000 mg/kg presentó una diferencia significativa con respecto al primero y segundo grupo, por lo que el efecto tóxico del hidrocarburo fue mayor en las concentraciones más altas y disminuyó el porcentaje de germinación (Anexo III). En conclusión, el porcentaje de germinación se vio afectado por el aumento en la concentración del contaminante a partir de la concentración de 20,000 mg/kg. Paez (2000) obtuvo un porcentaje de germinación del frijol (*Phaseolus vulgaris*) de 30%, en un suelo contaminado con 1.5% de hidrocarburos del petróleo. Chaîneau (1997) por su parte, encontró que las semillas de frijol resultaron ser más resistentes a la presencia de gasolina en el suelo. Sin embargo, no se encontraron estudios con diesel.

Para las semillas de jitomate, la prueba de Tukey mostró cinco grupos. El primer grupo formado por el control y por la concentración de 1,247.36 mg/kg es el grupo que no se vio afectado por la presencia de diesel en el suelo. El segundo, tercero, cuarto y quinto grupo corresponden a las concentraciones de 20,000 mg/kg, 35,000 mg/kg, 50,000 mg/kg y 70,000 mg/kg respectivamente; lo que indicó que la inhibición del porcentaje de germinación de las semillas de jitomate sí se vio significativamente afectado al aumentar la concentración del hidrocarburo (Anexo IV), a partir de la concentración de 20,000 mg/kg.

Domínguez (2001) realizó pruebas de germinación con semillas de jitomate en un suelo de tipo industrial que fue contaminado con diesel y encontró que las semillas de jitomate fueron muy sensibles a concentraciones superiores a 20,000 mg/kg. En ambas semillas disminuyó el porcentaje de germinación afectadas de forma significativa a partir de una concentración de diesel en suelo de 20,000 mg/kg.

La germinación de la semilla se pudo haber inhibido por:

- ✓ La fracción volátil de diesel, que son hidrocarburos de bajo peso molecular y parcialmente solubles en agua capaces de penetrar fácilmente a la membrana celular de las plantas (Van Overbeek y Blondeau, 1954).
- ✓ El diesel en el suelo que forma una película alrededor de la semilla y reduce su capacidad de almacenar agua y oxígeno.
- ✓ Las semillas son capaces de adsorber contaminantes de origen orgánico, esto puede ocurrir antes o después de iniciada la germinación. La adsorción de los contaminantes en la superficie de las semillas, aumenta la posibilidad de absorción, la cual tiene lugar por procesos no metabólicos cuando la semilla es embebida en agua a través de procesos de difusión (Pierzynski *et al.*, 1994).

La tolerancia de las semillas al diesel, se debe principalmente a su cubierta ya que su estructura y dureza evita la penetración de diesel y reduce la velocidad de penetración de éste (Amakiri y Onofeghara, 1984). Aunque, el daño al embrión no es fatal en algunos casos, reduce la actividad metabólica la cuál resulta en el retraso de la germinación. Adam y Duncan (2002) también han demostrado que a concentraciones bajas de diesel, en las semillas de diferentes especies y subespecies se observó la reducción en el porcentaje de germinación y la inhibición de la germinación se incrementó al aumentar la concentración de diesel en el suelo.

## **5.3. Evaluación de la productividad de las plantas de frijol y jitomate**

### **5.3.1. ALTURA DE TALLO**

Las pruebas en plantas han sido desarrolladas para asegurar la limpieza del sitio o para evaluar la compatibilidad de sitios remediados (Wang, 1991). La OCDE, la EPA y la FDA han diseñado guías de prueba para determinar los posibles efectos de sustancias químicas en estadíos tempranos del desarrollo en una planta y en su crecimiento vegetativo. Las guías recomiendan ciertos parámetros para evaluar los efectos de las sustancias tóxicas en las plantas como la altura de tallo; mediante esta prueba se puede evaluar de forma cuantitativa el grado de afectación que desarrolla una planta en presencia de un contaminante. En este estudio, se presentan los valores promedios de la altura de los tallos obtenidos al final del experimento, de cada maceta y de cada repetición efectuada. Para realizar los análisis estadísticos, se compararon las concentraciones donde si hubo sobrevivencia.

Para ambas plantas, la mayor elongación de tallo se obtuvo en los controles y en las concentraciones de 1,247.36 mg/kg. La planta de frijol no sobrevivió a lo largo del experimento en la concentración de 20,000 mg/kg debido a que el suelo presentó una mayor compactación, ocasionando poca disponibilidad de oxígeno, nutrientes, acumulación de agua y la pudrición de las plantas. En las concentraciones de 50,000 mg/kg y 70,000 mg/kg las plantas no emergieron debido seguramente a la toxicidad del diesel en el suelo (Tabla V.2).

La disminución de la altura del tallo con el aumento de la concentración de diesel en el suelo fue notoria en ambas plantas.

**Tabla V.2. Longitud promedio de tallo en la planta de frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo**

Concentración de diesel (mg/kg)	Altura tallo en frijol (cm)	Altura de tallo en jitomate (cm)
<b>Control</b>	7.4±1.0	5.7±1.1
<b>1,247.36</b>	7.2±0.7	3.8±0.6
<b>20,000</b>	no sobrevivieron	1.6±0.4
<b>35,000</b>	5.4±1.8	1.3±0.3
<b>50,000</b>	no sobrevivieron	no sobrevivieron
<b>70,000</b>	no sobrevivieron	no sobrevivieron

Los análisis de varianza realizado para determinar si hubo diferencias significativas en la altura del tallo alcanzada por las plantas de frijol ( $F_{(2, 31)} = 7.29$ ; Anexo V) y jitomate ( $F_{(3, 38)} = 83.42$ ; Anexo VI), crecidas en diferentes concentraciones de diesel en el suelo, indicó que sí hubo diferencia significativa, por lo que las plantas sí se vieron afectadas en la altura del tallo.

La prueba de Tukey realizada para la planta de frijol (Anexo VII) mostró la formación de dos grupos; en el primer grupo, control y la concentración de 1,247.36 mg/kg indicó que la presencia de diesel residual no afectó la altura del tallo en la planta. En el segundo grupo, el desarrollo de la elongación del tallo fue menor y sí se vio afectado de forma significativa a una concentración de 35,000 mg/kg de diesel en el suelo. Al igual que en este estudio, Paez (2000) evaluó el desarrollo del tallo en el frijol (*Phaseolus vulgaris*) en suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo y encontró también un efecto negativo en el desarrollo de la altura del tallo a partir de la dilución de 1.5%.

En la planta de jitomate la prueba de Tukey mostró dos grupos, el primer grupo formado por el control; en el segundo grupo formado por las concentraciones de 1,247.36; 20,000 y 35,000 mg/kg, la altura del tallo disminuyó por el efecto de la concentración de diesel en el suelo (Anexo VIII).

En ambas plantas se observó que el tamaño del tallo disminuyó con el aumento de las concentraciones de diesel en el suelo.

### 5. 3. 2. LONGITUD DE RAIZ

La prueba de elongación de la raíz es otro parámetro de evaluación de toxicidad que permite ver el efecto de contaminantes en el desarrollo de las plantas (ISO 11269-1). En este estudio, la longitud promedio más larga de raíz fue la que se obtuvo en los controles de ambas plantas (Tabla V.3).

**Tabla V.3. Longitud promedio de raíz en frijol y jitomate a diferentes concentraciones de diesel en suelo**

Concentración de diesel (mg/kg)	Longitud promedio de raíz en frijol (cm)	Longitud promedio de raíz en jitomate (cm)
<b>Control</b>	26.2±9.2	18.6±4.0
<b>1,247.36</b>	6.1±0.6	2.8±0.4
<b>20,000</b>	no sobrevivieron	1.3±0.7
<b>35,000</b>	5.2±1.2	0.9±0.1
<b>50,000</b>	no sobrevivieron	no sobrevivieron
<b>70,000</b>	no sobrevivieron	no sobrevivieron

El frijol normalmente presenta raíces bien desarrolladas, con una raíz principal y raíces secundarias ramificadas, cercanas de la superficie que presentan nódulos donde se encuentran las bacterias simbióticas que fijan el nitrógeno del aire. En las planta de frijol utilizadas en este estudio, se observó este mismo desarrollo en el control y a una concentración de 1,247.36 mg/kg de diesel en el suelo; además de la presencia de nódulos (Figura V.3). Paez (2000) también encontró una disminución en el tamaño de la raíz de frijol, debido a la presencia de hidrocarburos en el suelo.



**Figura V.3. Desarrollo de raíces y nódulos en la planta de frijol a los 84 días**

En las plantas de jitomate normalmente se desarrolla una raíz principal y raíces secundarias. En este estudio, las plantas de jitomate presentaron raíces de fibras muy cortas que se desarrollaron muy cerca de la superficie, lo que indicó que las raíces encontraron un drenaje pobre en el suelo donde los niveles del oxígeno son muy bajos para crecer, ya que el suelo se compactó debido a la presencia de diesel (Chaîneau *et al.*, 1997; Paez, 2000; Adam y Duncan, 2002) (Fig. V.4).



**Figura V.4. Desarrollo de la raíz en la planta de jitomate a los 84 días**

El análisis de varianza realizado, indicó que sí existen diferencias significativas en la longitud de la raíz alcanzada por las plantas de frijol ( $F_{(2, 19)} = 27.48$ ; Anexo IX) y de jitomate ( $F_{(3, 33)} = 122.12$ ; Anexo X), la presencia de diesel en suelo a diferentes concentraciones de diesel, sí afectó el desarrollo de las raíces.

La prueba de Tukey realizada para la planta de frijol formó dos grupos, el primer grupo fue el control y el segundo grupo formado por la concentración de 1,247.36 mg/kg y 35,000 mg/kg (Anexo XI). Para la planta de jitomate la prueba también mostró dos grupos; el primero formado por el control y el segundo formado por las concentraciones de 1,247.36, 20,000 y 35,000 mg/kg (Anexo XII). Estas diferencias encontradas en las pruebas de Tukey pueden ser debido a las diferentes texturas del suelo. Ambas plantas se vieron afectadas.

### **5. 3. 3. HOJAS, FLOR Y FRUTO**

Para comparar el crecimiento y desarrollo de las plantas, el número o diámetro de las hojas flores y frutos es un parámetro comúnmente utilizado. Sin embargo, en este caso no se pudo realizar esta prueba, ya que los datos obtenidos no fueron suficientes para aplicar estadística, así que se decidió mencionar solamente los efectos físicos observados en estos parámetros y mostrar las evidencias fotográficas.

En el ápice de las hojas de frijol, en la concentración de 1,247.36 y 35,000 mg/kg de diesel en el suelo, se observó la presencia de amarillamiento, la caída prematura de las hojas así como su marchitez, efectos ocasionados por la disminución de la disponibilidad de ciertos nutrimentos debido a la presencia de diesel en el suelo (Figura V.5). Paez (2000) observó el mismo efecto en la planta de frijol en suelo contaminado con hidrocarburos.



*Figura V.5. Desarrollo de hojas en la planta de frijol*

La presencia de flor y fruto se observó en el control (Figura V.6) y a una concentración de diesel de 1,247.36 mg/kg.



*Figura V.6. Desarrollo de fruto y flor en las plantas de frijol*

En la planta de jitomate, se observó que el desarrollo de hojas verdaderas sólo fue en el control y a una concentración de diesel en suelo de 1,247.36 mg/kg (Figura V.7). En las concentraciones restantes sólo se observaron las hojas embrionarias las cuales también presentaron amarillamiento y marchitez.



Figura V.7. Desarrollo de hojas en plantas de jitomate

En el jitomate, la floración se presentó únicamente en el control y no hubo presencia de fruto debido a que el jitomate completa su ciclo de vida entre los 80 y 120 días y las plantas se cosecharon a los 84 días. Por lo que no es posible comparar el desarrollo entre ambas plantas.

### 5. 3. 4. BIOMASA

La biomasa, es la resultante de la suma del peso seco de cada órgano de la planta (Morales *et al.*, 2008) y es también un parámetro empleado en pruebas de toxicidad (OCDE, 2003). Para este estudio se encontró que la biomasa en los controles de ambas plantas presentaron los valores más altos (Tabla V.4).

Tabla V.4. Biomasa de las plantas de frijol y jitomate desarrolladas a diferentes concentraciones de diesel en suelo

Concentración de diesel (mg/kg)	Promedio de biomasa en la planta de frijol (g)	Promedio de biomasa en la planta de jitomate (g)
Control	1.42±0.25	0.41±0.08
1,247.36	0.68±0.05	0.12±0.003
20,000	no sobrevivieron	0.005±0.001
35,000	0.18±0.04	0.002±0.001
50,000	no sobrevivieron	no sobrevivieron
70,000	no sobrevivieron	no sobrevivieron

Del análisis de varianza realizado, se encontró que sí hubo diferencia significativa para ambas plantas de frijol ( $F_{(2, 20)} = 107.9$ ; Anexo XIII) y de jitomate ( $F_{(3, 38)} = 222.69$ ; Anexo XIV), por lo que la presencia de diesel en el suelo, sí afectó a la biomasa de las plantas.

En la prueba de Tukey realizada en las plantas de frijol, se formaron tres grupos; el control, la concentración de 1,247.36 mg/kg y la concentración de 35,000 mg/kg. Este último grupo fue el más afectado debido a la toxicidad ocasionada por la presencia de diesel en el suelo (Anexo XV). Para la biomasa obtenida en las plantas de jitomate, la prueba de Tukey mostró dos grupos: el primero formado por el control y el segundo formado por las concentraciones de 1,247.36, 20,000 y 35,000 mg/kg (Anexo XVI). Esto se debe a la diferencia de textura de los suelos. Se observó que al aumentar la concentración de diesel en el suelo disminuyó la biomasa de la planta, ocasionado por el efecto tóxico de éste.

## **5.4. Efectos de la contaminación con diesel sobre los parámetros fisicoquímicos en el suelo**

### **5.4.1 pH en el suelo**

El pH es un parámetro importante, ya que puede tener un efecto sobre la disponibilidad de los nutrientes para las plantas, por ejemplo, en algunos estudios se ha visto que muchas plantas padecen deficiencia de fosfatos y oligoelementos si el pH sobrepasa de 8. Además se sabe que el crecimiento bacteriano se ve favorecido a pH neutros y ligeramente alcalinos (6.5 a 7.5) (Pelkzar *et. al.*, 1982) y la actividad degradadora de contaminantes mejora en un pH entre 7 y 8 (Dibble y Bartha, 1979).

En este estudio, el pH se midió mensualmente y de acuerdo con los resultados obtenidos se observó que éste varió ligeramente a lo largo del experimento en los controles de ambas plantas y éste presentó un intervalo de valores de 6.9 a 7.4 (*neutro a medianamente alcalino*) (Anexo XL). En el suelo industrial, donde se desarrollaron las plantas de frijol, valores de pH fueron de 8.5 a 9.2 (*medianamente alcalino a fuertemente alcalino*) (Anexo XL). Para las plantas de jitomate en el suelo industrial el intervalo fue de 8.3 a 9.3 (Tabla

V.5). El intervalo de valores fue similar a los datos que se encontraron al inicio del experimento.

**Tabla V.5 pH en suelo a diferentes concentraciones de diesel para frijol y jitomate**

Concentración de diesel en suelo (mg/kg)	pH planta de frijol				pH planta de jitomate			
	0 días	28 días	56 Días	84 días	0 días	28 días	56 días	84 Días
<b>Control</b>	6.9	7.0	7.4	7.1	7.0	6.9	7.4	7.0
<b>1,247.36</b>	8.5	9.2	9.1	9.0	8.9	9.1	9.2	8.9
<b>20,000</b>	8.6	8.8	9.0	8.5	8.5	8.8	9.1	8.6
<b>35,000</b>	8.7	8.7	9.3	8.6	8.3	8.7	9.1	8.5
<b>50,000</b>	9.0	8.8	9.1	8.6	8.9	8.7	9.3	8.6
<b>70,000</b>	9.0	9.0	9.0	9.0	8.4	8.8	9.2	8.6

De acuerdo con el análisis de varianza, sí se observaron diferencias significativas en el pH entre las diferentes concentraciones de diesel en el suelo y los tiempos experimentales (0, 28, 56 y 84 días) en las plantas de frijol ( $F_{(15,48)} = 3.23$ ; Anexo XVII) y de jitomate ( $F_{(15,48)} = 3.88$ ; Anexo XVIII).

La prueba de Tukey realizada para ambas plantas mostró las diferencias encontradas entre las concentraciones de diesel en el suelo y los diferentes tiempos. En ambas plantas se observó que el suelo control presentó un pH diferente al del suelo industrial en las concentraciones de 1,247.36, 20,000, 35,000, 50,000 y 70,000 mg/kg en los diferentes tiempos (Anexo XIX a XXII). Las diferencias encontradas se deben a que los suelos son distintos. Sin embargo, el pH encontrado en el suelo industrial también presentó una notoria diferencia en la concentración de 35,000 mg/kg (56 días) en el suelo donde crecieron las plantas de frijol.

El pH encontrado en el suelo donde se desarrollaron las plantas de jitomate mostró diferencias en la concentración de 1,247.36 mg/kg (0, 28, 56 y 84 días) y a 20,000 mg/kg (0, 28, 56 y 84 días). La variación del pH pudo ser ocasionada por la presencia de sales, el grado de humedad y los procesos de oxidación en el suelo (Rusell, 1959).

Se esperaba que los valores de pH presentes en el suelo industrial fueran disminuyendo con el tiempo ya que de acuerdo a la literatura encontrada, se sabe que una de las propiedades químicas del suelo más afectadas por la biodegradación de hidrocarburos es la disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y la generación de ácidos orgánicos (Munguía y Martínez, 1991 en SEMARNAP, 1996). La alcalinidad del suelo al igual que la disponibilidad de los nutrientes fueron factores que afectaron el desarrollo óptimo de las plantas, ya que el frijol se desarrolla en un pH óptimo de 5.8 a 6.7, aunque se ha visto que tiene tolerancia con un rendimiento satisfactorio en pH de 5.5 a 7.5 y el jitomate, se desarrolla en un pH óptimo de 6.0 a 6.7 y tiene tolerancia para un rendimiento satisfactorio de 6.0 a 8.2 (Porta *et al.*, 1994).

#### **5.4.2 Concentración de fósforo en forma de fosfatos**

Las plantas utilizan el ión fosfato ( $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ) como elemento nutritivo indispensable para su desarrollo, por lo que también es un parámetro importante de medición. La deficiencia de este nutriente ocasiona en las hojas un color verde, oscuro o purpúreo, provocando una maduración lenta (Parsons, 1990). Este nutriente debe existir en cantidades adecuadas en el suelo para que haya una buena concentración de bacterias. En el caso del jitomate el fosfato debe estar disponible en abundancia, ya que hace crecer tanto las partes aéreas, como las raíces, acelerando la maduración de la planta (Van Haeff, 1990).

La cantidad de fosfatos en suelo que se encontró a los diferentes tiempos de ensayo y en las diferentes concentraciones de diesel fue alta (Tabla V.6). En el suelo control donde se desarrollaron las plantas de frijol, los valores presentaron un intervalo *alto* que varió de 25.5 a 41.7 mg/kg y en el suelo industrial el intervalo fue de 27.5 a 156.9 mg/kg (Anexo XLII).

En el suelo donde se desarrollaron las plantas de jitomate, el intervalo encontrado también fue *alto*, varió de 27.2 a 46.2 mg/kg en el suelo control y en el suelo industrial de 32.5 a 109.8 mg/kg (Anexo XLI).

**Tabla V.6. Variación de fosfatos en suelo a diferentes concentraciones de diesel en los diferentes tiempos experimentales para las plantas de frijol y de jitomate.**

Concentración de diesel (mg/kg)	fosfatos (mg/kg) planta de frijol				fosfatos (mg/kg) planta de jitomate			
	0 días	28 días	56 días	84 días	0 días	28 días	56 días	84 días
<b>Control</b>	31.2	41.0	41.7	25.5	33.3	27.2	42.9	46.2
<b>1,247.36</b>	100.2	40.7	40.3	44.6	109.8	39.8	54.7	51.2
<b>20,000</b>	87.2	41.2	36.6	32.5	92.7	48.1	32.7	37.4
<b>35,000</b>	156.9	81.8	43.9	91.6	66.9	86.8	66.3	89.8
<b>50,000</b>	33.2	27.5	95.5	117.5	42.6	37.7	68.9	56.7
<b>70,000</b>	32.3	47.5	62.2	44.2	35.2	32.5	66.5	43.4

En general se observó una amplia variación en las concentraciones de fosfatos a lo largo del experimento. Y se deben a la adsorción, absorción y desorción del fósforo en el suelo. Las variaciones en el control debieron ser ocasionadas por la absorción y desorción realizada por las plantas y la heterogeneidad del suelo.

En el análisis de varianza múltiple realizado, se encontró que sí existe una diferencia significativa en la cantidad de fosfatos entre las diferentes concentraciones de diesel en el suelo y los tiempos experimentales (0, 28, 56 y 84 días) en las plantas de frijol ( $F_{(15,24)}=644.63$ ; Anexo XXVI) y de jitomate ( $F_{(15,24)}=107.84$ ; Anexo XXVII).

La prueba de Tukey realizada para ambas plantas mostró que las diferencias se presentaron a partir de los controles (Anexo XXVIII y XXXI) y éstas pueden ser ocasionadas por el movimiento de los fosfatos en el suelo; por la absorción y desorción realizada por las plantas, por la textura en el suelo (Wild, 1992), o por la heterogeneidad del suelo.

### 5.4.3 Concentración de nitrógeno total

Las plantas absorben nitrógeno, tanto en la forma de nitratos como en la forma de amonio. El equilibrio de este elemento varía según las circunstancias y las especies, pero en general, el nitrato constituye la fuente principal de nitrógeno para los cultivos. Además los microorganismos pueden utilizar también ambas formas como fuentes de nitrógeno pero en general prefieren amonio (Zagal, 2005). De ahí que al determinar la cantidad de nitrógeno total ( $N_T$ ), se puede dar seguimiento de manera indirecta a la utilización del amonio y los nitratos por las plantas y microorganismos que se encuentran en el suelo.

En este estudio, el nitrógeno total se determinó en muestras compuestas provenientes de las diferentes concentraciones de diesel en suelo y en los diferentes tiempos de experimentación. En general, se observó que para ambas plantas, las concentraciones de nitrógeno total van de *regular* a *extremadamente rico* (Tabla V.7) (Vázquez y Bautista, 1993) excepto en el suelo control (Anexo XLII). En la planta de frijol el intervalo de variación fue de 897.8 a 3,131.5, y para las plantas de jitomate fue de 735.1 a 9,905.73 mg/kg.

**Tabla V.7. Variación de nitrógeno total en suelo a diferentes concentraciones de diesel en suelo y a diferentes tiempos para las plantas de frijol y de jitomate**

Concentración de diesel (mg/kg)	nitrógeno total (mg/kg) planta de frijol				nitrógeno total (mg/kg) planta de jitomate			
	0 días	28 días	56 días	84 días	0 días	28 días	56 días	84 días
<b>Control</b>	NA	NA	NA	917.18	NA	NA	NA	823.5
<b>1,247.36</b>	1,764.8	1,285.8	1,312.2	1,633.22	1,423.5	6,728.8	773.5	823.5
<b>20,000</b>	1,474.6	1,035.0	1,309.4	1,493.23	1,372.5	2,635.5	979.5	1,018.77
<b>35,000</b>	1,553.3	2,077.8	1,270.2	1,030.18	1,455.0	4,273.7	735.1	1,521.80
<b>50,000</b>	1,424.4	3,131.5	2,956.1	1,046.72	1,430.1	1,290.6	1,045.3	-
<b>70,000</b>	1,770.5	1,097.8	897.8	1,160.71	1,065.5	1,175.8	944.0	761.41

No se observó una tendencia en el comportamiento de la concentración de nitrógeno amoniacal, esta variabilidad puede ser explicada por el hecho de que la cantidad de las formas del nitrógeno en el suelo (nitrógeno amoniacal, nitritos y nitratos) están sujetas a cambios rápidos a través de procesos como son la amonificación, nitrificación, desnitrificación y otros procesos microbianos (Black, 1965). La disminución del nitrógeno puede ser debido a que las plantas cultivadas reducen el contenido de nitrógeno amoniacal debido a su absorción radicular (Wild, 1992). Por lo anterior y por la falta de datos, no se realizó el análisis de varianza.

#### 5.4.4 Concentración de diesel en las muestras de suelo

Con la finalidad de observar si de manera natural los microorganismos presentes en los suelos empleados para este estudio llevaron a cabo la degradación del diesel, se cuantificó el diesel residual mediante el análisis de hidrocarburos fracción media conforme a la NOM-138-SEMARNAT/SS 2003, que utiliza como base el método analítico EPA 8015B-1996, los resultados se resumen en la Tabla V.8.

**Tabla V.8. Concentración de hidrocarburos fracción media (diesel) en suelo a diferentes tiempos experimentales para las plantas de frijol y jitomate**

Concentración de diesel de referencia (mg/kg)	Hidrocarburos Fracción Media (mg/kg) planta de frijol				Hidrocarburo Fracción Media (mg/kg) planta de jitomate				
	Tiempo	0 días	28 días	56 días	84 días	0 días	28 días	56 días	84 días
<b>1,247.36</b>		1,167.96	1,175.59	964.72	1,202.53	931.37	1,307.20	688.42	1,116.24
<b>20,000</b>		11,309.55	-	14,992.44	7,034.95	7,340.00	-	11,021.95	6,539.57
<b>35,000</b>		26,665.76	20,853.53	13,608.53	17,577.41	23,275.55	22,831.38	15,334.67	16,934.23
<b>50,000</b>		27,818.16	41,109.12	21,433.90	12,423.72	40,551.38	30,341.97	27,835.74	24,219.69
<b>70,000</b>		71,479.27	68,546.23	32,695.94	28,487.99	55,054.04	30,432.21	60,584.36	40,268.27

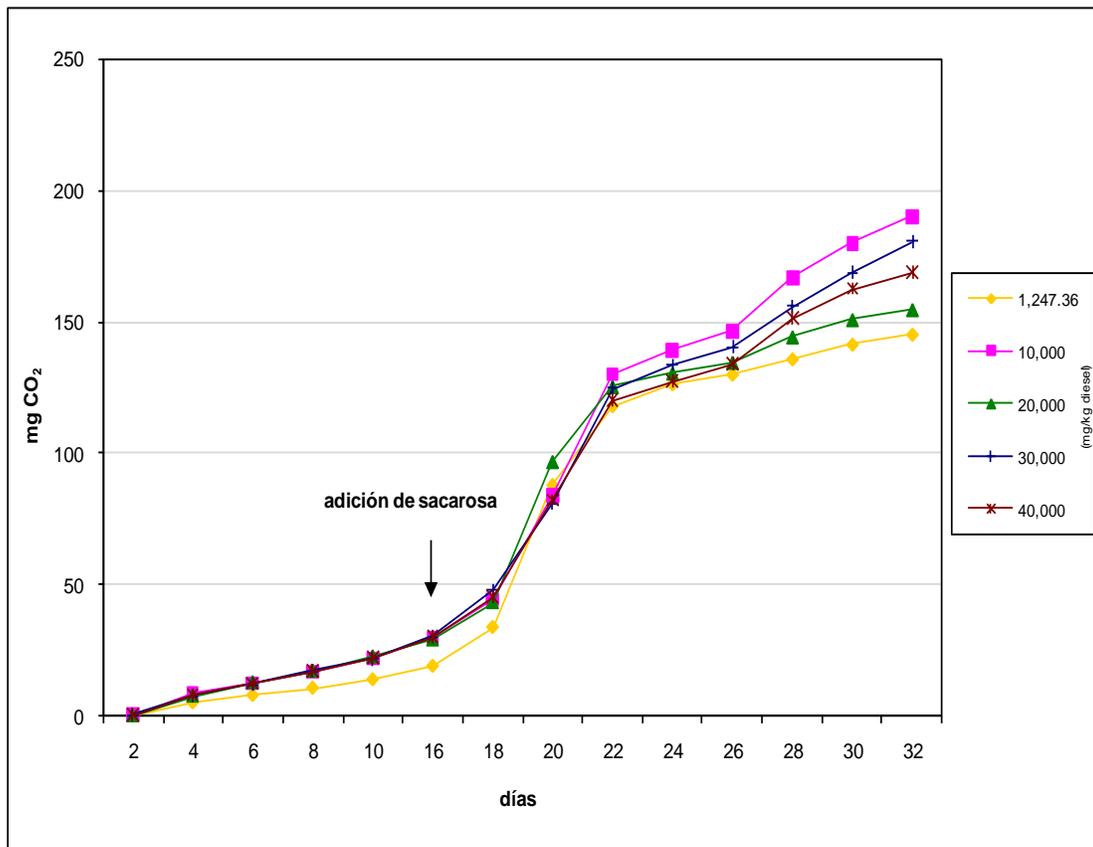
En todos los casos, la concentración de hidrocarburos fracción media en suelo para ambas plantas, mostraron una tendencia a la disminución hacia el final del experimento. La excepción fue la concentración de 1,247.36 mg/kg que se manejó como la inicial que tenía el suelo, que prácticamente no cambió al paso del tiempo, en donde se desarrollaron las plantas de frijol varió en el intervalo de 964.72 a 1,202.53 mg/kg y para el suelo donde se desarrollaron las plantas de jitomate, el intervalo fue de 688.42 a 1,307.20 mg/kg. Es probable que estos valores reflejen alguna interferencia, ya que si se tratara de hidrocarburos éstos se hubieran degradado y la concentración hubiera sido no-detectable, a cualquiera de los tiempos, incluso a los 28 días, esto se sabe por otros experimentos realizados en el laboratorio. A pesar de que las plantas en las mayores concentraciones de diesel en el suelo no sobrevivieron, sí se observó una disminución de hidrocarburos; ésto pudo ser: por efecto de la volatilización, por degradación microbiológica (Domínguez, 2001; Gibson y Subramanian, 1984) o por el desarrollo de las plantas ya que éstas absorben hidrocarburos de forma indirecta, es decir, los hidrocarburos pueden ser degradados por medio de la secreción de exudados en la raíz, mediante la ayuda de la actividad metabólica realizada por hongos y bacterias presentes en la rizósfera (Anderson *et al.*, 1993; Shimp *et al.*, 1993). Otro proceso presente en las plantas es la translocación de los contaminantes al tallo y subsecuentemente su volatilización en la superficie de las hojas (Cunningham y Ow, 1996).

Un aspecto que es importante mencionar es que los valores teóricos calculados para adicionar al suelo al inicio del experimento fueron muy diferentes a los resultados que se obtuvieron; es muy probable que se deba a un problema de homogeneización del suelo.

## **5.5. Producción de bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como indicador de actividad microbiana**

Para corroborar si la degradación del diesel en el suelo corresponde a la actividad de los microorganismos, se determinó la producción de CO<sub>2</sub> en diferentes concentraciones de diesel (10,000 mg/kg, 20,000 mg/kg, 30,000 mg/kg y 40,000 mg/kg), que fueron muy cercanas entre sí y ligeramente más altas a la registrada en el suelo original que contenía diesel residual (1,247.36 mg/kg) (Figura V.8). A partir del sexto día, aunque baja, una

constante producción de  $\text{CO}_2$ , al añadir la sacarosa el día 16 para estimular el crecimiento de la población bacteriana, se observó un cambio de pendiente que corresponde a un aumento en la producción de  $\text{CO}_2$ . Este aumento, indicó que al existir en el medio una fuente de energía más fácil de degradar como es la sacarosa, esta fue utilizada como sustrato, de tal forma que los microorganismos recibieron un estímulo. Del día 22 al 26 se observó otro cambio de pendiente, ocasionada por la formación de enzimas y metabolitos intermedios para reiniciar de nuevo el crecimiento.



**Figura V.8. Producción de  $\text{CO}_2$  como respuesta de la actividad metabólica. (↓) adición de sacarosa en el día 16.**

La producción de  $\text{CO}_2$  registrada durante los primeros 16 días que fue de 0.3 a 30.2 mg. A partir del día 16, aumentó de 30.2 a 190.5 mg  $\text{CO}_2$ . Es importante hacer notar que las concentraciones de 10,000 mg/kg y 30,000 mg/kg de diesel en el suelo, presentaron mayor producción de bióxido de carbono después de añadir la sacarosa, al parecer los

microorganismos presentaron condiciones más favorables para la degradación de diesel en estas concentraciones.

De acuerdo con el análisis de varianza, se observó que sí hay una diferencia significativa ( $F_{(4, 10)} = 12.35$ ; Anexo XXXVI), en la cantidad de  $\text{CO}_2$  producida durante los primeros 16 días a las diferentes concentraciones de diesel en el suelo.

Después de la adición de sacarosa, el análisis de varianza indicó que sí hay una diferencia significativa ( $F_{(4, 10)} = 4.52$ ; Anexo XXXVIII), en la producción de  $\text{CO}_2$ . La prueba de Tukey mostró dos grupos, el primero formado por la concentración de 1,247.36mg/kg y el segundo formado por las concentraciones de diesel en suelo de 10,000, 20,000, 30,000 y 40,000 mg/kg.

En general, se esperaba que conforme la concentración de hidrocarburos aumentara, la producción de  $\text{CO}_2$  disminuyera en caso de que existiera un efecto tóxico del diesel, sin embargo, los resultados obtenidos indican que aunque exista un efecto tóxico del diesel hacia las plantas, no lo es para los microorganismos que están en el suelo. Este experimento permitió demostrar que los microorganismos en el suelo tienen un papel fundamental en la degradación de hidrocarburos, ya que éstos los utilizan como fuente de carbono y energía degradándolos hasta  $\text{CO}_2$  y agua (Atlas, 1981). En aquellos casos en los que las plantas se pudieron desarrollar a pesar de la presencia de diesel, es una prueba de la interacción entre las raíces de las plantas y los microorganismos presentes en la rizósfera, donde se pueden propiciar las condiciones óptimas para la degradación de hidrocarburos (Adam y Duncan, 2002).

Por otro lado, la producción de  $\text{CO}_2$  en las diferentes concentraciones de diesel fue la misma, independientemente de la concentración de diesel en suelo, por el contrario, Zegarra (2000) encontró que una mayor concentración inicial de diesel produjo una mayor producción de  $\text{CO}_2$ .

## CAPÍTULO VI

### 6. CONCLUSIONES

De acuerdo con los objetivos planteados y los resultados obtenidos se presentan las siguientes conclusiones:

- ✓ La presencia de diesel en suelo afectó la germinación de frijol y de jitomate, en el caso de frijol el porcentaje de germinación se redujo a 67.7% y para el jitomate en un 61.3% a una concentración de diesel de 70,000 mg/kg.
  
- ✓ El desarrollo de las plantas de frijol (altura de tallo, longitud de raíz, hojas, flores, frutos y biomasa) se vio afectado por la presencia de diesel, aún a la concentración residual de 1,247.36 mg/kg, sí se presentó floración y fruto, pero no se desarrollaron de la misma forma que en el control, las plantas no sobrevivieron a partir de 20,000 mg/kg. En la planta de jitomate, aunque no se completó su ciclo de vida, se observó una disminución en el desarrollo del tallo, de la raíz y de la biomasa, al aumentar la concentración de diesel en el suelo, a partir de una concentración residual de 1,247.36 mg/kg. Algunos síntomas presentes en el desarrollo de las plantas fueron: las hojas presentaron amarillamiento, caída prematura y marchitez en estadios tempranos del desarrollo, que son efectos ocasionados por la presencia de diesel en suelo. Estos efectos, fueron más marcados en el jitomate.
  
- ✓ Los análisis fisicoquímicos realizados al inicio del experimento en los suelos industrial y control, indicaron condiciones adecuadas, es decir el suelo era fértil para el crecimiento óptimo de las semillas de frijol y jitomate.
  
- ✓ Los análisis fisicoquímicos realizados durante el experimento en los suelos industrial y control, variaron a lo largo del experimento. El pH se alcalino a fuertemente alcalino en el suelo industrial, esta variación se debe a la diferencia de suelos. Los fosfatos, también presentaron una variación que se deben a la heterogeneidad y a los procesos de adsorción, absorción y desorción

en el suelo. El nitrógeno total en el suelo varió debido a los procesos de amonificación, nitrificación, y desnitrificación.

✓ Se observó una tendencia a la disminución en la concentración de diesel en ambos tipos de suelo, que pudo ser debida a procesos de volatilización o de degradación microbiológica.

✓ La producción de bióxido de carbono sí es un indicador de la actividad microbiana, pero no está relacionada con la concentración de diesel al inicio de cada condición.

### **RECOMENDACIONES**

✓ Emplear especies de plantas con ciclos de vida de duración similar, para poder comparar diferencias en su desarrollo, o bien, permitir que se alcance el tiempo de desarrollo de cada especie.

✓ Utilizar concentraciones de diesel entre 500 y 20,000 mg/kg con intervalos más cercanos.

✓ Para comparar los efectos entre un suelo contaminado y uno no contaminado sería conveniente que provengan de un mismo lugar para que sus características sean más similares.

✓ Al momento de contaminar los suelos para iniciar un experimento será necesario asegurar una mejor homogeneización

---

**REFERENCIAS**

- ADAM G., AND DUNCAN H.J., 1999. *Effect of diesel fuel on growth of selected plant species*. Environ. Geochem. Health, 21: 353-357.
- ADAM G., AND DUNCAN H.J., 2002. *Influence of diesel on seed germination*. Environ. Pollut. 120: 363-370.
- AGUILERA C.M., Y MARTÍNEZ R.E., 1996. *Relaciones Agua, Suelo, Planta, Atmósfera*. Universidad Autónoma de Chapingo. México, D.F., 256 p.
- AGUILERA H.N., 1989. *Tratado de Edafología de México*. Laboratorio de Investigación de Edafología. Tomo I. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias, UNAM. México. 222 p.
- ALEXANDER M., 1990. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. 2ª Ed. México. AGT. Editor S.A., Pp. 219-238.
- AMAKIRI J. O., AND ONOFEHARA F.A., 1984. *Effects of crude oil pollution on the germination of Zea mays and Capsicum frutescens*. Environ. Pollut. 35: 159-167.
- ANDERSON T.A., GUTHRIE E.A., AND WALTON B.T., 1993. *Bioremediation*. Environ Sci. Technol. 27: 2630-2636.
- ANDERSON T.A., KRUGER E.L., AND COATS, J.R., 1994. *Enhanced degradation of a mixture of three herbicides in the rhizosphere of a herbicide-tolerant plant*. Chemosphere 28: 1551-1557.
- ATLAS R.M., 1981. *Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspective*. Microbiol. Rev. 45(1): 180-209.
- ATLAS R. M., AND BARTHA R., 1993. *Microbial ecology: Fundamentals and Applications*. 3<sup>rd</sup> Ed. The Benjamin/Cummings Publ. CO., Menlo Park, C. A. USA.
- BARTHA, R., AND PRAMER, D., 1965. *Feature of a flask and method for measuring the persistence and biological effects of pesticides in soil*. Soil. Science 100(1): 68-70.
- BAVER L.D. 1956. *Soil Physics*. 3<sup>rd</sup> Ed. Wiley and Sons Inc. N.Y. 489 p.
- BLACK C.A., 1965. *Methods of soil analysis: Physical and mineralogical properties*. American Society of Agronomy. Inc. Publishers, USA. Part 2.

- BLOCK R., ALLWORTH N., AND BISHOP M., 1991 *Assessment of diesel contamination in soil*. In: Hydrocarbon contaminated soils. Remediation Techniques Environmental Fate. Risk Assessment Analytical Methodologies Regulatory Considerations. E.J Calabrese (Eds.). Lewis Publishers. Michigan. USA. Vol. 1.
- BOSSERT I., AND BARTHA R., 1984. *The fate of petroleum in soil ecosystems*. En Atlas, R. M. (Ed), Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company, USA. Pp. 435-473.
- BOTTOMLEY J.P., 1993. *Microbial activity in soil*. Environ. Biotech. 4: 318-322.
- BOUYOUCOS G., 1951. *Hydrometer Improved Method for Making Particles Size Analysis of Soil*. Agron. J. 54: 464-465.
- BOYLE J. J., AND SHANN J.R., 1998. *The Influence of Planting and Soil Characteristics on Mineralization of 2, 4, 5-T in Rhizosphere*. Soil Biodegradation and Bioremediation. J. Environ. 27: 704-709.
- CARTER M., 1993. *Soil Sampling and Methods of analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers, Boca Raton, USA. 198 p.
- CHAÎNEAU. H.C., MOREL L.J., AND OUDOT J., 1997. *Phytotoxicity and Plant Uptake of Fuel Oil Hydrocarbons*. J. Environ. Qual. 26: 1478-1483.
- CONNELL W.D., AND MILLER G., 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley and Sons. USA. 444 p.
- CUNNINGHAM S., AND OW D., 1996. *Promises and Prospects of Phytoremediation*. Plant Physiol. 110: 715-719.
- DEJONG E., 1986. *The Effect of crude oil spill on cereals*. Environ. Pollut. 22: 187-196.
- DIBBLE J. T., AND BARTHA R., 1979. *Effect of Environmental Parameters on the Biodegradation of Oil Sludge*. Appl. Environ. Microbiol. 37(4): 729-739.
- DOMINGUEZ A. A., 2001. *Pruebas de biotratibilidad de un suelo contaminado con diesel mediante el uso de texturizantes orgánicos*. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias, UNAM. México, D. F. 88 p.
- DUFFUS H.J., 1983. *Toxicología Ambiental*. Ed. Omega, Barcelona, España. 284 p.
- DUMAS A., 1826. *Annales de chimie*. 342 p.

- ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA) 8015b, 1996. (Disponible en <http://www.caslab.com/EPA-Methods/PDF/8015b.pdf>. Consultado en julio de 2010).
- FLORES P. M. A., TORRAS O.S., Y TÉLLEZ G. R., 2004. *Medidas de Mitigación para uso de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos en infraestructura de transporte terrestre*. Publicación Técnica No. 257, Sanfandila, Qro. Pp. 5-7.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO), 1998. *World Reference Base for Soil Resources*. Rome. 84 p.
- FRANKENBERGER Jr.W.T., 1992. *The need for a laboratory feasibility study in bioremediation of petroleum hydrocarbons*. *In*: Hydrocarbon Contaminated soils and groundwater. Vol. 2. E. J. Calabrese and P. T. Kosteki (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA. Pp. 237-293
- GIBSON D.T., AND SUBRAMANIAN V., 1984. *Microbial degradation of aromatic hydrocarbons*. *In*: *Microbial Degradation of Organic Compounds*. D. T. Gibson (Ed.). Microbiol. Series 13: 181-252.
- GUDIN C., AND SYRATT W.J., 1975. *Biological aspects of land rehabilitation following hydrocarbon contamination*. Environ. Pollut. 8: 107-112.
- ISO 11269-1, 1993. SOIL QUALITY. *Determination of the effects of pollutants on soil flora method for the measurement of inhibition of root growth*. Part 1.
- JUÁREZ M.C.H., 2007. *Evaluación de fitorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos, utilizando tres especies*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad Universitaria, México D. F 113 p.
- KRUGER E.L., ANDERSON T.A., AND COATS J.R., 1997. *Phytoremediation of contaminated water and soil*. *En*: Phytoremediation of soil and water contaminants. ACS Symposium Series 664. American Chemical Society, Kruger E. L., Anderson T. A., and Coats J. R. (Eds.), Washington, DC. Pp. 2-17.
- LANGER M.H.R., AND HILL G.D., 1991. *Agricultural Plants*. University Press. Pp. 10-32; 308-313.
- LARSON A.R., AND WEBER E.J., 1994. *Reaction Mechanisms*. *In*: Environ. Organic Chem. Lewis Publishers. USA. Pp. 60-67.

- LEWIS M., 1995. *Use of freshwater plants for phytotoxicity testing; A review*. Environ. Pollut. 87(3): 319-336.
- LITTLE M.T., HILLS J.F., 1976. *Métodos estadísticos para la investigación en la agricultura*. 2ª Ed. México. Trillas. 270 p.
- MORALES R.E.J., ESCALANTE E.J.A.S, AND LÓPEZ S.J.A., 2008. *Crecimiento, índice de cosecha y rendimiento de Frijol (Phaseolus vulgaris L.) en unicultivo y asociado con Girasol (Helianthus Annuus L.)*. Universidad y Ciencia. 24 (001): 1-10.
- NELY R., 1990. *Fate and Transport of Organic Chemicals in the Environment*. Government. Institutes, Maryland. 302 p.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-SEMARNAT-2000. *Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreos y análisis*. Diario Oficial de la Federación, 31 de diciembre de 2002.
- NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SS 2003. *Límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo y las especificaciones para su caracterización y remediación*. Diario Oficial de la Federación, 30 de marzo de 2005.
- ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT (OCDE), 2003. *Guideline for the testing of chemical proposal for updating guideline 208*. 2003. Terrestrial Plant Test. Seedling Emergence and Seedling Growth Test. Pp. 1-19.
- PAEZ B.R., 2000. *Aplicación de Bioensayos de toxicidad aguda para la evaluación de suelos contaminados con Hidrocarburos del Petróleo*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM. México DF. 73 p.
- PALMROTH M.R.T., PICHTEL J., AND PUHAKKA J. 2002. *Phytoremediation of subartic soil contaminated with diesel fuel*. Biores. Technol. 84: 221-228.
- PARSONS B.D., 1990. Producción vegetal 12. *Manuales para educación agropecuaria Frijol y Chícharo*. 2ª Ed. SEP/ Trillas. México D.F., 58 p.
- PEPPER I., GERBA C., AND BRUSSEAU M., 1996. *Pollution Science*. Academic Press Canada. 397 p.

- PELKZAR M.J., REID R., AND CHAN E.C., 1982. *Microbiología* 2ª Ed. Mc Graw-Hill. México. 502 p.
- PIERZYNSKI M.G., SIMS T.J., AND VANCE F.G., 1994. *Soils and Environmental Quality*. Lewis Publishers. USA. Pp. 20-39; 185-200.
- PLAZA G., NALECZ G., ULFIG K., AND BRIGMON L.R., 2004. *The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation*. *Chemosphere* 59: 289-296.
- PORTA C.J., LÓPEZ A.R.M., Y ROQUERO DE LABURU C., 1994. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente*. Eds. Mundi-Prensa. Madrid, España. 807 p.
- QUIÑONES A.E.E., FERRERA C.R., GAVI R.F., FERNÁNDEZ L.L., RODRÍGUEZ V.R., Y ALARCÓN A., 2003. *Emergencia y crecimiento de maíz en suelo contaminado con petróleo crudo*. *Agrociencia* 37(6): 585-594.
- RIVERA C.M. DEL C., TRUJILLO N.A., MIRANDA DE LA C. M.A., Y MALDONADO C.E., 2005. *Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas*. INCI No. 6. Caracas. Vol. 30: 326-331.
- RIVERA M.M., 2008. *Efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de semillas de alfalfa (Medicago sativa) y de rabanito (Raphanus sativus) utilizando suelos de uso industrial y agrícola*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias, UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. 89 p.
- ROMANTSCHUK M., SARAND I., PETÄNEN T., PELTOLA, R., JONSSON-VIHANNE M., KOIVULA T., YRJÄLÄ K., AND HAAHTELA K., 2000. *Jeans to improve the effect of in situ bioremediation of contaminated soil: an overview of novel approaches*. *Environ. Pollut.* 107: 179-185.
- RUSELL J.E., 1959. *Las condiciones del suelo y desarrollo de las plantas*. Ed. Aguilar, Madrid, España, Pp. 770.
- SAFFERMAN S. I., 1998. *Fundamentals of bioremediation Treatability studies*. In: *Bioremediation: Pri and Practice Vol. I. Fundamentals and Applications*. S. Sikdar and R. I. Irvine (Eds). Technomic Publishing Co. Inc. 765 p.

- SAVAL B.S., 1999. *Éxitos y fracasos de la remediación de suelos*. En: Conservación y Restauración de Suelos, UNAM, PUMA, SEMARNAP, Editores: Christina Siebe *et al.*, Instituto de Ingeniería, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp 511-526.
- SEMARNAP (Secretaría del Medio Ambiente Recursos Naturales y Pesca), 1996. Los Suelos de Tabasco Restauración, Conservación y Uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco.
- SHIMP J.F., TRACY J.C., DAVIS L.C, LEE E., AND HUANG W., 1993. *Beneficial effects of plants in the remediation of soil and groundwater contaminated with organic materials*. Environ Sci. Technol. 23: 41-77.
- SIMS J.L., SIMS R.C., AND MATTHEWS J.E., 1990. *Approach to bioremediation of contaminated soil*. Hazardous Waste and Hazardous Materials. 7(2): 117-149.
- STONE W.A.Jr., 1991. *Assessing Health Risks Associated with Diesel Contaminated Soils and Groundwater*. In: Hydrocarbon Contaminated Soils. Lewis Publisher. 1(13): 167-179.
- THOMPSON L., TROEH F., 1982. *Los suelos y su fertilidad*. 4ª Ed. Editorial. Reverté, S. A, España 649 p.
- VAN HAEFF J.N.M., 1990. *Producción vegetal 16. Manuales para educación agropecuaria Tomates*. 2ª Ed. SEP/Trillas. 54 p.
- VAN OVERBEECK J., BLONDEAU R., 1954. *Mode of action of Phytotoxic oils*. Weeds. Pp. 55-65.
- VÁZQUEZ A. Y BAUTISTA A, 1993. “*Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua*”. DEPTO. DE SUELOS. UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHAPINGO. MÉXICO, D.F
- VERHOEF A.H., AND VAN GESTEL, C.A.M, 1995. *Methods to Assess the Effects of chemicals on Ecosystems*. In: Methods to Assess the Effects of chemicals on Soils. Linthurst A. R., Bourdeau P., and Tardiff R. G. (Eds.). SCOPE. John Wiley and Sons. USA. Pp. 223-257.
- WALTON B.T., GUTHRIE E.A., AND HOYLMAN A.M., 1994. *Toxicant degradation in the rizhosphere*. En: Bioremediation through Rhizosphere Technology. ACS Symposium Series 563. Anderson, T. A., and Coats J. R. (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC. Pp. 11-26.

- WANG W., 1991. *Literature review on higher plants for toxicity testing*. Water Air Soil Pollut. 59: 381-400.
- WANG X., YU X., AND BARTHA R., 1990. *Effect of bioremediation through rhizosphere technology*. ACS Symposium Series 563. American chemical Society, Washington, DC. Pp. 11-26.
- WILD A., 1992. *Elementos nutritivos en el suelo: fósforo*. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Rusell. Ed. Mundi Prensa. Madrid. Pp. 734-769.
- ZAGAL E., 2005. *El ciclo del Nitrógeno en el suelo*. Revista Ciencia Ahora No. 16. Año 8. Universidad de Concepción. Facultad de Agronomía, Departamento de Suelos. Chile. Pp. 103-110.
- ZEGARRA M.G., 2000. *Optimización de la biodegradación de diesel industrial en un suelo contaminado mediante la metodología de superficie de respuesta*. Tesis de Maestría en Ingeniería Ambiental. División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería. UNAM. 146 p.

## ANEXOS

### ANEXO I ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO

Fuente de Variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculada	Nivel de significancia
Entre Tratamientos	2,081.25	5	59.53	83.91	0.000
Dentro de tratamientos	59.53	12	4.96	-	-
Total (corregido)	2,149.78	17	64.49	-	-

### ANEXO II. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	Nivel de significancia
Entre Tratamientos	1,270.21	5	254.04	78.16	0.000
Dentro de tratamientos	39.00	12	3.25	-	-
Total (corregido)	1,309.21	17	257.29	-	-

**ANEXO III. PRUEBA DE TUKEY (P < 0.05) DE LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO (\*)**

CONCENTRACIÓN mg/kg	Control	1,247.36	20,000	35,000	50,000	70,000
	M= 80.92	M = 77.72	M = 71.91	M = 64.46	M = 54.05	M = 53.15
<b>Control</b>	-	0.522	*0.004	*0.001	*0.000	*0.000
<b>1,247.36</b>	0.522	-	0.066	*0.001	*0.000	*0.000
<b>20,000</b>	*0.004	0.066	-	0.758	*0.000	*0.000
<b>35,000</b>	*0.001	*0.007	0.7577	-	*0.000	*0.000
<b>50,000</b>	*0.000	*0.000	*0.000	*0.000	-	0.996
<b>70,000</b>	*0.000	*0.000	*0.000	*0.000	0.996	-

**ANEXO IV. PRUEBA DE TUKEY (P < 0.05) DE LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DEL PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO (\*).**

CONCENTRACIÓN mg/kg	Control	1,247.36	20,000	35,000	50,000	70,000
	M = 73.31	M = 76.09	M = 69.44	M = 62.73	M = 55.35	M = 54.34
<b>Control</b>	-	0.454	0.164	*0.000	*0.000	*0.000
<b>1,247.36</b>	0.454	-	*0.007	*0.000	*0.000	*0.000
<b>20,000</b>	0.164	*0.007	-	*0.007	*0.000	*0.000
<b>35,000</b>	*0.000	*0.000	*0.007	-	*0.003	*0.001
<b>50,000</b>	*0.000	*0.000	*0.000	*0.000	-	0.980
<b>70,000</b>	*0.000	*0.000	*0.000	*0.001	0.980	-

**ANEXO V. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA DE TALLOS EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	13.58	2	6.78	7.29	0.0025
<b>Dentro de tratamientos</b>	28.88	31	0.93	-	-
<b>Total (corregido)</b>	42.46	33	7.71	-	-

**ANEXO VI. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA DE TALLOS EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	144	3	48.16	83.42	0.000
<b>Dentro de tratamientos</b>	22	38	0.58	-	-
<b>Total (corregido)</b>	166	41	48.74	-	-

**ANEXO VII. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ) DE LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA ALTURA DE LOS TALLOS EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN SUELO (\*)**

CONCENTRACIÓN (mg/kg)	Control	1,247.36	35,000
	M = 7.43	M = 7.15	M = 5.37
Control	-	0.709	*0.002
1,247.36	0.709	-	*0.007
35,000	*0.002	*0.007	-

**ANEXO VIII. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ). VALORES QUE INDICAN LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA ALTURA DE LOS TALLOS EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).**

CONCENTRACIÓN (mg/kg)	Control	1,247.36	20,000	35,000
	M = 5.69	M = 3.84	M = 1.57	M = 1.29
Control	-	*0.000	*0.000	*0.000
1,247.36	*0.000	-	*0.000	*0.000
20,000	*0.000	*0000	-	0.895
35,000	*0.000	*0.000	0.895	-

**ANEXO IX. ANÁLISIS DE VARIANZA. LONGITUD DE RAÍCES EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	2,198.57	2	109.29	27.48	0.00
<b>Dentro de tratamientos</b>	760.13	19	40.01	-	-
<b>Total (corregido)</b>	2,958.7	21	149.3	-	-

**ANEXO X. ANÁLISIS DE VARIANZA. LONGITUD DE RAÍCES EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	2,529.39	3	843.13	122.12	0.000
<b>Dentro de tratamientos</b>	227.84	33	6.90	-	-
<b>Total (corregido)</b>	2,757.23	36	850.03	-	-

**ANEXO XI. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ). VALORES QUE INDICAN LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA LONGITUD DE RAÍCES EN LAS PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).**

CONCENTRACIÓN mg/kg	Control	1,247.36	35,000
	M = 26.50	M = 6.13	M = 5.50
Control	-	*0.000	*0.015
1,247.36	*0.000	-	0.995
35,000	*0.015	0.995	-

**ANEXO XII. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ). VALORES QUE INDICAN LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA LONGITUD DE RAÍCES EN LAS PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).**

CONCENTRACIÓN mg/kg	Control	1,247.36	20,000	35,000
	M = 18.60	M = 2.83	M = 1.26	M = 0.88
Control	-	*0.000	*0.000	*0.000
1,247.36	*0.000	-	0.803	0.388
20,000	*0.000	0.803	-	0.996
35,000	*0.000	0.388	0.996	-

**ANEXO XIII. ANÁLISIS DE VARIANZA. BIOMASA EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	5.81	2	2.91	107.90	0.00
<b>Dentro de tratamientos</b>	0.54	20	0.03	-	-
<b>Total (corregido)</b>	6.35	22	2.94	-	-

**ANEXO XIV. ANÁLISIS DE VARIANZA. BIOMASA EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO.**

<b>Fuente de Variación</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Nivel de significancia</b>
<b>Entre tratamientos</b>	1.52	3	0.51	222.69	0.00
<b>Dentro de tratamientos</b>	0.09	38	0.00	-	-
<b>Total (corregido)</b>	1.61	41	0.51	-	-

**ANEXO XV. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ). VALORES QUE INDICAN LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA BIOMASA EN LAS PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).**

<b>CONCENTRACIÓN mg/kg</b>	<b>Control</b>	<b>1,247.36</b>	<b>35,000</b>
	<b>M = 1.42</b>	<b>M = 0.68</b>	<b>M = 0.18</b>
<b>Control</b>	-	*0.000	*0.000
<b>1,247.36</b>	*0.000	-	*0.000
<b>35,000</b>	*0.000	*0.000	-

**ANEXO XVI. PRUEBA DE TUKEY ( $P < 0.05$ ). VALORES QUE INDICAN LAS DIFERENCIAS ENTRE MEDIAS DE LA BIOMASA EN LAS PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).**

<b>CONCENTRACIÓN mg/kg</b>	<b>Control</b>	<b>1,247.36</b>	<b>20,000</b>	<b>35,000</b>
	<b>M = 0.410</b>	<b>M = 0.124</b>	<b>M = 0.005</b>	<b>M = 0.002</b>
<b>Control</b>	-	*0.000	*0.000	*0.000
<b>1,247.36</b>	*0.000	-	0.991	0.960
<b>20,000</b>	*0.000	0.991	-	0.996
<b>35,000</b>	*0.000	0.960	0.996	-

**ANEXO XVII. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIPLE. pH EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO Y A DIFERENTES TIEMPOS.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Significancia</b>
<b>Concentración</b>	5	5.94	225.85	0.000
<b>Tiempo</b>	3	0.61	23.39	0.000
<b>Concentración/Tiempo</b>	15	0.08	3.23	0.001
<b>Error</b>	48	0.03	-	-

**ANEXO XVIII. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIPLE. pH EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO Y A DIFERENTES TIEMPOS.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Significancia</b>
<b>Concentración</b>	5	5.59	378.74	0.000
<b>Tiempo</b>	3	0.92	62.25	0.000
<b>Concentración/Tiempo</b>	15	0.06	3.88	0.001
<b>Error</b>	48	0.01	-	-

ANEXO XIX. TABLA 1 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $p < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
	M = 6.92	M = 7.03	M = 7.36	M = 7.14	M = 8.64	M = 9.16	M = 9.10	M = 9.04	M = 8.60	M = 8.79	M = 8.96	M = 8.52
Control (0)	-	1.00	0.17	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	1.00	-	0.69	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	0.17	0.69	-	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (84)	1.00	1.00	1.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.04	0.13	0.31	1.00	1.00	0.68	1.00
1,247.36 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.04	-	1.00	1.00	*0.02	0.48	1.00	*0.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.13	1.00	-	1.00	0.07	0.79	1.00	*0.00
1,247.36 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.31	1.00	1.00	-	0.18	1.00	1.00	*0.00
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.02	0.07	0.18	-	1.00	0.48	1.00
20,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.48	0.79	1.00	1.00	-	1.00	1.00
20,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.68	1.00	1.00	1.00	0.48	1.00	-	0.16
20,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.01	*0.04	1.00	1.00	0.16	-

ANEXO XX. TABLA 2 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE pH EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
35,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.19	0.43	0.73	1.00	1.00	1.00	1.00
35,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.08	0.22	0.47	1.00	1.00	0.83	1.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	*0.04	0.57	*0.00
35,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.02	0.06	0.17	*0.00	1.00	0.46	1.00
50,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.62	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.13
50,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.31	0.61	0.87	0.43	1.00	1.00	1.00
50,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.15	1.00	1.00	1.00	1.00	0.83	1.00	*0.02
50,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.03	0.08	0.08	1.00	0.28	1.00
70,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.50	0.80	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
70,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.02	0.06	1.00	1.00	0.22	1.00
70,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.43	1.00	1.00	1.00	0.27	1.00	1.00	0.07
70,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.03	0.08	1.00	1.00	0.28	1.00

ANEXO XXI. TABLA 3 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $p < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
	M = 8.72	M = 8.67	M = 9.32	M = 8.60	M = 8.98	M = 8.75	M = 9.09	M = 8.56	M = 8.79	M = 8.54	M = 9.01	M = 8.56
Control (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.63	1.00	0.16	1.00	1.00	1.00	0.43	1.00
1,247.36 (28)	0.19	0.08	1.00	*0.02	1.00	0.31	0.66	*0.00	0.05	*0.00	1.00	*0.00
1,247.36 (56)	0.43	0.22	1.00	0.06	1.00	0.61	1.00	0.08	0.80	*0.02	1.00	*0.03
1,247.36 (84)	0.73	0.47	0.90	0.17	1.00	0.87	1.00	1.00	1.00	0.06	1.00	0.08
20,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.43	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.27	1.00
20,000 (28)	1.00	1.00	0.37	1.00	1.00	1.00	0.83	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
20,000 (56)	1.00	0.83	0.57	0.47	1.00	1.00	1.00	0.28	1.00	0.22	1.00	0.28
20,000 (84)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.14	1.00	*0.02	1.00	0.91	1.00	0.07	1.00

ANEXO XXII. TABLA 4 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
35,000 (0)	-	1.00	*0.00	1.00	0.95	1.00	0.48	*0.00	1.00	1.00	0.84	1.00
35,000 (28)	1.00	-	*0.00	1.00	0.79	1.00	0.26	*0.00	1.00	1.00	0.61	1.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	-	*0.00	0.62	*0.01	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.80	*0.00
35,000 (84)	1.00	1.00	*0.00	-	0.41	1.00	0.07	*0.00	1.00	1.00	0.30	1.00
50,000 (0)	0.95	0.79	0.62	0.42	-	1.00	1.00	1.00	1.00	0.18	1.00	0.24
50,000 (28)	1.00	1.00	*0.01	1.00	1.00	-	0.66	*0.00	1.00	1.00	1.00	1.00
50,000 (56)	0.50	0.26	1.00	0.07	1.00	0.65	-	*0.03	0.84	*0.02	1.00	*0.03
50,000 (84)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.24	1.00	*0.03	-	1.00	1.00	0.14	1.00
70,000 (0)	1.00	1.00	*0.04	1.00	1.00	1.00	0.84	1.00	-	1.00	1.00	1.00
70,000 (28)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.19	1.00	*0.02	1.00	1.00	-	0.10	1.00
70,000 (56)	0.84	0.61	0.80	0.26	1.00	0.95	1.00	0.13	1.00	0.10	-	0.13
70,000 (84)	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.24	1.00	*0.03	1.00	1.00	1.00	0.14	-

ANEXO XXIII. TABLA 1 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE (P < 0.05). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
	M =7.02	M = 6.92	M = 7.44	M = 7.16	M =8.88	M =9.04	M =9.14	M =8.90	M =8.51	M =8.73	M =9.04	M =8.59
Control (0)	-	1.00	*0.02	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	1.00	-	*0.00	0.70	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.02	*0.00	-	0.50	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (84)	1.00	0.70	0.50	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	1.00	0.59	1.00	0.07	1.00	1.00	0.40
1,247.36 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	-	1.00	1.00	*0.00	0.27	1.00	*0.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.59	1.00	-	0.77	*0.00	*0.03	1.00	*0.00
1,247.36 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	0.77	-	*0.03	1.00	1.00	0.25
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.07	*0.00	*0.00	*0.03	-	0.82	*0.00	1.00
20,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.27	*0.03	1.00	0.82	-	0.25	1.00
20,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	1.00	1.00	*0.00	0.25	-	*0.00
20,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.40	*0.00	*0.00	0.25	1.00	1.00	*0.00	-

ANEXO XXIV. TABLA 2 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
35,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	*0.02	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (28)	1.00	0.22	*0.00	1.00	*0.00	0.22	*0.00	0.16	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.01	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00
35,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	*0.07	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (28)	*0.00	*0.00	0.34	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.91	*0.00
50,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (84)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
70,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	*0.07	*0.00	*1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
70,000 (28)	*0.00	*0.00	0.33	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.91	0.89
70,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.72	1.00	1.00	0.87	*0.00	*0.04	1.00	*0.00
70,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.47	*0.00	*0.00	0.30	1.00	1.00	*0.00	1.00

ANEXO XXIV. TABLA 3 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
	M = 8.33	M = 8.72	M = 9.09	M = 8.50	M = 8.89	M = 8.69	M = 9.18	M = 8.55	M = 8.38	M = 8.80	M = 9.12	M = 8.60
Control (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	*0.00	1.00	0.86	*0.04	1.00	0.97	0.32	0.19	*0.00	1.00	0.72	0.47
1,247.36 (28)	*0.00	0.20	1.00	*0.00	1.00	0.11	1.00	*0.00	*0.00	0.70	1.00	*0.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.02	1.00	*0.00	0.66	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	0.15	1.00	*0.00
1,247.36 (84)	*0.00	1.00	0.95	*0.02	1.00	0.89	0.50	0.10	*0.00	1.00	0.87	0.30
20,000 (0)	1.00	0.89	*0.00	1.00	0.06	0.97	*0.00	1.00	1.00	0.38	*0.00	1.00
20,000 (28)	*0.03	1.00	0.09	0.72	1.00	1.00	*0.00	0.97	0.10	1.00	*0.04	1.00
20,000 (56)	*0.00	0.19	1.00	*0.00	1.00	0.10	1.00	*0.00	*0.00	0.68	1.00	*0.00
20,000 (84)	0.61	1.00	*0.00	1.00	0.34	1.00	*0.00	1.00	0.89	0.89	*0.00	1.00

ANEXO XXV. TABLA 4 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE PH EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
35,000 (0)	-	*0.04	*0.00	1.00	*0.00	0.09	*0.00	0.86	1.00	*0.00	*0.00	0.54
35,000 (28)	*0.04	-	0.06	0.81	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.14	1.00	*0.04	1.00
35,000 (56)	*0.00	0.06	-	*0.00	0.90	*0.03	1.00	*0.00	*0.00	0.36	1.00	*0.00
35,000 (84)	1.00	0.80	*0.00	-	*0.04	0.92	*0.00	1.00	1.00	0.28	*0.00	1.00
50,000 (0)	*0.00	1.00	0.90	*0.04	-	0.94	0.38	0.15	*0.00	1.00	0.79	0.40
50,000 (28)	0.89	1.00	*0.03	0.92	0.95	-	*0.00	1.00	0.25	1.00	*0.02	1.00
50,000 (56)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	0.39	*0.00	-	*0.00	*0.00	0.06	1.00	*0.00
50,000 (84)	0.86	0.99	*0.00	1.00	0.15	1.00	*0.00	-	0.99	0.66	*0.00	1.00
70,000 (0)	1.00	0.14	*0.00	1.00	*0.00	0.25	*0.00	1.00	-	0.18	*0.00	0.84
70,000 (28)	*0.00	1.00	0.36	0.28	1.00	1.00	0.58	0.66	*0.02	-	0.24	0.93
70,000 (56)	*0.00	*0.03	1.00	*0.00	0.78	*0.02	1.00	*0.00	*0.00	0.24	-	*0.00
70,000 (84)	0.54	1.00	*0.00	1.00	0.40	1.00	*0.00	1.00	0.84	0.93	*0.00	-

**ANEXO XXVI. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIPLE. FOSFATOS EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO Y A DIFERENTES TIEMPOS.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Significancia</b>
<b>Concentración</b>	5	3.774.06	1.204.16	0.000
<b>Tiempo</b>	3	726.34	231.75	0.000
<b>Concentración/Tiempo</b>	15	2.020.39	644.63	0.000
<b>Error</b>	24	3.13	-	-

**ANEXO XXVII. ANÁLISIS DE VARIANZA MULTIPLE. FOSFATOS EN PLANTAS DE JITOMATE A DIFERENTES  
CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO Y A DIFERENTES TIEMPOS.**

<b>Fuente de variación</b>	<b>Grados de libertad</b>	<b>Cuadrado medio</b>	<b>F calculada</b>	<b>Significancia</b>
<b>Concentración</b>	5	1.382.13	171.24	0.00
<b>Tiempo</b>	3	655.17	81.17	0.00
<b>Concentración/Tiempo</b>	15	870.41	107.84	0.00
<b>Error</b>	24	8.07	-	-

ANEXO XXVIII. TABLA 1 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $p < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE FRIJOL A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
	M = 30.35	M = 33.35	M = 42.10	M = 25.45	M = 87.20	M = 33.35	M = 44.42	M = 33.71	M = 156.90	M = 81.05	M = 43.90	M = 92.57
Control (0)	-	1.00	*0.00	0.50	*0.00	1.00	*0.00	0.95	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	1.00	-	*0.01	*0.02	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.00	*0.01	-	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.01	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
Control (84)	0.50	*0.02	*0.00	-	*0.00	*0.02	*0.00	*0.01	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.17	*0.00	0.35
1,247.36 (28)	1.00	1.00	*0.01	*0.02	*0.00	-	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
1,247.36 (84)	0.95	1.00	*0.01	*0.01	*0.00	1.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.17	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00
20,000 (56)	*0.00	*0.00	*1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00
20,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.35	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-

Hoja 1 de 4

**ANEXO XXIX. TABLA 2 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE (P < 0.05). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).**

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
35,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	*0.02	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (28)	1.00	0.22	*0.00	1.00	*0.00	0.22	*0.00	0.16	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.02	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00
35,000 (84)	1.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	0.08	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (28)	*0.00	*0.00	0.34	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.90	*0.00
50,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (84)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
70,000 (0)	1.00	1.00	*0.00	0.08	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
70,000 (28)	*0.00	*0.00	0.34	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.90	*0.00
70,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
70,000 (84)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.00

ANEXO XXX. TABLA 3 DE 4. PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
	M =33.3	M = 27.50	M = 95.52	M = 122.79	M = 32.30	M = 47.50	M = 62.23	M = 44.16	M = 32.30	M = 47.50	M = 62.23	M = 44.16
Control (0)	1.00	1.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (28)	1.00	0.22	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.34	*0.00	1.00	*0.00	0.34	*0.00	1.00
Control (84)	*0.02	1.00	*0.00	*0.00	0.77	*0.00	*0.00	*0.00	0.08	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (0)	*0.00	0.00	*0.01	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (28)	1.00	0.22	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	1.00	*0.00	1.00
1,247.36 (84)	1.00	0.16	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.90	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00
20,000 (84)	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00

ANEXO XXXI. TABLA 4 DE 4. PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE FRIJOL DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
35,000 (0)	-	0.24	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (28)	0.24	-	*0.00	*0.00	0.53	*0.00	*0.00	*0.00	0.53	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (0)	1.00	0.53	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	0.95	*0.00	1.00	*0.00	0.95
50,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
50,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.95	*0.00	-	*0.00	0.95	*0.00	1.00
70,000 (0)	1.00	0.53	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00
70,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	0.95	*0.00	-	*0.00	0.95
70,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00
70,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.95	*0.00	1.00	*0.00	0.95	*0.00	-

ANEXO XXXII. TABLA 1 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE (P < 0.05). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
	M=33.3	M=27.15	M=41.15	M=47.90	M=109.79	M=39.80	M=54.70	M=51.17	M=92.74	M=48.05	M=32.73	M=56.55
Control (0)	-	0.85	0.50	*0.00	*0.00	0.79	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00
Control (28)	0.85	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.02	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.93	0.13
Control (56)	0.50	*0.00	-	0.74	*0.00	1.00	*0.01	0.15	*0.00	0.71	0.38	1.00
Control (84)	*0.00	*0.00	0.74	-	*0.00	0.45	0.73	1.00	*0.00	1.00	*0.00	0.10
1,247.36 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (28)	0.79	*0.02	1.00	0.45	*0.00	-	*0.00	0.06	*0.00	0.42	0.67	1.00
1,247.36 (56)	*0.00	*0.00	*0.01	0.73	*0.00	*0.00	-	1.00	*0.00	0.76	*0.00	*0.00
1,247.36 (84)	*0.00	*0.00	0.15	1.00	*0.00	0.06	1.00	-	*0.00	1.00	*0.00	*0.00
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (28)	*0.00	*0.00	0.71	1.00	*0.00	0.42	0.76	1.00	*0.00	-	*0.00	0.10
20,000 (56)	1.00	0.93	0.38	*0.00	*0.00	0.67	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	1.00
20,000 (84)	1.00	0.13	1.00	0.11	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.10	1.00	-

ANEXO XXXIII. TABLA 2 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE (P < 0.05). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	Control (0)	Control (28)	Control (56)	Control (84)	1,247.36 (0)	1,247.36 (28)	1,247.36 (56)	1,247.36 (84)	20,000 (0)	20,000 (28)	20,000 (56)	20,000 (84)
35,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	0.34	*0.00	*0.00	1.00	0.95	*0.00	0.37	*0.00	*0.00
35,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.04	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
35,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (0)	0.18	*0.00	1.00	1.00	*0.00	1.00	*0.04	0.45	*0.00	1.00	0.12	0.92
50,000 (28)	1.00	0.07	1.00	0.20	*0.00	1.00	*0.00	*0.01	*0.00	0.18	0.93	1.00
50,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	0.31	*0.00	*0.00	1.00	0.93	0.00	0.34	*0.00	*0.00
70,000 (0)	1.00	0.46	0.88	*0.02	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.01	1.00	1.00
70,000 (28)	1.00	0.95	0.34	*0.00	*0.00	0.62	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00
70,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.04	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
70,000 (84)	0.14	*0.00	1.00	1.00	*0.00	1.00	0.06	0.52	*0.00	1.00	0.09	0.87

Hoja 2 de 4

ANEXO XXXIV. TABLA 3 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACION (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
	M=56.5	M=77.0	M=66.9	M=94.9	M=43.5	M=38.0	M=68.7	M=56.3	M=35.0	M=32.0	M=66.0	M=43.41
Control (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.18	1.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	*0.00	0.14
Control (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.07	*0.00	*0.00	0.46	0.95	*0.00	*0.00
Control (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	*0.00	*0.00	0.88	0.34	*0.00	1.00
Control (84)	0.34	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.20	*0.00	0.31	*0.02	*0.00	*0.00	1.00
1,247.36 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
1,247.36 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	*0.00	*0.00	1.00	0.62	*0.00	1.00
1,247.36 (56)	1.00	*0.00	*0.04	*0.00	*0.05	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.06
1,247.36 (84)	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.45	*0.02	*0.00	0.93	*0.00	*0.00	*0.00	0.52
20,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
20,000 (28)	0.37	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.18	*0.00	0.34	*0.00	*0.00	*0.00	1.00
20,000 (56)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.12	0.93	*0.00	*0.00	1.00	1.00	*0.00	0.09
20,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.92	1.00	*0.02	*0.00	1.00	1.00	*0.00	0.86

ANEXO XXXV. TABLA 4 DE 4 PRUEBA DE TUKEY MULTIPLE ( $P < 0.05$ ). INDICA LAS DIFERENCIAS DE FOSFATOS EN PLANTAS DE JITOMATE DE ACUERDO A LAS CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO EN DIFERENTES TIEMPOS (\*).

CONCENTRACIÓN (mg/kg) / TIEMPO (días)	35,000 (0)	35,000 (28)	35,000 (56)	35,000 (84)	50,000 (0)	50,000 (28)	50,000 (56)	50,000 (84)	70,000 (0)	70,000 (28)	70,000 (56)	70,000 (84)
35,000 (0)	-	*0.00	0.16	*0.00	*0.01	*0.00	*0.03	1.00	*0.00	*0.00	0.16	*0.01
35,000 (28)	*0.00	-	0.06	*0.00	*0.00	*0.00	0.28	*0.00	*0.00	*0.00	0.06	*0.00
35,000 (56)	0.16	0.06	-	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.18	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
35,000 (84)	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
50,000 (0)	*0.01	*0.00	*0.00	*0.00	-	0.98	*0.00	*0.00	0.51	0.11	*0.00	1.00
50,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.98	-	*0.00	*0.00	1.00	0.91	*0.00	0.97
50,000 (56)	*0.03	0.28	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	-	*0.03	*0.00	*0.00	1.00	*0.00
50,000 (84)	1.00	*0.00	0.18	*0.00	*0.00	*0.00	0.03	-	*0.00	*0.00	0.18	*0.01
70,000 (0)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.51	1.00	*0.00	*0.00	-	1.00	*0.00	0.43
70,000 (28)	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00	0.11	0.90	*0.00	*0.00	1.00	-	*0.00	0.08
70,000 (56)	0.16	0.06	1.00	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	0.18	*0.00	*0.00	-	*0.00
70,000 (84)	*0.01	*0.00	*0.00	*0.00	1.00	1.00	*0.00	*0.01	0.43	0.82	*0.00	-

**ANEXO XXXVI. ANÁLISIS DE VARIANZA. PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO A LOS 16 DÍAS.**

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculada	Significancia
Entre concentración	484.59	4	121.14	12.35	0.000
Error	98.09	10	9.80		-

**ANEXO XXXVII. PRUEBA DE TUKEY (P < 0.05). VALORES QUE INDICA LAS DIFERENCIAS (\*) ENTRE LAS MEDIAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL A LOS 16 DÍAS.**

CONCENTRACIÓN (mg/kg)	1,247.36	10,000	20,000	30,000	40,000
	M = 15.69	M = 29.33	M = 30.06	M = 30.21	M = 29.92
1,247.36	-	*0.00	*0.00	*0.00	*0.00
10,000	*0.00	-	1.00	1.00	1.00
20,000	*0.00	1.00	-	1.00	1.00
30,000	*0.00	1.00	1.00	-	1.00
40,000	*0.00	1.00	1.00	1.00	-

ANEXO XXXVIII. ANÁLISIS DE VARIANZA. PRODUCCIÓN DE CO<sub>2</sub> A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL EN EL SUELO DESPUÉS DE LOS 16 DÍAS.

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado Medio	F calculada	Significancia
Entre concentración	4,048.25	4	1,012.06	4.52	0.024
Error	2,239.04	10	223.90		-

ANEXO XXXIX. PRUEBA DE TUKEY (P < 0.05). VALORES QUE INDICA LAS DIFERENCIAS (\*) ENTRE LAS MEDIAS DE LAS DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DIESEL DESPUÉS DE LOS 16 DÍAS.

CONCENTRACIÓN (mg/kg)	1,247.36	10,000	20,000	30,000	40,000
	M = 145.05	M = 154.88	M = 190.52	M = 168.81	M = 179.96
1,247.36	-	*0.03	1.00	0.36	0.09
10,000	*0.03	-	0.09	1.00	0.31
20,000	1.00	0.09	-	0.44	1.00
30,000	0.36	1.00	0.44	-	1.00
40,000	0.09	0.31	1.00	1.00	-

**ANEXO XL. VALORES DE REFERENCIA  
DE PH PARA CLASIFICACIÓN DEL SUELO (NOM-021-SEMARNAT 2000).**

<b>Clasificación</b>	<b>pH</b>
Fuertemente ácido	< 5.0
Moderadamente ácido	5.1 – 6.5
Neutro	6.6 – 7.3
Medianamente alcalino	7.4 – 8.5
Fuertemente alcalino	> 8.5

**ANEXO XLI. VALORES DE REFERENCIA  
DE FÓSFORO. NOM-021-SEMARNAT 2000.**

<b>Clase</b>	<b>Fosforo <sup>3</sup>(mg kg)<sup>-1</sup></b>
<b>Bajo</b>	< 5.5
<b>Medio</b>	5.5–11
<b>Alto</b>	> 11

## ANEXO XLII.

NOMINACIÓN PARA SUELOS TÍPICOS.<sup>1</sup> VÁZQUEZ Y BAUTISTA 1993; <sup>2</sup>TAVERA 1985.

Nominación	Nitrógeno <sup>1,2</sup>
	(mg/kg)
Extremadamente pobre	< 320
Pobre	320–630
Regular	640–950
Medianamente rico	960–1260
Rico	1270–1580
Muy rico	1590–2210
Extremadamente rico	> 2210