



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DEL DIESEL SOBRE LA GERMINACIÓN Y
CRECIMIENTO DE SEMILLAS DE ALFALFA (*Medicago sativa*) y
DE RABANITO (*Raphanus sativus*) UTILIZANDO SUELOS DE
USOS INDUSTRIAL Y AGRÍCOLA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

MARIANA RIVERA MOTA



TUTORA

DRA. SUSANA SAVAL BOHÓRQUEZ

2008



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.

AGRADECIMIENTOS

A la **Dra. Susana Saval** por el apoyo técnico y económico brindado para la realización de este trabajo.

A los **miembros del jurado** por sus valiosas correcciones y sugerencias hechas a este trabajo escrito.

A todo el **equipo de trabajo de Caracterización y remediación de suelos y acuíferos** del Instituto de Ingeniería de la UNAM, por el asesoramiento y apoyo que me dieron para realizar mi experimentación.

A la **M. Rosa Zugazagoitia** por la asesoría en la redacción y en la nomenclatura química.

Al **Dr. David Flores** por el asesoramiento en el diseño del experimento.

Al **Dr. Zenón Cano** por el asesoramiento estadístico de este trabajo.

Al **Ing. Eladio Cabrales** y al **Sr. Gonzalo Roque**, por la ayuda en el montaje del experimento.

A **mi papá, Rigoberto Rivera y a mis hermanos, Melissa e Israel**, por la ayuda y apoyo que me brindaron en todo momento.

A **mi mamá, Tomasa Mota**, por todas sus enseñanzas dadas y aunque sólo estuvo presente en la primera fase de este trabajo, me dejó un gran ejemplo a seguir.

A **Imuris**, por ser mi compañera de trabajo a lo largo de la planeación, montaje y realización de este experimento, gracias porque creo que hicimos un buen equipo.

A **Jorge**, mi ayudante estrella, por el apoyo durante el experimento y la realización del trabajo escrito, y a todos los **compañeros y amigos** que colaboraron conmigo de alguna forma para poder realizar este trabajo.

ÍNDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	1
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
OBJETIVOS	3
HIPÓTESIS	4
I. MARCO TEÓRICO	5
A. EL SUELO Y SUS CARACTERÍSTICAS	5
B. PROCESOS QUE AFECTAN AL TRANSPORTE DE HIDROCARBUROS EN EL SUELO	10
a. Solubilización	10
b. Evaporación	11
c. Volatilización	11
d. Sorción o Retención	12
C. TRANSFORMACIONES DE LOS HIDROCARBUROS EN EL SUELO	14
a. Transformaciones Abióticas	14
b. Transformaciones Bióticas	14
<i>i. Hidrocarburos alifáticos</i>	16
<i>ii. Hidrocarburos alicíclicos</i>	18
<i>iii. Hidrocarburos aromáticos</i>	19
D. CARACTERÍSTICAS DEL DIESEL	21
a. Efectos Tóxicos del Diesel	24
<i>i. En mamíferos</i>	24
1. <u>Benceno, Xileno y Tolueno</u>	25
2. <u>Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP's)</u>	25
3. <u>Quinolina, Cresoles, Fenoles y N-Nitrosodifenilamina</u>	25
<i>ii. En plantas</i>	26
E. CONCEPTOS DE TOXICIDAD Y USO DE PLANTAS COMO INDICADORES	27
a. Evaluación de la Toxicidad en Plantas	28
b. Guías de Pruebas de Toxicidad	29
F. ESTUDIOS DE TOXICIDAD ENCONTRADOS EN LA LITERATURA	31
G. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ALFALFA Y DEL RABANITO	39
a. Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	39
b. Rabanito (<i>Raphanus sativus</i>)	41

II. METODOLOGÍA	42
A. DESARROLLO EXPERIMENTAL	42
a. Obtención de los Lotes de Suelo	42
b. Caracterización Inicial del Suelo	44
c. Selección de Semillas	43
d. Pruebas de Toxicidad al Diesel	44
<i>i. Primera etapa experimental (suelo industrial)</i>	44
1. <u>Diseño del experimento</u>	44
2. <u>Siembra</u>	45
3. <u>Monitoreo</u>	45
4. <u>Cosecha</u>	46
5. <u>Pruebas de toxicidad en la germinación</u>	46
6. <u>Procesamiento de los datos</u>	46
<i>ii. Segunda etapa experimental (suelo agrícola)</i>	47
B. TÉCNICAS ANALÍTICAS	48
a. Caracterización Física y Química del Suelo	48
b. Pruebas de la Germinación de las Semillas	49
III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
A. CARACTERIZACIÓN INICIAL FÍSICA Y QUÍMICA DEL SUELO	50
B. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DEL DIESEL SOBRE LA GERMINACIÓN	53
C. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL DIESEL SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO	58
a. Altura del Tallo	58
b. Longitud de la Raíz	60
c. Biomasa	61
d. Número de Hojas	62
e. Fruto	63
D. PARÁMETROS QUÍMICOS DEL SUELO	69
a. pH	69
b. Fósforo	72
c. Nitrógeno total	75
d. Diesel Residual	77

E. FACTORES AMBIENTALES DEL EXPERIMENTO	79
a. Humedad del suelo	79
b. Temperatura ambiental	79
IV. CONCLUSIONES	82
V. RECOMENDACIONES	84
REFERENCIAS	85
ANEXO	V

RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto del diesel sobre la germinación y desarrollo de dos especies de plantas: alfalfa (*Medicago sativa*) y rabanito (*Raphanus sativus*).

Para esto se realizó un experimento en macetas de 2.5 kg, en las que se sembraron las semillas de alfalfa y de rabanito a diferentes concentraciones de diesel en el suelo.

La experimentación se llevó a cabo en dos etapas, la primera fue utilizando un suelo industrial, en la segunda etapa se utilizó un suelo agrícola. Previamente se caracterizaron los dos lotes de suelo utilizados.

El suelo industrial se dividió en 60 unidades experimentales distribuidas en cinco grupos a los que se les aplicó, una determinada concentración de diesel (20000, 35000, 50000 y 70000 mg/kg) además de un control con una mínima concentración de diesel residual (1243 mg/kg). Cada concentración se manejó por cuadruplicado para las dos especies de plantas además de un control sin plantas.

El suelo agrícola se dividió en 45 unidades experimentales y solamente se aplicaron dos concentraciones de diesel (20000 y 50000 mg/kg), además de un control sin diesel. Cada condición se manejó por triplicado para las dos especies de plantas, junto con un control sin plantas.

Una vez preparadas las macetas con el suelo a las diferentes concentraciones de diesel, se sembraron las semillas, y una vez que germinaron se dejaron solamente cinco plantas hasta terminar el experimento. De manera inicial y después mensualmente se tomaron muestras de suelo de las macetas para dar seguimiento a algunos parámetros como humedad, pH, nitrógeno y fósforo. El tiempo del experimento fue de 56 días para el rabanito, por tener un ciclo corto y 84 días para la alfalfa. Al finalizar el tiempo de cultivo se cosecharon las plantas, se midieron y pesaron en seco; los resultados se compararon mediante análisis estadístico. De manera paralela se realizaron pruebas de toxicidad en la germinación de las semillas, a nivel de caja de Petri, en los dos suelos y con los mismos tratamientos aplicados en el experimento.

Los resultados indicaron que el rabanito 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. La importancia de contar con plantas cuyo desarrollo sea resistente al diesel permite utilizarlas como indicadoras de toxicidad de un suelo contaminado o sometido a remediación.

INTRODUCCIÓN

México ocupa el quinto lugar mundial en reservas de petróleo crudo, lo cual constituye el principal producto de exportación, además de ser la principal fuente de energía. La intensa actividad petrolera ocasiona problemas durante la explotación, almacenamiento, transporte, y uso de crudo y sus derivados.

El diesel es un producto obtenido de la refinación del petróleo, su intenso uso, la falta de una cultura ambiental y los accidentes, son la causa de problemas ambientales derivados de fugas, derrames y explosiones principalmente durante su almacenamiento y transporte. En México, tan sólo en el periodo de 1993 a 1997 se registraron 110 accidentes en los que el diesel estuvo presente; por lo que ocupa el tercer lugar en la lista de accidentes con sustancias que contaminan el suelo.

El principal problema ambiental que ocasiona el diesel es la contaminación de suelos y acuíferos; en algunos casos hay efectos a la salud debido a la presencia de algunos de sus componentes que se sabe son carcinógenos o causan efectos sobre el sistema nervioso y la piel en animales de laboratorio.

Existen distintas técnicas para reducir o eliminar los efectos de la contaminación con diesel en suelo, entre ellas la biorremediación ha resultado económica y efectiva. Ésta se fundamenta en la capacidad de degradación de los microorganismos del suelo para transformar los contaminantes en compuestos menos tóxicos. Dentro de estas técnicas se incluye el uso de plantas en donde se promueve el crecimiento de los microorganismos asociados a sus raíces; además se sabe que algunas plantas absorben ciertos contaminantes del suelo, transportándolos a sus tejidos.

Mediante el uso de plantas también se puede evaluar la toxicidad de un contaminante y los efectos sobre su desarrollo y sobre el ecosistema en general. En los estudios de fitotoxicidad se busca también conocer las concentraciones de contaminante a las cuales ciertas plantas sobreviven. Sin embargo, la sensibilidad de las plantas varía respecto a la especie, por lo que es necesario hacer estudios con diversas plantas y diferentes tipos de contaminantes.

Los estudios de fitotoxicidad llevan un registro de los parámetros cuantificables en el desarrollo de las plantas como son: germinación, altura y biomasa, para determinar el grado en que es afectada una planta por la presencia de un contaminante en el suelo.

Los estudios de fitotoxicidad son, por lo tanto, una herramienta útil para evaluar las condiciones ambientales de un suelo, es por esto que, a nivel mundial se han intensificado sobre una gran variedad de plantas. El inconveniente es que en su mayoría se utilizan plantas que son de poco interés en México, por lo que se hace necesario realizar estudios sobre especies comúnmente utilizadas o comerciales que además aseguren su viabilidad y capacidad germinativa.

Por otro lado, evaluar el grado de afectación que tiene un suelo en algunos de sus parámetros, junto con los estudios de toxicidad en las plantas, permitirá reconocer qué factores del suelo son alterados a tal grado que afecten al crecimiento de las plantas.

Con base en lo anterior este estudio se enfoca a evaluar los efectos tóxicos del diesel en dos especies comunes de plantas: el rabanito (*Raphanus sativus*) y la alfalfa (*Medicago sativa*), así como los efectos que produce el diesel sobre el suelo.

LISTA DE TABLAS

Capítulo I

I.1 Características de las partículas de un suelo con densidad relativa (ρ_p)= 2.65 (Aguilera,1989)	7
I.2 Clasificación de suelos según el pH (Pepper et al., 1996)	9
I.3 Características del diesel (Jiménez, 2001)	22
I.4 Compuestos químicos encontrados en el diesel (Stone,1991,modificado)	23
I.5 Movilidad de los compuestos químicos del diesel (Stone, 1991, modificado)	24
I.6 Especies vegetales recomendadas para pruebas de fitotoxicidad (OEDC, 2003; EPA a b,1996; FDA, 1987; Paez, 2000)	30
I.7 Efectos del petróleo crudo en el porcentaje de germinación (Salanitro et al., 1997)	32
I.8 Comparación de la germinación y crecimiento de cebada en tres tipos de suelo (Li et al., 1997)	32
I.9 Medias de las medidas tomadas en las plantas de alfalfa a los 12 meses de siembra (Wiltse et al., 1998)	33
I.10 Porcentajes de germinación de especies de plantas expuestas a diferentes concentraciones de diesel. (Adam and Duncan, 1999)	35
I.11 Índices de tolerancia de raíces (ITR) y tallo (ITT) en suelo contaminado con diesel (Cervantes, 1999)	36
I.12 Porcentajes de germinación obtenidos para frijol, maíz y trigo (Paez, 2000)	37
I.13 Valores de longitud de tallo y raíz obtenidos para frijol, maíz y trigo (Paez, 2000)	37
I.14 Porcentajes de germinación y emergencia para alpiste y jitomate en tres concentraciones de diesel residual (Domínguez, 2001)	38
I.15 Promedios de parámetros obtenidos para 11 variedades de frijol criollo a concentraciones de 25000 mg/kg de petróleo crudo (Quiñónez – Aguilar et al., 2003) ...	39

Capítulo III

III.1 Características físicas y químicas de los suelos empleados	50
III.2 Nominación para suelos típicos (Aguilera, 1989; Vázquez and Bautista, 1993; Tavera, 1985)	51
III.3 Porcentaje de germinación de las semillas en los suelos industrial y agrícola a diferentes Concentraciones de diesel	54
III.4 Altura de tallo de la alfalfa y del rabanito, en suelos industrial y agrícola a diferentes Concentraciones de diesel	58
III.5 Longitud de la raíz de la alfalfa y del rabanito, en suelos industrial y agrícola a diferentes C oncentraciones de diesel	60
III.6 Biomasa de alfalfa y de rabanito en suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel	61
III.7 Número de hojas de la alfalfa y del rabanito en suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel	62
III.8 Variación del pH en el suelo industrial, donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito.....	69
III.9 Variación del pH en el suelo agrícola, donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito	71
III.10 Concentraciones de fósforo (mg/kg) en suelo industrial donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito	72

III.11 Concentraciones de fósforo (mg/kg) en el suelo agrícola donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito	74
III.12 Concentración de nitrógeno total (mg/kg) en el suelo industrial, donde fueron cultivados la alfalfa y el rabanito	75
III.13 Concentraciones de diesel residual y porcentaje de degradación en suelo industrial donde fueron cultivados la alfalfa y el rabanito	78

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

I.1 Perfil típico de suelo en el que se muestran los diferentes horizontes (Tarbuck and Lutgens, 2000)	6
I.2 Transferencia de fases de un contaminante puro en agua y aire: 1) evaporación, 2) solubilización, 3) volatilización y 4) sorción. (Pepper et al, 1996)	10
I.3 Uso de plantas en la biorremediación y sus principales rutas de descontaminación (Adaptado de Pepper et al., 1996)	15
I.4 Rutas de degradación de compuestos alifáticos (Pepper et al.,1996, modificado)	17
I.5 Rutas de biodegradación del ciclohexano por un consorcio microbiano (Atlas and Bartha, 1993, modificado)	19
I.6 Rutas de transformación de compuestos aromáticos mediante bacterias y hongos (Pepper et al., 1996, modificado)	20

Capítulo III

III.1 Prueba de germinación de la alfalfa a diferentes concentraciones de diesel en suelo industrial	56
III.2 Prueba de germinación del rabanito a diferentes concentraciones de diesel en suelo industrial	56
III.3 Prueba de germinación de la alfalfa a diferentes concentraciones de diesel en suelo agrícola	57
III.4 Prueba de germinación del rabanito a diferentes concentraciones de diesel en suelo agrícola	57
III.5 Desarrollo de las plantas de alfalfa sembradas en suelo industrial a diferentes concentraciones de diesel	65
III.6 Desarrollo de las plantas de rabanito sembradas en suelo industrial a diferentes concentraciones de diesel	66
III.7 Desarrollo de las plantas de alfalfa en suelo agrícola control y con una concentración de diesel de 20000 mg/kg	67
III.8 Desarrollo de plantas de rabanito sembradas en suelo agrícola control y con una concentración de diesel de 20000 mg/kg	68
III.9 Variación de la temperatura media en el experimento para el suelo industrial	80
III.10 Variación de la temperatura media en el experimento para el suelo agrícola	81

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto del diesel sobre la germinación y crecimiento de alfalfa (*Medicago sativa*) y de rabanito (*Raphanus sativus*) utilizando suelos de usos industrial y agrícola.

Objetivos particulares

Determinar las concentraciones de diesel en suelo que permiten la germinación de las semillas de alfalfa (*M. sativa.*) y rabanito (*R. sativus*)

Determinar si la concentración de diesel en el suelo afecta el crecimiento y desarrollo de las plantas de alfalfa y rabanito, además de si existen diferencias significativas en el desarrollo de las plantas entre ambas especies.

Comparar el crecimiento de las dos especies de plantas en un suelo industrial y un suelo agrícola contaminados con diesel.

Determinar los efectos de la contaminación con diesel sobre ciertos parámetros del suelo, como pH, contenido de fósforo y nitrógeno en ambos suelos.

Determinar la concentración de diesel en suelo a lo largo del experimento, para las dos especies de plantas.

HIPÓTESIS

El rabanito es una planta más resistente a condiciones de estrés que la alfalfa; por lo tanto, a una concentración conocida de diesel habrá mayor germinación y crecimiento de rabanito (*R. sativus*) que de alfalfa (*M.sativa*).

Por otro lado, la degradación del diesel en el suelo se verá favorecida por la existencia de plantas, esto es debido a que las plantas permiten mayor crecimiento de microorganismos alrededor de sus raíces y muchos de ellos pueden ser degradadores de diesel.

I. MARCO TEÓRICO

A. EL SUELO Y SUS CARACTERÍSTICAS

El suelo sirve como medio para el desarrollo de las plantas y muchas formas de vida animal (Aguilera, 1989). Se le puede definir como el producto de la intemperización de la roca parental, por la acción del clima, organismos vivos y otros fenómenos naturales un lugar específico (Pepper et al., 1996).

Al suelo lo componen una mezcla de materia mineral, materia orgánica, agua y aire. En condiciones ideales, estos componentes se encuentran en una proporción aproximada de 45% materia mineral, 5% materia orgánica, 25 % agua y 25 % aire. Estas proporciones varían con el tiempo y de un lugar a otro; de hecho se sabe que el volumen de agua y de aire tienen una relación inversamente proporcional entre sí, ya que al entrar agua en el suelo, se elimina el aire de los espacios porosos; por el contrario, al eliminarse el agua por medio del drenaje, la evaporación o el crecimiento de la planta, el espacio poroso que estaba ocupado por el agua es llenado de nuevo con aire (Foth and Turk, 1981). La materia orgánica es un componente biótico producto de microorganismos y plantas.

A la región del suelo no saturada que se extiende desde la superficie a la capa superior del manto freático se le llama zona vadosa y es una zona del suelo fuertemente impactada por derrames de hidrocarburos (Sims, 1990).

El suelo está formado de distintas capas llamadas **horizontes**, las cuales son producto de los procesos de formación de éste (Figura I.1). Un suelo típico contiene una capa superior oscura rica en materia orgánica, denominada horizonte Q. Ésta se encuentra seguida de una zona menos oscura donde la materia orgánica transformada o humificada se acumula, llamada horizonte A. Debajo de éste existe un horizonte E o eluvial, caracterizado por una remoción de nutrientes y materia orgánica, mediante el agua. El horizonte inferior, B, está caracterizado por la iluviación o acumulación de componentes, generalmente minerales, provenientes del horizonte E.

El horizonte siguiente, es el C, el cual contiene a la roca madre no consolidada semejante a la que ha dado origen al material del que se formó el suelo. Por último, el horizonte R, es la roca consolidada. Sin embargo, es importante señalar que no todos los suelos presentan cada uno de estos horizontes (Porta et al., 1999).

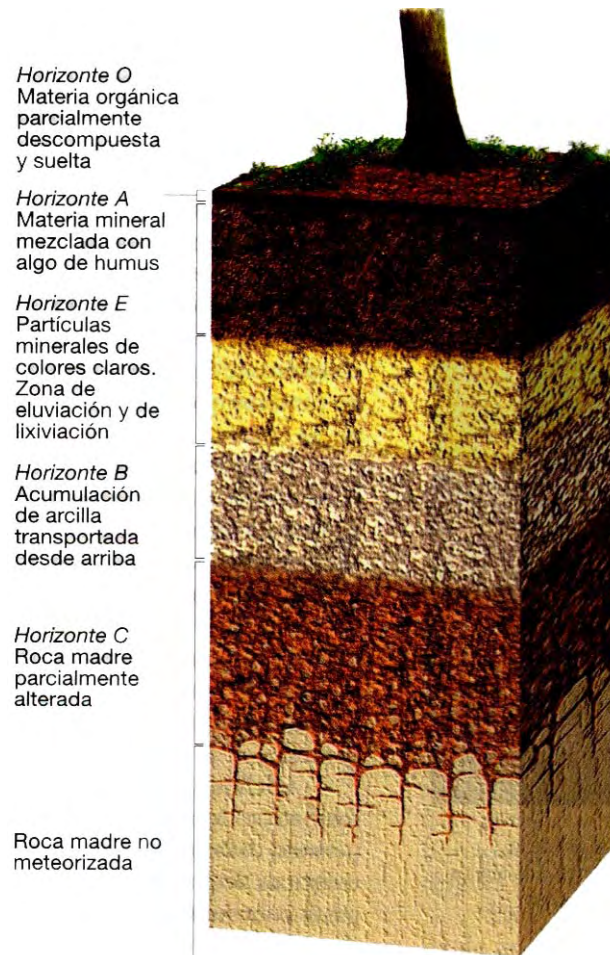


Fig. I.1 Perfil típico de suelo en el que se muestran los diferentes horizontes (Tarbuck and Lutgens, 2000)

Los suelos se clasifican según las características que presenten. Existen suelos que han sido fuertemente modificados por actividades humanas y no presentan horizontes diagnósticos, a los que se les llama **regosoles** (FAO, 1998). Los regosoles a su vez se han dividido según la Base de Referencia Mundial para los Recursos de Suelos, diferenciándolos en materiales áricos, gárbicos, redúcticos, espólicos y úrbicos. Estos últimos principalmente, son suelos que presentan o no artefactos o fragmentos de objetos manufacturados recientemente, ladrillos, papel, cristal, hormigón, plástico, entre otros. Pueden haber sido compactados con bulldozer o removidos por excavaciones para construcciones. Este suelo puede estar sometido a diversos tipos de contaminación, por la industria, minería, fábricas, depósitos de almacenamiento, dependiendo del uso del suelo. El suelo industrial empleado en este estudio corresponde a esta clasificación.

La **fase mineral** del suelo se encuentra compuesta comúnmente por tres tipos de partículas primarias: arena, limo y arcilla, las cuales son clasificadas con base en el tamaño de partícula como se muestra en la Tabla I.1. Cabe señalar que existen también elementos gruesos, que son partículas con tamaños mayores a 2 mm, como grava y piedras.

Tabla I.1 Características de las partículas de un suelo con densidad relativa (ρ_p)= 2.65 (Aguilera, 1989)

Partículas primarias	Diámetro (mm)	Número de partículas por gramo	Área superficial cm^2/g
Arena	2 – 0.02	154 900	79
Limo	0.02 – 0.002	5776000	454
Arcilla	Menor a 0.002	90260853000	8000000

La **textura** es la proporción relativa de arena, limo y arcilla, que hay en un suelo y es importante conocerla porque tiene efectos sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo.

De estos tres tipos de partículas, el contenido de arcilla es el que tiene un efecto más determinante sobre las propiedades de un suelo; esto se debe a su gran área superficial, que permite la retención del agua, almacenaje de ciertos nutrientes y cationes orgánicos e inorgánicos en su superficie, además de que es el único tipo de partícula que tiene carga eléctrica asociada, generalmente negativa (Aguilera, 1989). El limo y arena tienen un efecto menor sobre las propiedades del suelo, al ser partículas mayores afectan al movimiento de agua y de aire (Foth, 1990).

En general los suelos se pueden dividir en textura fina y gruesa. Los suelos con textura fina son en los que predomina la arcilla (mayor a 35%), en éstos habrá mayor absorción de nutrientes y agua. Los suelos de textura gruesa tienen proporciones grandes de arena o limo (mayores a 65%), los cuales tienen poros grandes y permiten una rápida infiltración del agua (Aguilera, 1989).

Las partículas primarias del suelo normalmente no se encuentran en forma individual, por lo que forman agregados de mayor tamaño. Éstos generalmente se mantienen unidos por productos del metabolismo de microorganismos, hifas de hongos y raíces de plantas, así como por la proporción de arcilla, entre otros. Los agregados pueden ser de diferente tamaño, forma y grado, que indica la cohesión de las partículas.

La **estructura**, es la propiedad del suelo de formar agregados en diferentes formas y tamaños, es importante porque influye en las propiedades físicas y biológicas del suelo. La formación de agregados en el suelo promueve **espacios porosos** llenos de aire y agua, que permiten el crecimiento de organismos y de las raíces de las plantas. Los poros también pueden ser incrementados por las raíces de las plantas, lombrices, insectos o pequeños mamíferos que abren túneles y facilitan la aeración. El suelo que no tiene una estructura y que consiste en partículas individuales, se le llama masivo (Porta et al., 1996).

La **humedad** del suelo está en relación con los espacios porosos. El agua es retenida por los suelos debido a las fuerzas de adsorción de las partículas de la materia orgánica y de los elementos inorgánicos, así como por las moléculas de agua que se suman a las fuerzas cohesivas de otras moléculas de agua adyacentes. El resultado de estas fuerzas son delgadas películas de agua que se retienen sobre la superficie de las partículas del suelo, pero también da lugar a delgadas películas de agua más móviles que se desplazan lateral y verticalmente por efecto de la gravedad (Aguilera, 1989). Al agua que se mueve por la fuerza de gravedad se le denomina agua libre o gravitacional.

La solución del suelo, contiene un determinado número de sales inorgánicas en baja concentración; esta fase líquida es importante para los microorganismos del suelo ya que constituye parte de su aporte de nutrientes. Sin embargo, los movimientos descendentes de agua aleja estos nutrientes de la zona de accesibilidad microbiana, debido a que se pierden por lixiviación elementos como: nitrógeno, potasio, magnesio, azufre, calcio, fósforo y materia orgánica en menor cantidad (Alexander, 1990).

El **pH** del suelo se define como el logaritmo negativo de la concentración de iones hidrógeno de una solución de suelo, indica su acidez o basicidad. El pH del suelo afecta a la solubilidad de los nutrientes y compuestos químicos, ya que tiene influencia sobre el grado de ionización y carga de éstos. Esta situación afecta la asimilación de nutrientes por las plantas, pero también el transporte de contaminantes potenciales a través del suelo en la zona vadosa. Los suelos muy ácidos generalmente están muy lixiviados, lo cual los hace escasos en nutrientes minerales como (calcio, magnesio, fósforo). Los suelos muy alcalinos dañan a las plantas porque no permiten la asimilación de nutrientes, hecho que también sucede en suelos muy ácidos. Los suelos de manera general se clasifican en ácidos, neutros y alcalinos (Tabla 1.2.).

Tabla I.2 Clasificación de suelos según el pH (Pepper et al., 1996)

Tipo de suelo según pH	Intervalo de pH
Ácido	Menor a 5.5
Neutro	6-8
Alcalino	Mayor a 8.5

Se consideran 16 elementos minerales nutritivos del suelo que son necesarios para el crecimiento de las plantas. A partir del aire y del agua, en las reacciones fotosintéticas, se obtienen de manera combinada el carbono, hidrógeno y oxígeno, elementos que comprenden el 90% de la materia seca de las plantas.

Los 13 elementos restantes se toman principalmente del suelo. A los elementos que se requieren en cantidades mayores, aunque variables, se les llama **macroelementos**, y son nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y azufre. En cambio a los elementos que las plantas necesitan en menores cantidades, se les denomina **microelementos**, e incluyen al manganeso, hierro, boro, zinc, cobalto, molibdeno y cloro.

La mayoría de los nutrientes se encuentran en el suelo en forma de minerales o componentes de la materia orgánica, pero al no encontrarse disueltos no son aprovechables por las plantas. Estos nutrientes se vuelven disponibles a través de la intemperización (alteración química o mineralógica de las rocas por agentes ambientales) de los minerales o componentes de la materia orgánica, con excepción del nitrógeno que se incorpora por acción de bacterias simbióticas. Cuando los nutrientes están disueltos, son absorbidos por las plantas a partir de la solución del suelo o de la superficie de los coloides orgánicos, en forma de cationes y aniones (Aguilera, 1989).

La parte orgánica del suelo se forma y acumula por incorporación de residuos vegetales a nivel de la rizósfera y por la caída de hojas, frutos, corteza, así como por la incorporación de cadáveres microbianos y productos de descomposición de la macro y microfauna.

La **materia orgánica** se fermenta en forma de quelatos, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos, huminas, aminoácidos, bases púricas y pirimídicas, proteínas, azúcares, grasas y ceras, por la acción de microorganismos. También aporta macro y micronutrientes al suelo, es una reguladora del pH y favorece la aireación al actuar como cementantes en los agregados. La materia orgánica también permite la retención de humedad debido a la formación de agregados y microporos en el suelo, lo cual beneficia a las plantas y microorganismos (Aguilera, 1989).

B. PROCESOS QUE AFECTAN AL TRANSPORTE DE LOS HIDROCARBUROS EN EL SUELO

Cuando un contaminante entra al suelo, se asocia a una o más de las fases presentes en el suelo que se entienden son sólida, líquida y gaseosa (Pepper et al., 1996). La distribución de un contaminante en el suelo depende de las características del contaminante y del suelo en sus distintas fases, de tal forma que puedan ocurrir cualquiera de los procesos que se presentan en la Figura I.2, que son: evaporación, solubilización, volatilización y sorción; a continuación se analizará cada uno de estos procesos

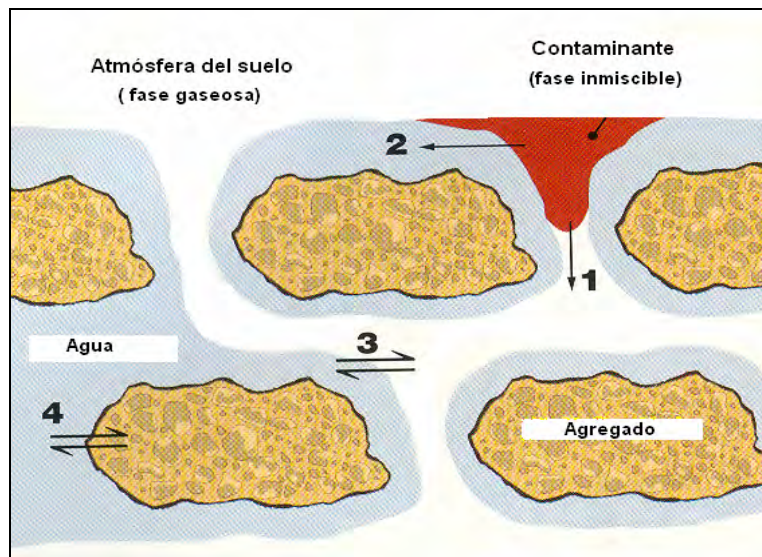


Fig. I.2 Transferencia de fases de un contaminante puro en agua y aire: 1) evaporación, 2) solubilización, 3) volatilización y 4) sorción. (Pepper et al, 1996)

a. Solubilización. Este proceso se refiere a la transferencia entre el contaminante puro y la fase líquida del suelo. La solubilidad de los compuestos orgánicos depende en gran medida del grado de interacción entre las moléculas de agua y del contaminante.

Por lo tanto, la solubilidad de los contaminantes, en su mayoría, se dará en función de las características de los compuestos; es por esto que los compuestos orgánicos iónicos o polares tienen una solubilidad relativamente alta.

A la propiedad de los compuestos orgánicos líquidos de mezclarse con agua, se le llama **miscibilidad**. Este proceso se puede dar de manera completa en compuestos polares como el metanol o etanol, pero también se da en pequeñas fracciones de compuestos no polares o no miscibles.

Por lo tanto, compuestos con baja solubilidad, como el benceno, pueden ser disueltos en pequeñas cantidades y ser transportados por lixiviación hasta el nivel freático, contaminando el agua subterránea (Baker and Herson, 1994).

En general, la solubilidad de los compuestos orgánicos está en función de las interacciones moleculares entre el contaminante y el agua, y entre las mismas moléculas del contaminante, por lo que depende en su mayoría, de las propiedades del compuesto. Sin embargo, existen otros factores como la temperatura y la salinidad que también afectan la solubilidad.

b. Evaporación. Se refiere a la transferencia de una fase líquida o sólida pura a la fase gaseosa. Para este proceso la **presión de vapor** del contaminante es una medida importante del grado de evaporación de un compuesto. La presión de vapor se define como la presión de la fase gaseosa en equilibrio con la fase sólida o líquida. Este es un importante proceso de transferencia, ya que un contaminante presente en la zona vadosa del suelo puede ser transferido a la fase gaseosa del suelo. Este proceso depende de las interacciones entre las moléculas del contaminante en las fases líquida o sólida, ya que las interacciones en la fase gaseosa son casi insignificantes debido al gran espacio intermolecular existente; por lo general, la presión de vapor es mayor en líquidos que en sólidos, además de que de la temperatura (Pepper et al., 1996).

c. Volatilización. Es la transferencia de un contaminante entre la fase líquida y la fase gaseosa, siendo importante en el transporte de muchos compuestos orgánicos en la zona

vadosa. Este proceso difiere de la evaporación, ya que en éste el contaminante debe estar disuelto en agua y entonces ser transferido a la fase gaseosa; por lo tanto, no depende de la presión de vapor, sino mayormente de la **solubilidad** del compuesto, así como de los factores ambientales (Pepper et al., 1996).

Algunos de estos factores ambientales del suelo que se han encontrado importantes en la volatilidad de un contaminante orgánico son: humedad, temperatura, contenido de materia orgánica, densidad y contenido de arcilla. Otras propiedades físicas y químicas importantes del contaminante son la sorción y la concentración del contaminante en el suelo.

La volatilización puede darse tanto en la matriz del suelo, resultando en la acumulación de vapores orgánicos en la atmósfera del suelo, como en la transferencia del material del suelo a la atmósfera; lo cual provoca contaminación en el aire (Baker and Herson, 1994).

d. Sorción o Retención. La sorción o retención es el principal proceso que determina el transporte de contaminantes en el suelo. Este proceso se define como la asociación del contaminante con las moléculas de la fase sólida del suelo. Se le llama también retención porque el suelo tiene la capacidad de retener contaminantes orgánicos e inorgánicos por diversos métodos. En el caso de los contaminantes inorgánicos, principalmente se retienen cationes como Al^{3+} , Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , NH_4^+ y Na^+ , ya que los sitios de intercambio de iones de las arcillas y de la materia orgánica son principalmente negativos. Los contaminantes inorgánicos son generalmente cationes de metales pesados como cadmio, plomo y zinc, los cuales permanecen en el suelo en lugar de poder ser lixiviados.

Los contaminantes orgánicos son principalmente adsorbidos por la materia orgánica asociada al suelo. Esto se debe a que ésta es menos polar que el agua y provee un ambiente más favorable para los compuestos orgánicos no polares. Esta sorción sobre compuestos orgánicos no polares está determinada por un efecto hidrofóbico, ya que los compuestos orgánicos no tienen afinidad con el agua y prefieren asociarse con la materia orgánica del suelo por tener polaridades más similares.

No todos los compuestos orgánicos son no polares, existen algunos que son polares o iónicos, por lo que su retención en el suelo se produce mediante intercambio catiónico, como con los compuestos inorgánicos. En el caso de compuestos orgánicos con carga negativa bajo las condiciones ambientales, presentan baja retención en el suelo (Pepper et al., 1996).

En general las especies no polares son más móviles en el suelo, que las especies polares, incrementando su movilidad respecto a su polaridad de la siguiente manera: hidrocarburos > éteres > aminas terciarias > nitrocompuestos > éteres > cetonas aldehídos > aminas > ácidos (Connell and Miller, 1984).

Se ha encontrado, por otra parte, que la sorción influye de manera negativa en la disponibilidad de los contaminantes a la biodegradación. En el caso particular de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs), Weissenfels et al., (1992) demostraron que su degradación se vio limitada por la porción en la materia orgánica del suelo.

La retención de un contaminante orgánico o inorgánico depende de su polaridad, pero también otras características propias o del suelo. En el caso de los contaminantes orgánicos, la cantidad de materia orgánica asociada al suelo es un factor importante en la sorción. Para los contaminantes iónicos o ionizables la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de óxidos de metales son importantes para la sorción.

La sorción es un proceso importante, porque reduce la velocidad de transporte de los contaminantes con respecto al agua. Esto se debe a que si una molécula de contaminante es adsorbida por el suelo, no podrá ser removida por el agua. Lo cual significa que le tomará más tiempo recorrer una distancia determinada respecto al agua.

Para este concepto se ha establecido un factor llamado **coeficiente de retardación (R)**, cual adquiere un valor de 1 cuando un contaminante se mueve a la misma velocidad que el agua y adquiere un valor mayor si el contaminante se mueve más lento. Los contaminantes con coeficientes de retardación muy grandes (mayores de 1000), se mueven muy lentamente respecto al agua y tienden a crear zonas contaminadas de menor extensión en el suelo (Pepper et al., 1996).

Los contaminantes que son arrastrados por el agua se ven influenciados por la acción de la gravedad. Este movimiento origina lixiviación, la cual puede reducir la concentración de los contaminantes en el suelo, pero los arrastra hasta los sistemas de agua subterránea (Alexander, 1995).

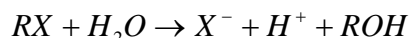
En resumen se puede decir que el flujo de un contaminante orgánico en el suelo dependerá de sus características como la miscibilidad, presión de vapor, solubilidad relativa en agua, tamaño molecular y carga. En el caso del suelo, la capacidad de sorción o retención de compuestos orgánicos está directamente asociada con el contenido de materia orgánica, tipo y porcentaje de arcillas presentes, estructura del suelo y flujo de agua a través de éste; así como con la frecuencia, intensidad y duración de la contaminación (Connell and Miller, 1984).

C. TRANSFORMACIONES DE LOS HIDROCARBUROS EN EL SUELO

a. Transformaciones Abióticas

Algunos contaminantes pueden ser transformados mediante reacciones abióticas en el suelo. Las reacciones principales son la hidrólisis y reacciones redox.

La hidrólisis se lleva a cabo durante el contacto entre el contaminante y el agua. Este proceso es la reacción del compuesto orgánico con el agua y se representa de la siguiente manera:



Donde el RX es un compuesto orgánico con un grupo funcional X , que reacciona con una molécula de agua obteniéndose un compuesto ROH .

La hidrólisis ocurre esencialmente entre compuestos nucleofílicos (con exceso de electrones) y electrofílicos (con deficiencia de electrones); por lo que la reactividad de las moléculas contaminantes con el agua dependerá de su carga. El pH es un factor del suelo que cataliza la hidrólisis, ya que para ciertos compuestos, se favorece la reacción en condiciones ácidas o básicas del suelo (Pepper et al., 1996).

Las reacciones redox se llevan a cabo entre los contaminantes y el oxígeno que está presente en el suelo pero sin la intervención microbiana.

Se conoce también que las arcillas, la materia orgánica, los óxidos metálicos y los cationes intercambiables tienen la capacidad de catalizar las reacciones abióticas que ocurren en el suelo (Bouwer and Zehnder, 1993).

b. Transformaciones Bióticas

La biodegradación es la descomposición y transformación de compuestos orgánicos a través de la actividad microbiana en estos casos los hidrocarburos son empleados como sustrato para los microorganismos del suelo y son oxidados mediante rutas metabólicas propias de éstos (Pepper et al., 1996).

La biorremediación se vale de este principio para degradar sustancias peligrosas presentes en un suelo contaminado, es un conjunto de técnicas que permite la descontaminación y la obtención de productos finales menos tóxicos como: agua, dióxido de carbono, ácidos grasos, entre otros.

En esta tecnología, las plantas tienen un papel importante al favorecer el crecimiento de los microorganismos asociados a sus raíces (Fig 1.3).

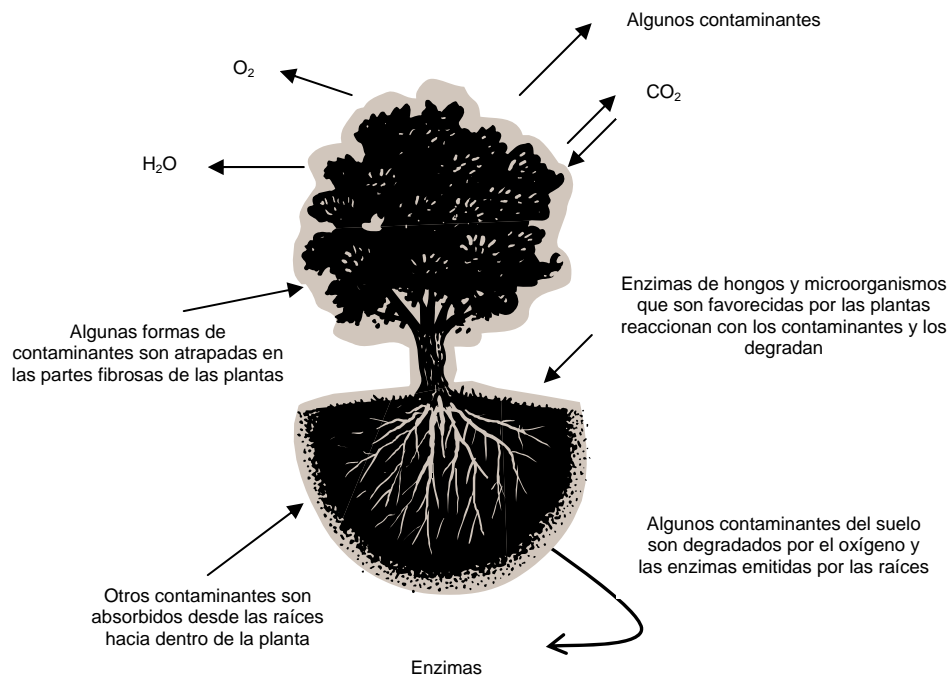


Fig. 1.3 Uso de plantas en la biorremediación y sus principales rutas de descontaminación (Adaptado de Pepper et al., 1996)

En general las rutas de degradación de los hidrocarburos se llevan a cabo en condiciones aerobias y anaerobias, según el tipo de aceptor final de electrones.

En condiciones aerobias, cuando el oxígeno es el aceptor final de electrones, muchos microorganismos heterótrofos degradan compuestos orgánicos como fuente de carbono y energía. Se realiza mediante una serie de reacciones de oxidación y reducción a partir de las cuales se genera CO_2 y energía en forma de ATP que es requerido por los microorganismos.

Bajo condiciones anaerobias, los compuestos orgánicos son transformados en otros compuestos. Los aceptores finales de electrones en la respiración anaerobia pueden ser hierro, nitrato, manganeso, sulfato y carbonato, en lugar del oxígeno. Los productos finales de esta respiración son alcoholes de cadena corta, ácidos grasos volátiles, CO₂, H₂ y H₂O.

Como los compuestos orgánicos se clasifican en tres grandes grupos: **alifáticos**, **alícíclicos** y **aromáticos**, los mecanismos de degradación son diferentes para cada uno de éstos. A continuación se analizan las diferentes rutas degradativas dependiendo del grupo de hidrocarburos.

i. Hidrocarburos alifáticos.

Son hidrocarburos saturados (enlaces sencillos) e insaturados (enlaces dobles o triples) de cadenas lineales o estructuras ramificadas. Generalmente los hidrocarburos alifáticos saturados, entre 8 y 16 carbonos, son degradados rápidamente en condiciones aerobias. En cambio la degradación de cadenas más largas es más lenta por su baja solubilidad en agua y la de cadenas más cortas puede producir efectos tóxicos en los microorganismos (Baker and Herson, 1994).

Los alcanos de cadena lineal son degradados primero, mediante oxidación del carbono terminal, regulado por un tipo de enzimas llamadas oxigenasas. Esta oxidación forma un alcohol primario, el cual es oxidado nuevamente, formando un aldehído y finalmente un ácido graso. A este ácido graso se le retira un fragmento de 2 carbonos, mediante la coenzima A, resultando en la formación de una molécula de Acetil-CoA. Esta molécula puede ya ser metabolizada en el Ciclo de Krebs de la célula para completar su degradación obteniéndose energía, CO₂ y agua.

Esta oxidación, llamada β-oxidación puede ser repetida hasta terminar con la larga cadena del hidrocarburo. El mecanismo se representa a continuación (Figura I.4)

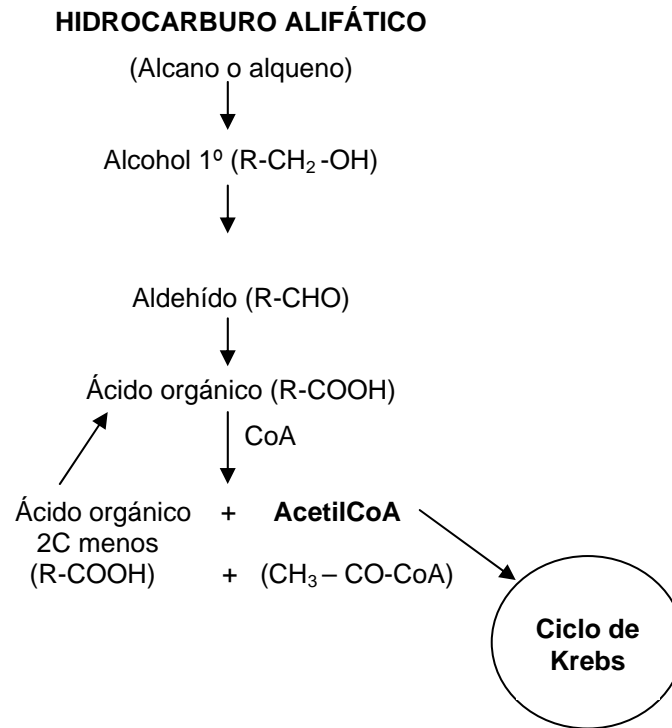


Fig. I. 4 Ruta de degradación de compuestos alifáticos
(Pepper et al., 1996, modificado)

En el caso de alcanos ramificados o halogenados, la degradación es más lenta, ya que las ramificaciones hacen interferencia entre la enzima degradadora y el sitio de anclaje para la enzima. En el caso de los hidrocarburos lineales halogenados se requiere que una enzima actúe sobre el enlace carbono-halógeno y una gran cantidad de energía para romper este enlace. Este tipo de degradación se puede dar de dos maneras: mediante una reacción nucleofílica, en la que una especie done un par de electrones y el halógeno sea sustituido por un grupo hidroxilo; o por una reacción de oxidación en la que se requiere un aceptor de electrones externo.

Bajo condiciones anaerobias, la degradación de los hidrocarburos alifáticos saturados es muy lenta o no se presenta en la naturaleza; se tiene como ejemplo las reservas de petróleo crudo en el suelo, en las que no se aprecia degradación, a pesar de que existan microorganismos.

En el caso de los hidrocarburos alifáticos insaturados que contengan oxígeno, como los alcoholes y cetonas, son rápidamente biodegradados en ausencia de oxígeno. El mecanismo sugerido es la hidratación del enlace doble, se obtiene un alcohol, con la siguiente oxidación se transforma en una cetona o un aldehído y finalmente se forman ácidos orgánicos.

Los hidrocarburos alifáticos halogenados pueden ser parcial o completamente degradados bajo condiciones anaerobias a través de una reacción de transformación llamada deshalogenación reductiva. Ésta es una degradación cometabólica y es mediada por un metal de transición reducido o un complejo metálico. El primer paso, es una transferencia de electrones del metal reducido al compuesto alifático halogenado, dando como resultado un radical libre alquilo y un halógeno libre. A continuación, el radical libre alquilo puede unirse a un átomo de hidrógeno o perder un segundo halógeno para formarse un alqueno.

En general las condiciones anaerobias favorecen la degradación de los compuestos altamente halogenados, mientras que las condiciones aerobias favorecen la degradación de compuestos halogenados mono o disustituidos (Millner et al., 1992).

ii. Hidrocarburos alicíclicos

Son compuestos de carbono saturados que forman estructuras cíclicas. Se encuentran en forma natural como principal componente del petróleo crudo (entre 20 y 67% del volumen).

La degradación de los hidrocarburos alicíclicos se lleva a cabo por diversas poblaciones de microorganismos, a las cuales se les llama consorcios microbianos. Estos consorcios se encargan de pasos específicos de la degradación de los hidrocarburos. La ruta metabólica es semejante a la que se sigue en los hidrocarburos lineales, se transforma el hidrocarburo alicíclico en alcohol cíclico y luego a cetona cíclica. Posteriormente otro tipo de microorganismos lactoniza el compuesto y abre el anillo por medio de una oxidación y finalmente degrada el compuesto completamente por β -oxidación (Pepper et al., 1996). Se muestra un ejemplo de degradación de ciclohexano en la Figura I.5.

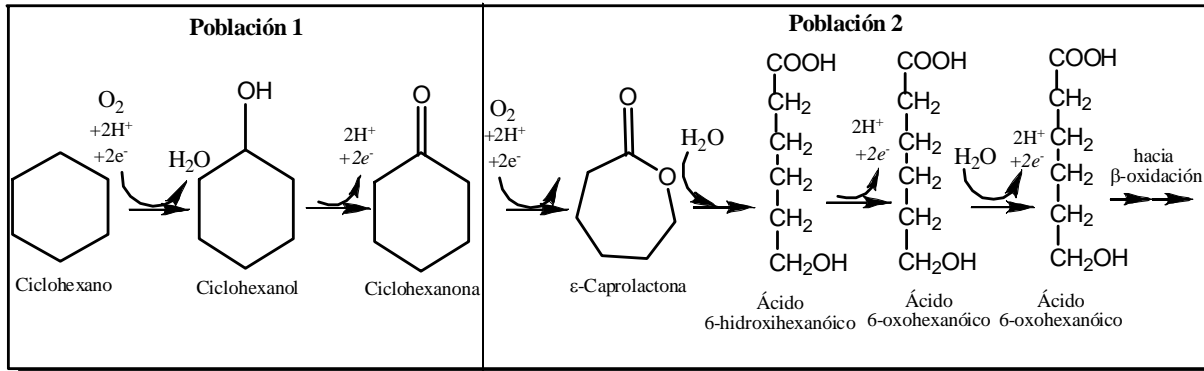


Fig. I. 5 Rutas de biodegradación del ciclohexano por un consorcio microbiano (Atlas and Bartha, 1993, modificado).

iii. Hidrocarburos aromáticos

Estos compuestos contienen al menos un anillo bencénico. El benceno (C_6H_6) es el principal ejemplo de éstos, presenta resonancia y deslocalización de electrones, lo cual le da una gran estabilidad.

Los compuestos aromáticos, incluyendo los hidrocarburos poliaromáticos (HAPs, que contienen dos o más anillos de benceno unidos), son sintetizados naturalmente por las plantas; la lignina es el principal ejemplo de estos compuestos.

Sin embargo, las mayores fuentes de compuestos aromáticos de origen antropogénico son resultado del procesamiento y uso de combustibles fósiles; es conocido que varios hidrocarburos aromáticos como el benceno, antraceno, fenantreno, entre otros son carcinogénicos (Baker and Herson, 1994).

Los compuestos aromáticos, especialmente los HAPs, se caracterizan por tener una baja solubilidad en agua, por lo tanto son hidrofóbicos. En el suelo, comúnmente se encuentran adsorbidos en las partículas minerales, por lo tanto su disponibilidad para los microorganismos y su tasa de biodegradación es baja. Cuanto mayor es la cantidad de anillos, menor será la disponibilidad de los compuestos aromáticos (Pepper et al., 1996).

Existe una gran variedad de bacterias y hongos que pueden degradar compuestos aromáticos, bajo condiciones aerobias. La ruta común de degradación en bacterias es la siguiente: se realiza una hidroxilación, que implica la incorporación de oxígeno molecular al anillo bencénico, por medio de un grupo de enzimas llamadas dioxigenasas.

Esta hidroxilación da como resultado un *cis*-hidrodiol, que es subsecuentemente rearomatizado dando lugar a un compuesto intermedio dihidroxilado llamado **catecol**.

A continuación el anillo se rompe por una segunda dioxigenasa, formándose varios compuestos intermediarios hasta llegar a la obtención de Acetil-CoA y succinato, los cuales pueden ser metabolizados completamente en el Ciclo de Krebs (Baker and Herson, 1994).

En el caso de la transformación de HAPs por medio de hongos, la primera reacción es una epoxidación por medio de una monoxigenasa, ésta incorpora un átomo de oxígeno al HAPs, y reduce el segundo oxígeno a una molécula de agua. El resultado es la formación de un óxido o epóxido, seguido por una adición enzimática de agua para producir un *trans*-dihidrodiol. De manera alternativa, el óxido puede ser isomerizado para formar fenoles, los cuales pueden conjugarse con sulfatos, ácido glucorónico y glutatos. Esas conjugaciones son similares a las que realizan los organismos superiores para favorecer la detoxificación y eliminación de los HAPs (Figura I.6).

En general, se puede decir que los HAPs que tienen dos o tres anillos son transformados rápidamente hasta su mineralización completa; pero los HAPs con cuatro o más anillos son transformados mucho más lentamente y en ocasiones como resultado de un ataque cometabólico (Pepper et al., 1996).

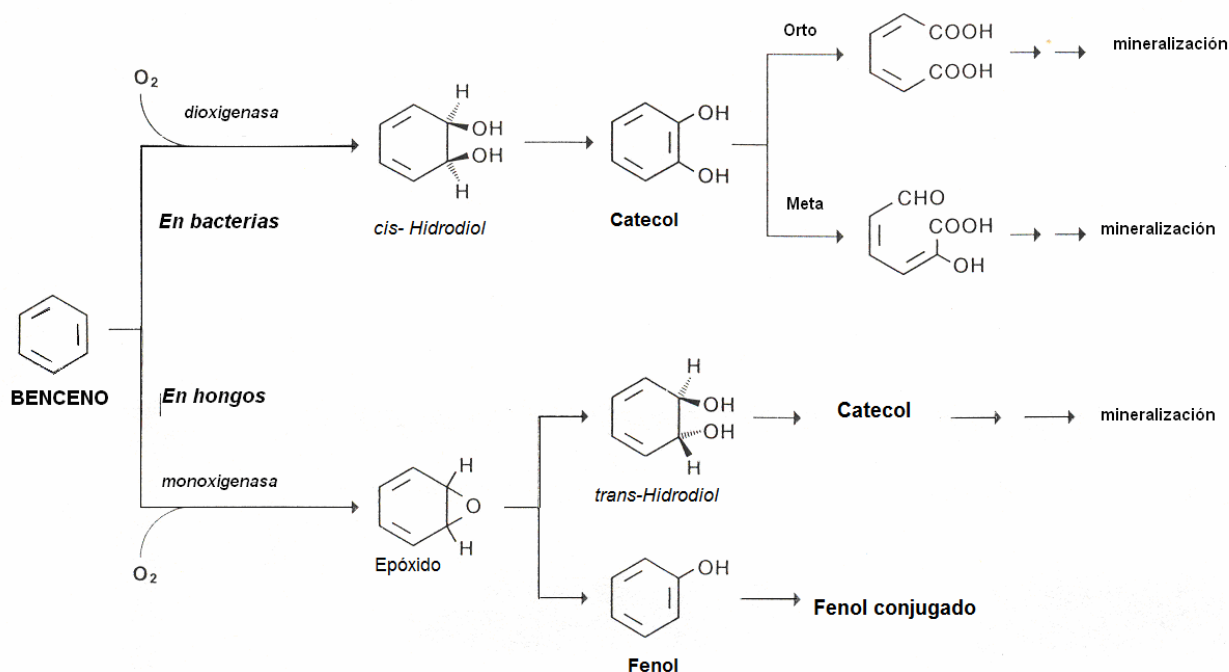


Fig. I.6 Rutas de transformación de compuestos aromáticos mediante bacterias y hongos (Pepper et al., 1996, modificado)

La degradación de los hidrocarburos aromáticos bajo condiciones anaerobias es similar a la de los hidrocarburos alifáticos, pueden ser completamente degradados si los compuestos tienen oxígeno en su estructura. Algunos estudios indican que en algunos casos hay una lenta degradación en compuestos aromáticos no sustituidos, en condiciones anaerobias.

La mineralización anaerobia requiere a menudo de un trabajo conjunto de varias poblaciones de bacterias, que trabaja a diferentes potenciales redox. Esta degradación se puede dar por el consorcio de bacterias degradadoras de compuestos aromáticos junto con el de bacterias metanogénicas aerobias o reductoras de sulfato. Las bacterias degradadoras transforman los aromáticos en precursores metanogénicos como bióxido de carbono, formiato y acetato, los cuales no pueden emplear en sus rutas metabólicas. En cambio, las bacterias metanogénicas utilizan estos precursores como aceptores de electrones para formar metano (Pepper et al., 1996).

D. CARACTERÍSTICAS DEL DIESEL

El diesel es un combustible empleado principalmente en máquinas de combustión interna. Su uso en México se ha orientado fundamentalmente como energético de vehículos diseñados para combustible diesel, como los son camiones de carga de servicio ligero y pesado, autobuses de servicio urbano y de transporte foráneo, locomotoras, embarcaciones, maquinaria agrícola, industrial y de la construcción (PEMEX, 2006). También se usa en la industria ferrocarrilera, en generadores de energía eléctrica, como disolvente para limpieza de partes automotrices.

Según el Inventario de Sustancias Químicas de Estados Unidos bajo el control de sustancias tóxicas define al diesel como una compleja combinación de hidrocarburos producidos por la destilación de petróleo crudo. Consiste en un conjunto de hidrocarburos que tienen un número de carbonos predominantemente entre 9 y 20, que tienen un intervalo de destilación entre 163°C y 357 °C (CAS No. 6834-30-5).

En Estados Unidos y otros países se conocen 3 tipos de diesel: el diesel No. 1, No. 2 y No. 4, y la definición anterior incluye a los dos primeros. El diesel No. 1 se caracteriza por tener un intervalo de destilación entre 150°C y 400°C, contiene predominantemente hidrocarburos con número entre 9 y 16.

El diesel No. 2 o combustible diesel para automotores y ferrocarriles tiene un intervalo de destilación entre 160 °C y 360°C. El diesel No. 4 o diesel marino, se utiliza en motores de mediana velocidad, es más viscoso que el diesel No. 2 y se clasifica como un combustible residual. Contiene normalmente más del 15% de componentes de aceites residuales (Millner et al., 1992). En México, sólo se emplea el diesel No. 2 y se le conoce con el nombre comercial de PEMEX diesel.

El diesel proviene de una destilación de la fracción del petróleo crudo denominada gasóleo ligero primario; éste es sometido a un proceso de hidrogenación catalítica denominado hidrotratamiento o hidrosulfuración el cual tienen como finalidad reducir o eliminar los compuestos de azufre, nitrógeno y oxígeno. Además se obtiene una disminución de los hidrocarburos aromáticos. Finalmente a la mezcla obtenida se le añaden antioxidantes y estabilizantes.

Existen ciertas características químicas que se emplean para definir a los destilados del petróleo como temperatura de destilación, contenido de azufre, gravedad específica, punto de flash, punto de verteo, viscosidad, porcentaje de carbono residual, porcentaje de agua y sedimentos. A continuación se muestran las características principales del diesel (Tabla I.3).

Tabla I.3 Características del diesel (Jiménez, 2001)

Características	Análisis típico	Método ASTM
Color ASTM	2.0	1500-64
Peso específico a 20/4 °C	0.852	1.298-67
Temperatura de inflamación, °C	77	93-73
Temperatura de congelación, °C	6	97-66
Viscosidad S.U.S a 37.8° C	38	88-56
Azufre total,% en peso	0.5	129-64
Índice de cetano	55	976-66
Carbón Ramsbottom (en 10% de residuo), % en peso	0.1	524-64
Agua y sedimento,% en volumen	0.05	1 796-68
Destilación	86-67	
Temperatura inicial de ebullición, °C	185	
10% destila a, °C	225	
50 % destila a, °C	287	
90 % destila a, °C	344	
Temperatura final de ebullición, °C	371	
Poder calorífico neto, kcal/kg	10 80	
Poder calorífico neto, kcal/L	9 272	

La composición química del diesel varía dependiendo de las características del crudo del que se destila; pero en general se conoce que es una mezcla de hidrocarburos entre 9 y 20 carbonos, predominantemente. Está compuesto en su mayoría por parafinas, que son alcanos normales, ramificados y cíclicos, en un intervalo de 65% a 85 %.

En las parafinas y cicloparafinas predominan compuestos con sustitución mono, di y trimetil, que son fácilmente identificables mediante cromatografía de gases.

Los compuestos aromáticos están presentes en el diesel en un 10% a 30 %. Debido a que el diesel es un destilado medio que se obtiene a temperaturas altas, todos los hidrocarburos de bajo peso molecular, así como compuestos aromáticos volátiles como benceno, tolueno, xileno y compuestos poliaromáticos (HAPs) están presentes en muy baja proporción como se muestra en la Tabla I.4

Tabla I.4 Compuestos químicos encontrados en el diesel (Stone, 1991, modificado)

Compuesto químico	Intervalo de concentración (mg/l)
<i>Orgánicos volátiles</i>	
Benceno	6 – 82
Etilbenceno	100 – 800
Tolueno	100 – 800
Xileno	100 – 800
<i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos</i>	
Pireno	ND – 41
Fluoranteno	ND – 37
Benzantraceno	0.001 – 1.2
Trifenileno	2.2
Criseno	1.4
Benzo[a]pireno	0.001 – 0.006
Benzo [e] pireno	< 0.1
2-Metilnaftaleno	6700
Naftaleno	2730
Fenantreno	1500
Fenol	6.8
Cresol	54.3
Quinolina	9.2

Además de las concentraciones de los compuestos químicos del diesel es importante conocer su movilidad. En general se sabe que el diesel tiene una movilidad media en el suelo, ya que tiene un viscosidad cinemática de 2.2 a 2.4 centistokes.

Sin embargo, el diesel tiene componentes con diferentes solubilidades, por lo tanto, de movilidad variable, como se presentan en la Tabla I.5.

Tabla I.5 Movilidad de los compuestos químicos del diesel (Stone, 1991, modificado)

Compuesto químico	Solubilidad Sw (mg/L)	Coefficiente de retardación (Rd , veces mas lento que el agua)
Baja movilidad (Rd mayor a 100)		
Fluoreno	1.95 E + 00	-
Fenantreno	1.6 E + 00	1097.2
Pireno	1.6 E - 01	-
Benzantraceno	5.7 E - 03	24601.0
Benzo[a]pireno	3.0 E - 03	67801.0
Fluorantreno	2.65 E -03	-
Movilidad media (Rd 10 - 100)		
Naftaleno	3.1 E + 01	87.94
1,3-Dimetilbenceno (<i>m-xileno</i>)	1.6 E + 02	60.91
1,4-Dimetilbenceno (<i>p-xileno</i>)	2.0 E + 02	54.39
1,2-Dimetilbenceno (<i>o-xileno</i>)	1.8 + 02	23.26
Etilbenceno	1.5 + 02	53.92
Tolueno	5.2 + 02	30.40
Movilidad alta (Rd menor a 10)		
Benceno	1.8 E + 03	8.80
Quinolina	6.0 E + 04	5.16
<i>m</i> -Cresol	2.6 E + 04	4.78
<i>p</i> -Cresol	2.5 E + 04	4.21
<i>o</i> -Cresol	2.6 E + 04	2.32
Fenol	6.7 E + 04	2.09

a. Efectos Tóxicos del Diesel

i. En mamíferos

Todos los compuestos químicos son potencialmente tóxicos o dañinos bajo ciertas circunstancias. Los productos tóxicos se definen como agentes químicos que, bajo ciertas condiciones pueden producir efectos adversos en sistemas biológicos que van desde alteraciones menores de las funciones normales, hasta la muerte. Es necesario determinar las condiciones bajo las que se produce el daño. El riesgo para el humano se encuentra relacionado con la toxicidad de los compuestos y con el tiempo de exposición a éste (Millner et al., 1992).

La toxicidad del diesel, como un todo, ha sido poco estudiada y en ocasiones no se hace una separación entre la exposición al combustible o a sus productos de combustión. Lo que se ha revisado de manera más amplia es la toxicidad de algunos de sus componentes por separado. Se sabe que algunos compuestos que lo constituyen presentan efectos tóxicos como se menciona a continuación.

1. Benceno, Xilenos y Tolueno

El benceno se encuentra en un porcentaje relativamente bajo en el diesel y tiene una movilidad considerable, debido a su solubilidad (Wang and Bartha, 1994).

Se ha encontrado que el benceno es una importante fuente potencial de riesgo ya que es un carcinogénico humano (Block et al., 1991). Los xilenos y el tolueno, producen afecciones al sistema nervioso en dosis elevadas, aunque no se ha encontrado que sea carcinogénico en humanos (Stone, 1991). Se ha encontrado que el tolueno puede promover la formación de tumores de piel en ratones de laboratorio (Blackburn et al., 1984).

2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs)

Estos hidrocarburos se encuentran en baja concentración en el diesel, se conoce que son altamente irritantes a la piel y algunos han mostrado ser potencialmente carcinogénicos en animales de laboratorio (Slaga, et al., 1980).

Se ha encontrado que el naftaleno puede causar anemia hemolítica en humanos expuestos durante cortos o largos periodos de tiempo. Aunque tienen una baja movilidad y solubilidad en agua, también puede causar contaminación de suelos y mantos freáticos (Stone, 1991).

El criseno y fenantreno han causado tumores de piel de animales de laboratorio al aplicarse directamente sobre ésta, pero la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC), considera que es suficiente evidencia para considerarlos como carcinogénicos.

El benzantraceno y benzo[a]pireno, también se han reportado como carcinogénicos en pruebas de laboratorio con animales.

3. Quinolina, Cresoles, Fenoles y N-Nitrosodifenilamina

Estos compuestos tienen una movilidad y toxicidad considerable. Aunque los cresoles y los fenoles se consideran no carcinogénicos por la Environmental Protection Agency (EPA), datos de laboratorio demuestran que la quinolina aumenta la incidencia de tumores de hígado en animales, por lo que tiene un valor de Potencial Carcinogénico alto. La N-nitrosodifenilamina es un carcinogénico basado en estudios con animales, causa cancer de vejiga en ratas de laboratorio (Stone, 1991).

ii. En plantas

Los hidrocarburos en el suelo tienen generalmente graves efectos negativos en las plantas; actúan de manera compleja en éstas, involucra tanto el contacto directo como el deterioro indirecto debido a las interacciones de los hidrocarburos con los componentes abióticos y microbiológicos del suelo (Bossert and Bartha, 1984).

El contacto directo es tóxico debido a que los hidrocarburos de bajo punto de ebullición o de cadena corta (menor de C_{10}) actúan como solventes de la membrana lipídica de las células. Se ha encontrado que la toxicidad de los hidrocarburos decrece de la siguiente manera: monoaromáticos > olefinas > naftalenos > parafinas. La toxicidad está directamente relacionada con el aumento de la polaridad e inversamente relacionada con el aumento del peso molecular (Mc Gill et al., 1981). Los efectos directos de los hidrocarburos también incluyen efectos de ácidos nafténicos en hormonas vegetales del crecimiento (Fattah and Wort, 1970).

Los efectos indirectos de los hidrocarburos en el suelo incluyen la privación de oxígeno a los microorganismos asociados con las raíces de las plantas, por lo que se generan condiciones anóxicas. Estas condiciones pueden provocar la producción de compuestos fitotóxicos como el H_2S , por los mismos microorganismos (DeJong, 1986). Los intermediarios metabólicos producidos por los microorganismos degradadores pueden aumentar temporalmente la toxicidad de los hidrocarburos.

Los productos de la degradación incompleta de hidrocarburos como son los ácidos grasos, los fenólicos y terpenoides, poseen propiedades fitotóxicas (Stevenson, 1966). Además, los microorganismos degradadores llegan a competir con las plantas por los nutrientes del suelo.

Los hidrocarburos afectan también la estructura física del suelo debido a que se reducen los espacios porosos, lo que ocasiona una disminución de la capacidad para almacenar humedad y aire (DeJong, 1980).

Las plantas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de sequía, debido a que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua, aunque esto no afecta a todas las plantas; se conoce que las gramíneas se pueden adaptar mejor a estas condiciones (Anderson et al., 1993).

Eisler, 1987 establece que los HAPs del suelo pueden ser absorbidos por las raíces de las plantas y trasladados a otras partes de ésta como a los tallos; en algunos casos las plantas podrán metabolizarlos, en otros casos podrán llegar a actuar como hormonas de crecimiento, pero lo más común es que se acumulen y afecten a la planta.

Se sabe que en suelos saturados con hidrocarburos las plantas herbáceas mueren inmediatamente, en cambio, los efectos en los árboles y matorrales se manifiestan hasta varios meses después del derrame. En los suelos de clima frío se requieren largos períodos de tiempo para su restablecimiento, del orden de varios años. Para derrames donde las concentraciones en el suelo son entre 10000 y 50000 mg/kg no se han observado efectos negativos, e incluso a muy bajas concentraciones, se han encontrado efectos benéficos debido a que los hidrocarburos actúan como hormonas de crecimiento y por el aumento en el contenido de humus y de la capacidad de retención de agua (Bossert y Bartha, 1984). Otros efectos benéficos, debido a la descomposición de los hidrocarburos, incluye el incremento de la agregación en la estructura física, el aumento de la estabilidad y la capacidad de retención de agua, además de que favorece la diversidad microbiana. Se menciona también que en presencia de bajas concentraciones de hidrocarburos se favorece la fijación de nitrógeno (Frankenberger, 1992).

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 and Bartha, 1994). De hecho, los climas templados tienen una mayor recuperación vegetal que los climas árticos y subárticos y los suelos más ricos en nutrientes y humus tendrán una mayor capacidad de recuperación (Bossert and Bartha, 1984).

E. CONCEPTOS DE TOXICIDAD Y USO DE PLANTAS COMO INDICADORES

El concepto de toxicidad se refiere a la propiedad de una sustancia de producir un efecto dañino sobre un organismo. Originalmente, en los estudios toxicidad se buscaba únicamente conocer los efectos adversos de los compuestos químicos sobre la salud humana. En el año 1969 surgió el término ecotoxicología, con el objetivo de preservar a las plantas, suelo, cuerpos de agua y otros elementos que integran un ecosistema (Duffus, 1983).

Las propiedades tóxicas de un compuesto químico pueden ser evaluadas mediante estudios sobre plantas, bacterias, animales y en ecosistemas, basados en estudios de caso. También pueden ser evaluadas a nivel de organismos unicelulares y a nivel de estructuras moleculares; sin embargo, este tipo de estudios da información menos certera respecto al potencial tóxico de una sustancia.

Los estudios se pueden realizar basados en una sola dosis del contaminante, llamada **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 se conocen como de **toxicidad crónica**, en éstos los organismos son expuestos repetidas veces a una dosis de contaminante, y permiten conocer los niveles de contaminación que ocasionan daño en los organismos (Pepper et al., 1996).

Cuando se examinan las propiedades letales de una sustancia se estima un parámetro propio de cada especie de organismo, que es el **LD₅₀ o dosis letal**, que corresponde a la concentración de la sustancia con la cual la mitad de la población expuesta muere.

El estudio de las características ecotóxicas de un producto se realiza mediante la exposición a la sustancia tóxica, durante diferentes periodos de tiempo, de ciertas especies que se consideran indicadoras por su escasa o gran sensibilidad, de las cuales, las más utilizadas en el medio terrestre son lombrices de tierra, plantas y colémbolos (Beyer and Greg, 1995).

a. Evaluación de la Toxicidad en Plantas

Las plantas son frecuentemente empleadas en pruebas de toxicidad. Los objetivos que persiguen estas pruebas se refieren al riesgo ambiental de cierto contaminante (Iannacone and Gutiérrez, 1999); también persigue el objetivo de evaluar la compatibilidad de suelos contaminados o ya remediados con la flora.

Lo anterior se debe a que los efectos fitotóxicos observados en suelos remediados podrían mostrar metabolitos tóxicos que no serían evidenciados por un análisis químico o fisicoquímico (Verhoef and Van Gestel, 1995). Estos experimentos permiten determinar la concentración del contaminante en el suelo, que puede soportar un cierto tipo de cubierta vegetal. Un aspecto a resaltar es que la sensibilidad a los compuestos tóxicos depende del tipo y especie de plantas utilizadas (Safferman, 1998).

Entre los ensayos ecológicos realizados con plantas se ha buscado evaluar los niveles de germinación y crecimiento vegetal (emergencia, elongación de raíz y crecimiento vegetativo). Los ensayos de fitotoxicidad con semillas o plantas tienen ventajas como el hecho de que sean simples, versátiles y útiles para evaluar la toxicidad de suelo, sedimentos y aguas (Lewis, 1995). Las ventajas que presentan las plantas sobre otros organismos, es que sus semillas son de fácil almacenaje y sus costos de mantenimiento son muy bajos (Iannacone and Alvariño, 2005).

b. Guías de Pruebas de Toxicidad

Diferentes organizaciones como la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD), la Environmental Protection Agency (EPA) y la Food and Drug Administration (FDA), han desarrollado guías de prueba para determinar los posibles efectos de sustancias tóxicas. Se emplean para probar el efecto de sustancias químicas sólidas o líquidas incorporadas al suelo, sustancias químicas en general o productos de protección a plantas de cultivos (plaguicidas).

En general estas pruebas se realizan para determinar si una sustancia produce efectos negativos en la germinación de semillas y etapas tempranas de desarrollo de algunas especies de plantas terrestres, después de una sola aplicación.

Las guías recomiendan ciertos parámetros para evaluar los efectos de las sustancias tóxicas en las plantas, como porcentaje de emergencia, altura y biomasa del tallo, largo y biomasa de la raíz, y efectos fitotóxicos visibles en las plantas.

La OECD menciona que la selección de las especies de plantas se debe hacer con base en la relevancia ecológica, distribución y abundancia, ciclo de vida, características y sensibilidad a otros compuestos o la realización de bioensayos previos, en determinada especie. En la Tabla 1.6 se enlistan las especies sugeridas según las guías antes mencionadas.

Tabla I.6 Especies vegetales recomendadas para pruebas de fitotoxicidad (OEDC, 2003; EPA a b, 1996; FDA, 1987; Paez, 2000)

FAMILIA	ESPECIE	NOMBRE COMÚN	EPA	OEDC	FDA
DICOTILEDÓNEAS					
Quenopodiaceae	<i>Beta vulgaris</i>	Caña de azúcar	-	✓	-
Compositae	<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga	✓	✓	✓
Cruciferae	<i>Sinapis alba</i>	Mostaza	-	✓	-
	<i>Brassicachinensis</i>	Col china	✓	✓	✓
	<i>Brassica napus</i>	Nabo	-	✓	-
	<i>Brassica oleracea</i>	Col ornamental	✓	-	✓
	<i>Brassica rapa</i>	Colinabo	-	✓	-
	<i>Lepidium sativum</i>	Berro	-	✓	-
	<i>Raphanus sativus</i>	Rábano	-	✓	-
Cucurbitaceae	<i>Cucumis sativus</i>	Pepino	✓	✓	-
Leguminosae	<i>Glycine max (G. soya)</i>	Soya	✓	✓	✓
	<i>Lotus corniculatus</i>	Trébol pata de pájaro	-	✓	-
	<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	-	✓	-
	<i>Phaseolus aureus</i>	Frijol mungo	-	✓	-
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Frijol	-	-	✓
	<i>Trigonella foenum-graecum</i>	Alhova	-	✓	-
	<i>Trifolium pratense</i>	Trébol rojo	-	✓	-
	<i>Vicia sativa</i>	Arveja	-	✓	-
Solanaceae	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Jitomate	✓	✓	✓
Umbelliferae	<i>Daucus carota</i>	Zanahoria	✓	✓	✓
MONOCOTILEDÓNEAS					
Gramineae	<i>Avena sativa</i>	Avena	✓	✓	✓
	<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	-	✓	-
	<i>Lolium perenne</i>	Centeno perenne	✓	✓	-
	<i>Oryza sativa</i>	Arroz	-	✓	-
	<i>Secale cereale</i>	Centeno	-	✓	✓
	<i>Sorghum vulgare</i>	Sorgo	-	✓	-
	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	-	✓	✓
	<i>Zea mays</i>	Maíz	✓	✓	✓
Liliaceae	<i>Allium cepa</i>	Cebolla	✓	✓	-

✓ especie de planta sugerida por la guía - especie de planta que no se encuentra en la guía

La OEDC añade también otra lista de especies silvestres potenciales para pruebas de toxicidad, estas se basan en trabajos experimentales anteriores que se han realizado en otras especies, probando diferentes tipos de herbicidas y sustancias químicas. La lista incluye muchas especies de herbáceas como menta silvestre (*Mentha spicata*), trébol blanco (*Trifolium repens*), malva común (*Malva sylvestris*), avena silvestre (*Avena fatua*), pasto azul (*Poa annua*), pasto Johnson (*Sorghum halepense*), entre muchas otras. También se incluye en la lista especies arbóreas como el pino rojo (*Pinus resinosa*) y el abedul blanco (*Betula papyrifera Marsh.*). Sin embargo, existen muchas otras especies de plantas que han sido utilizadas en pruebas de toxicidad, como la alfalfa (*Medicago sativa*) y el alpiste (*Phalaris canariensis*) (Wiltse et al., 1998; Domínguez, 2001).

F. ESTUDIOS DE TOXICIDAD ENCONTRADOS EN LA LITERATURA

Existen varios trabajos referidos a pruebas de toxicidad de hidrocarburos, en los cuales se han empleado plantas. En los párrafos siguientes se presenta un resumen de los mismos que constituyen la base del estudio aquí presentado.

1. Salanitro et al., 1997, realizaron un estudio para evaluar la toxicidad del petróleo crudo sobre lombrices y plantas, en suelos contaminados. Se emplearon tres tipos de petróleo con diferentes proporciones de hidrocarburos, ligero, mediano y pesado. Se emplearon dos suelos, uno con una proporción de carbono orgánico de 4000 mg/kg HTP (Hidrocarburos Totales del Petróleo) y otra con 27000 mg/kg HTP. A los suelos se les mantuvo 8 meses en incubación, con humedad adecuada y se les añadieron fertilizantes (nitrógeno y fósforo). Al final del experimento se realizaron los ensayos de toxicidad. Se observó que la germinación de maíz, trigo y avena fue inhibida de 0 a 25% respecto al control sin contaminar, a una concentración de hidrocarburos de 25000 mg/kg HTP. Tras una biorremediación de 5, 10 y 12 meses, los suelos presentaron una concentración residual de hidrocarburos de 1000-8600 mg/kg TPH y no afectaron la germinación de las plantas. Los resultados que obtuvieron se resumen en la Tabla I.7.

Tabla I.7 Efectos del petróleo crudo en el porcentaje de germinación (Salanitro et al., 1997)

Fracción de contaminante	Concentración de HTP (mg/kg)		Porcentaje de Germinación (%)					
			Sin tratamiento			Después de la biorremediación		
	Sin tratamiento	Después de la biorremediación	Maíz	Trigo	Avena	Maíz	Trigo	Avena
10 meses								
Ninguno	ND	523	90.8	90.9	89.9			
Pesado	14000	7000	81	89	68	87	87	95
Mediano	26000	8600	100	81	95	85	82	95
Ligero	4200	1000	74	51	19	82	77	90
8 meses								
Ninguno	ND	523	93.8	92.9	70.9			
Pesado	11900	10800	93	86	88	73	72	88
Mediano	25700	8200	97	25	71	84	89	96
Ligero	9600	1200	4	0	0	89	88	83

2. Li et al., 1997, utilizaron cebada (*Hordeum vulgare*) para hacerla crecer, durante 120 días en suelos con hidrocarburos totales extractables o HTE. Las concentraciones de hidrocarburos en suelo fueron, para el suelo contaminado, 40000 mg/kg y, para el suelo biorremediado, 20000 mg/kg, además de que un suelo agrícola se utilizó como control. Se observó que la cebada germinó en los tres casos y que el crecimiento alcanzado no mostró diferencias significativas. Los resultados que obtuvieron se muestran en la Tabla I.8.

Tabla I.8 Comparación de la germinación y crecimiento de cebada en tres tipos de suelo (Li et al., 1997)

Parámetro	Suelo control	Suelo contaminado (40000 mg/kg)	Suelo biorremediado (20000 mg/kg)
Porcentaje de germinación (%)	97	91	97
Peso seco de parte aérea (g)	126	73.2	62.8
Peso seco de raíces (g)	9.3	7.0	9.7
Proporción entre tallo/ raíz	13.6	10.5	6.7

3. Wiltse et al., 1998, determinaron la variabilidad de 20 diferentes genotipos de alfalfa (*M. sativa* L.) en su desarrollo agronómico en un suelo contaminado con petróleo crudo a una concentración de 20000 mg/kg. Las semillas con 30 días de germinación fueron transplantadas a macetas con el suelo contaminado. El experimento se realizó por cuadruplicado durante 12 meses en condiciones de invernadero para observar la degradación del contaminante.

Se realizó una segunda parte del experimento en la que 8 genotipos del experimento previo fueron sembrados durante un año y fueron comparados con sus clones sembrados en suelo no contaminado. Se observó que el promedio total del forraje producido por las plantas en suelo contaminado fue del 32% respecto al producido por las plantas en el suelo sin contaminar, concluyéndose que la producción se vio disminuida por el contaminante. Además los resultados demostraron que las plantas que crecen en suelo contaminado maduraron más lentamente y crecieron menos que las plantas en suelo sin contaminar. Esto se observó por los menores valores del peso de tallo y raíz, así como en la producción de forraje, como se muestra en la Tabla I.9. De los resultados se pudo concluir que, aunque el crecimiento de la alfalfa fue menor en suelo contaminado, se observó que existe variabilidad en el mismo genotipo y que existen algunos genotipos que pueden tener mejor desarrollo en suelos contaminados con petróleo.

Tabla I.9 Medias de las medidas tomadas en las plantas de alfalfa a los 12 meses de siembra (Wiltse et al., 1998)

Aspecto evaluado	Suelo no contaminado	Suelo contaminado (20000 mg/kg petróleo)	LSD (P< 0.05)
Producción de forraje (g /maceta)	24.2	7.8	2.2
Madurez (escala de Kalu y Fick,1981)	4.5	3.3	0.7
Altura de la plantas (cm)	40.9	35.5	5.0
Peso de las raíces (g /maceta)	10.8	5.1	1.8

4. Adam and Duncan, 1999, evaluaron el efecto del diesel sobre el crecimiento y la germinación de 22 especies de plantas, entre ellas 11 pastos, 7 herbáceas y leguminosas, y 4 granos comerciales, que se muestra en la Tabla I.10.

Se aplicaron dos concentraciones de diesel (20000 y 50000 mg/kg), además de un control sin diesel. En todos los casos en los suelos contaminados se observó un crecimiento de las plantas menor comparado con lo observado en el suelo sin contaminar. Se encontró que con una concentración de diesel de 25000 mg/kg, todos los granos, tres herbáceas y seis pastos tienen un porcentaje de germinación mayor o igual a 50%; mientras que a una concentración de 50000 mg/kg, las especies que tienen un porcentaje de germinación mayor o igual al 50% sólo son tres especies de granos, una herbácea (alfalfa) y un pasto. La mayor resistencia al diesel se presentó 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 50000 mg/kg de diesel. Se realizó también la observación de la emergencia y crecimiento de las plantas con germinación por arriba del 50%, y se observó que en una de las especies de *Brassica napus var. Olifera*, que presentó altos porcentajes de germinación, el crecimiento en altura y largo de raíz se vio disminuido en menos del 20% con relación al control a concentraciones de diesel de 25000 mg/kg y 50000 mg/kg. Se observó también que la morfología de las raíces se ve afectada ya que presentan mayor formación de raíces adventicias y laterales, ya que se cree que éstas rechazan zonas del suelo con mayor concentración del contaminante.

Tabla I.10 Porcentajes de germinación de especies de plantas expuestas a diferentes concentraciones de diesel. (Adam and Duncan, 1999)

Especies de plantas		Porcentaje de germinación (%) Concentración de diesel (mg/kg)		
		0	25000	50000
Nombre Común	Nombre científico			
Pastos				
Pata de pollo o zacate de la huerta	<i>Dactylis glomerata</i>	53	20	0
Agróstide rastrero	<i>Agrostis stolonifera</i>	30	38	5
Cola de zorra	<i>Agrostis castellana</i>	85	50	46
Pasto negro	<i>Alopecurus myosuroides</i>	60	30	3
Gramma de olor	<i>Anthoxanthum odoratum</i>	90	60	15
Espiguilla	<i>Poa trivialis</i>	55	10	0
Raigrás	<i>Lolium multiflorum</i>	78	64	50
Cañuela ovina	<i>Festuca ovina</i>	58	38	24
Festuca rubra reptante	<i>Festuca rubra ssp. rubra</i>	82	88	40
Festuca rubra encespigada	<i>Festuca rubra ssp. commutata</i>	48	50	20
Alpiste	<i>Phalaris canariensis</i>	72	60	10
Herbáceas y legumbres				
Lupulina	<i>Medicago lupulina</i>	20	20	24
Pimpinela menor	<i>Sanguisorba minor ssp. Muricata</i>	18	16	2
Garroballa	<i>Vicia sativa</i>	64	60	42
Trébol silvestre	<i>Trifolium pratense</i>	56	56	40
Trébol blanco	<i>Trifolium album</i>	68	36	12
Trébol del juncal	<i>Trifolium dubium</i>	40	36	18
Alfalfa	<i>Medicago sativa</i>	74	84	66
Granos comerciales				
Colza aceitera	<i>Brassica napus var. Olifera</i>	100	100	95
Lino	<i>Linum usitatissimum var. Viking</i>	74	66	38
Lino	<i>Linum usitatissimum var. Elise</i>	94	96	98

5. Cervantes, 1999, empleó plantas de maíz (*Zea mays*) y alholva (*Trigonella foenum grecum*), en pruebas de ecotoxicidad al diesel realizadas en un suelo de jardín. Se realizó la observación de la inhibición de la germinación y crecimiento en las plantas en diferentes tratamientos de diesel que fueron de 0, 5000, 10000, 15000 y 20000 mg/kg. Para el experimento se hicieron germinar y crecer las semillas, durante cuatro semanas, bajo condiciones ambientales con control en el riego. De los resultados obtenidos se encontró que la germinación se vio afectada significativamente en el caso de la alholva ya que presentó porcentajes de germinación por debajo del 40 % a 15000 y 20000 mg/kg.

Se observó que el maíz tuvo una mayor resistencia en las distintas concentraciones de diesel ya que en todos los casos los porcentajes de germinación fueron superiores al 70%.

En el caso del crecimiento, el maíz siguió mostrando mayor resistencia que la alhova, ya que su longitud de raíz y tallo, así como su biomasa, no se vieron afectadas significativamente, como lo demostró el análisis estadístico realizado; por lo contrario, la alhova mostró verse afectada en todas las concentraciones probadas, al mostrar diferencias significativas respecto al control. Los resultados de los índices de tolerancia de tallo y raíz, ITT e ITR respectivamente, (relación entre el peso seco del tallo o raíz, en el suelo contaminado y el suelo sin contaminar) permitieron comparar el crecimiento entre concentraciones; los resultados se muestran la Tabla I.11.

Tabla I.11 Índices de tolerancia de raíces (ITR) y tallo (ITT) en suelo contaminado con diesel (Cervantes, 1999)

Concentración de diesel (mg/kg)	Maíz		Alhova	
	ITT	ITR	ITT	ITR
0 (Control)	1.00	1.00	1.00	1.00
5000	1.04	1.04	0.40	0.43
10000	0.99	1.00	0.27	0.23
15000	0.91	0.91	0.11	0.18
20000	0.89	0.89	0.32	0.17

6. Paez, 2000, empleó plantas como indicadores de toxicidad, utilizó maíz (*Z. mays*), frijol (*P. vulgaris*) y trigo (*T. aestivum*). Se realizaron pruebas de germinación y de crecimiento en un suelo previamente contaminado con petróleo y haciendo diluciones (1.5, 3, 6, 12, 25, 50% del suelo contaminado) para observar los efectos tóxicos del contaminante sobre las semillas a diversas concentraciones. La germinación fue mayor al 90% para las tres especies con la mayor proporción de suelo contaminado (50%). En el caso del crecimiento se encontró que el frijol y el trigo resultaron más resistentes al contaminante que el maíz, pero no se encontraron diferencias significativas de crecimiento en longitud del tallo y de raíz. Los resultados de germinación y crecimiento se muestran en las Tablas I.12 y I.13.

Tabla I.12 Porcentajes de germinación obtenidos para frijol, maíz y trigo (Paez, 2000)

Concentración (% suelo contaminado)	% Germinación		
	Frijol	Maíz	Trigo
0 (Control)	86.7	93.3	100.0
1.5	30.0	93.3	86.7
3	43.3	90.0	100.0
6	40.0	93.3	83.3
12	43.3	86.7	76.7
25	66.7	100.0	100.0
50	93.3	100.0	100.0

Tabla I.13 Valores de longitud de tallo y raíz obtenidos para frijol, maíz y trigo (Paez, 2000)

Concentración (% suelo contaminado)	Longitud de tallo (cm)			Longitud de raíz (cm)		
	Frijol	Maíz	Trigo	Frijol	Maíz	Trigo
0 (Control)	1.10	1.18	1.26	1.01	1.31	1.26
1.5	0.37	1.12	1.09	0.28	1.25	1.09
3	0.54	1.02	1.19	0.57	1.15	1.19
6	0.47	1.05	1.02	0.46	1.13	1.02
12	0.48	0.98	0.92	0.39	1.05	0.92
25	0.78	1.20	1.29	0.69	1.41	1.29
50	1.13	1.33	1.29	1.01	1.46	1.29

7. Domínguez, 2001, evaluó el efecto del diesel residual sobre la germinación y crecimiento de semillas de alpiste y de jitomate, en suelos que fueron sometidos a biorremediación en presencia de texturizantes. Las concentraciones de diesel residual fueron 11459, 25579 y 9835 mg/kg para cada tratamiento. Se obtuvo un 60 % de germinación de semillas de alpiste, debido a su mayor resistencia al diesel. En cambio las semillas de jitomate fueron muy sensibles a la concentración de 25579 mg/kg. Los resultados obtenidos en este experimento se muestran en la Tabla I.14.

Tabla I.14 Porcentajes de germinación y emergencia para alpiste y jitomate en tres concentraciones de diesel residual (Domínguez, 2001)

Muestra	Diesel residual (mg/kg)	Alpiste		Jitomate	
		Germinación (%)	Emergencia (%)	Germinación (%)	Emergencia (%)
Suelo+Fibra de coco+Composta	11459	66	66	57	27
		88	65	72	23
		79	69	62	27
		85	66	68	28
Suelo+Fibra de coco+Composta+ Fertilizante	25579	80	81	11	0
		89	94	17	0
		86	81	12	0
		84	84	12	0
Suelo+Fibra de coco+ Composta+ Harina de hueso	9835	84	75	57	33
		89	87	59	49
		84	72	62	40
		98	86	65	45

8. Quiñónez-Aguilar et al., 2003, realizaron un experimento de invernadero con semillas de maíz, *Zea mays*, con la finalidad de conocer su capacidad de emerger y crecer en un suelo contaminado con petróleo. Se utilizaron 11 recolecciones de maíz criollo de la raza 'Tuxpeño', 10 procedentes de tres localidades de Minatitlán, Veracruz (MV01 a MV10) y un híbrido de valles altos 'Jornalero' (JOR). Además, se emplearon tres concentraciones de petróleo crudo (15000, 25000 y 35000 mg/kg) y un control. Se evaluó el porcentaje de emergencia de las plántulas durante los primeros cinco días desde la siembra; al final del experimento; a los 22 días, se cosecharon las plantas y se evaluaron parámetros, entre ellos: altura de la planta, longitud de raíz, volumen radical, peso seco total, índice de crecimiento en longitud de tallo y raíz e índice de acumulación de biomasa seca.

Como resultado se encontró que la recolección MV08 presentó mayor porcentaje de emergencia en todas las concentraciones de petróleo. Además se encontró que las variedades MV08 y MV06 presentaron un mejor crecimiento en los tratamientos con contaminante, por lo que tienen potencial en la fitorremediación con petróleo crudo. Se encontró también que el tratamiento de 25000 mg/kg favoreció el crecimiento de la mayoría de las plántulas de maíz, por lo que se encontró que esta planta tiene resistencia al petróleo, los resultados de las diferentes variedades del maíz bajo condiciones de 25000 mg/kg de petróleo crudo se presentan en la Tabla I.15.

Tabla I.15 Promedios de parámetros obtenidos para 11 variedades de frijol criollo a concentraciones de 25000 mg/kg de petróleo crudo (Quiñónez-Aguilar et al., 2003)

Variedad	Emergencia (%)	Altura de planta (cm)	Largo de raíz (cm)	Volumen radical (cm ³)	Peso seco total (g)
MV01	12.0	2.9	3.2	0.08	0.01
MV02	39.5	15.2	10.5	0.65	0.14
MV03	47.9	13.9	11.0	0.49	0.12
MV04	62	13.5	11.1	0.65	0.13
MV05	18.7	12.5	8.5	0.50	0.10
MV06	76.6	13.8	11.1	0.60	0.14
MV07	65.8	12.8	10.6	0.51	0.11
MV08	89.1	15.3	12.8	0.68	0.16
MV09	60.8	13.8	10.3	0.58	0.13
MV10	5.0	8.2	5.7	0.12	0.04
JOR	68.3	17.2	11.8	0.71	0.16

De la revisión de las publicaciones referidas, se decidió seleccionar a las semillas de rabanito y alfalfa, para realizar los estudios de toxicidad al diesel. La alfalfa se ha utilizado en pruebas de toxicidad (Wiltse et al., 1998; Adam and Duncan, 1999) además de encontrarse referido en la norma OEDC, 2003. En el caso del rabanito no se encontró referido en la literatura como planta indicadora de contaminación con hidrocarburos; sin embargo, como se mostrará en la metodología, la selección de las semillas se realizó mediante una prueba de germinación.

G. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA ALFALFA Y DEL RABANITO

a. Alfalfa (*Medicago sativa*)

Es una planta forrajera perteneciente a la familia Leguminosae y a la subfamilia *Papilionoidea*. Es una planta perenne, que tiene una raíz pivotante robusta, muy desarrollada y con muchas raíces secundarias. Sus tallos son delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y las inflorescencias. Presenta hojas trifoliadas, aunque las primeras verdaderas son unifoliadas; los bordes de éstas son lisos pero en la parte superior, son ligeramente dentados. Las flores que presenta esta especie, como toda la subfamilia son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas. Su fruto es una legumbre indehisciente (no se abre al madurar), sin espinas que contiene entre dos y seis semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm de longitud.

Esta planta aunque es originaria de Asia Menor y el sur del Cáucaso, su cultivo ha sido muy extendido por Europa y América. Esto se debe a que se emplea como forraje para el ganado, debido a que es una fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales. Otra característica importante es que es fijadora de nitrógeno, para su propio cultivo y para los siguientes cultivos.

También la alfalfa, al ser perenne, es una planta que limita y reduce la erosión, así mismo evita ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación.

Los requerimientos de la alfalfa en cuanto a humedad no son tan grandes ya que debido a su sistema radical puede prosperar en climas semiáridos hasta húmedos, con un intervalo óptimo de precipitación por año entre 500 a 1000 mm. Requiere suelos profundos y bien aireados, ya que es muy sensible a la inundación y disminuye notablemente sus tasas fotosintéticas antes esta situación.

Un factor limitante en el cultivo de la alfalfa es la acidez (pH menor a 6.8); su pH óptimo es de 7.5, pero tiene tolerancia a pH mayores. La planta requiere concentraciones adecuadas de calcio, azufre y fósforo.

El calcio es importante en la nodulación inicial, que es el primer paso para asegurar la fijación biológica del nitrógeno durante la vida de la planta. Esto se debe a que la bacteria nodulante de la alfalfa es *Rhizobium meliloti*, que es una especie neutrófila, que deja de producirse por debajo de pH 5, por lo que si hay una falla en la asimilación de nitrógeno, la alfalfa lo hace evidente. También es sensible a pH ácidos, ya que éstos propician la absorción de micronutrientes perjudiciales para la planta como son el aluminio y el manganeso (Gambeaud, 2000).

La temperatura óptima a la que germina la semilla y crece la planta es entre 28°C y 30°C. Es una planta resistente al frío, que soporta temperaturas de hasta - 15 ° C. El tiempo que tarda en germinar es de 5 a 7 días. La temperatura media anual para la producción forrajera se encuentra entre 18°C y 28 °C. Aunque es una planta perenne, la alfalfa detiene su crecimiento al comenzar el invierno, hasta la llegada de la primavera cuando comienzan a rebrotar. En el estudio presente se empleó la alfalfa variedad oaxaqueña.

b. Rabanito (*Raphanus sativus*)

El rabanito es una planta herbácea de la familia de las Crucíferas. Esta planta posee un ciclo de vida corto, el cual presenta dos etapas: la fase vegetativa, en la que se desarrolla su follaje y sus raíces carnosas, y la fase reproductiva, es la fase del desarrollo de las flores, frutos y semillas. El ciclo vegetativo del rabanito es corto entre 3 a 5 semanas y su tiempo de germinación es muy rápido, de 1 a 5 días.

Esta especie posee un escaso desarrollo de raíces que pueden encontrarse a una profundidad entre 5 y 25 cm. Sus raíces son tuberosas y pueden ser redondas, fusiformes alargadas, ovaladas y cónicas, de color blanco, rojo y amarillo, principalmente. Durante la fase vegetativa el tallo durante suele ser muy corto, tiene hojas que forman una roseta o corona. Las hojas son imparipinnadas (poseen número impar de folíolos), de peciolo largo y de forma ovalada, de borde dentado y el ápice más grande. Las flores pueden ser de color blanco, rosado, violeta y, en algunas ocasiones, amarillas; son de estructura similar a las flores de las crucíferas. Generalmente el rabanito es cosechado antes de que llegue a la fase reproductiva; sin embargo, para la producción de semillas es necesario que produzca flor. El fruto es una silicua indehiscente, que puede alcanzar una longitud entre los 40 cm y 100 cm, siendo también una parte comestible de la planta. Sus semillas tienen forma esferoidal de color marrón a castaño claro, que bajo buenas condiciones de almacenamiento pueden conservar su viabilidad por tres y cuatro años.

El rabanito puede ser cultivado en la mayoría de zonas tropicales y subtropicales, durante todo el año. La temperatura favorable para el desarrollo es entre 15°C y 21°C. La humedad relativa adecuada es entre 60 y 80% de la capacidad de campo, aunque en determinados momentos puede soportar menos del 60%. El suelo debe ser suelto, de preferencia arenoso, pero que contenga un alto contenido de materia orgánica. El pH óptimo para su crecimiento es de 5.5 a 6.8, aunque puede tolerar pH mayores.

Requiere adecuados niveles de nitrógeno, fósforo, potasio y boro; como su ciclo es corto, necesita estos elementos nutritivos en forma fácilmente asimilable.

El rabanito es ampliamente cultivado en nuestro país y ha sido utilizado en trabajos de evaluación de toxicidad de algunas sustancias. La variedad empleada en este experimento fue la Champion la cual se caracteriza por tener una raíz grande, ovalada, de pulpa sólida, consistencia suave y con un follaje pequeño.

II. METODOLOGÍA

A. DESARROLLO EXPERIMENTAL

a. Obtención de los Lotes de Suelo

Se utilizaron dos tipos de suelos para comparar el crecimiento de las plantas: un suelo proveniente de una instalación industrial y otro de una zona agrícola.

El suelo industrial, utilizado en la primera etapa, corresponde al recorte de perforación de pozos de monitoreo de una instalación de PEMEX de la Ciudad de México. Este suelo, que proviene de profundidades entre 0.5 y 4.5 m, estaba contaminado con diesel y fue sometido a biorremediación, llegando a una concentración de diesel residual de 1247 mg/kg. De este suelo se tomaron 150 kg los cuales se homogeneizaron manualmente con una pala, se mantuvo en una charola de fibra de vidrio y se cubrió con plástico para protegerlo de la lluvia. Posteriormente, se tamizó a través de una malla de 4 mm para retirar rocas y agregados muy grandes.

El suelo agrícola, utilizado en la segunda etapa, fue obtenido de un terreno agrícola sin sembrar de la zona del Ajusco, corresponde a la zona de andosoles o suelos formados de ceniza volcánica. Se tomaron aproximadamente 112.5 kg de suelo, de los primeros 30 cm de profundidad; se homogeneizó manualmente con pala, de la misma forma que se procedió con el suelo industrial. Se mantuvo en una charola de plástico y protegido de la lluvia, y se tamizó para retirar rocas, agregados y restos de plantas.

b. Caracterización Inicial del Suelo

De los dos suelos se tomó una muestra compuesta de 1 kg, tomada de varias submuestras para disminuir fuentes de variación. Las muestras compuestas fueron almacenadas en frascos de vidrio con tapa hermética y contratapa de teflón, se mantuvieron a 4°C para realizar diferentes determinaciones de parámetros físicos y químicos.

La caracterización inicial de las muestras incluyó los siguientes parámetros físicos y químicos: humedad total e higroscópica, capacidad de campo, densidad real y aparente, porosidad, textura, pH real, materia orgánica, carbono orgánico, nitrógeno total, fosfatos y concentración de diesel residual.

c. Selección de las Semillas

Aunque se contaba con información respecto al uso de ciertas semillas para evaluaciones de toxicidad, se realizó una selección de semillas de especies de uso comercial con lo que se aseguró su viabilidad y capacidad germinativa.

La prueba de germinación inicial se llevó a cabo con 100 semillas en caja de Petri, con sustrato de papel filtro humedecido, y por triplicado para cada especie. Las especies utilizadas en esta prueba fueron las siguientes:

1. *Coriandrum sativum* (Cilantro)
2. *Helianthus annuus* (Girasol enano)
3. *Lycopersicum esculentum* (Jitomate bola)
4. *Medicago sativa* (Alfalfa)
5. *Phalaris canariensis* (Alpiste)
6. *Phaseolus vulgaris* (Frijol)
7. *Porophyllum ruderale* (Pápalo hoja ancha Citsa)
8. *Poa annua* L. (Pasto Tullfescue Survivor)
9. *Physalis ixocarpa* (Tomate rendidoro)
10. *Raphanus sativus* (Rabano champion francés, rabanito)
11. *Trifolium pratense* (Trébol rojo Kenland)
12. *Triticum aestivum* (Trigo)

A estas mismas especies se les sometió a una prueba de toxicidad al diesel para determinar su sensibilidad al contaminante. Se tomaron 100 semillas, por triplicado, y se hicieron germinar en caja de Petri con el suelo industrial contaminado con diesel a una concentración de 20000 mg/kg.

El criterio utilizado para seleccionar las especies fue una especie resistente con un porcentaje de germinación alto (87%) y una especie con un porcentaje de germinación menor (52%). De esta forma se seleccionó para este estudio el rabanito, *Raphanus sativus*, como planta resistente y a la alfalfa, *Medicago sativa*, como planta sensible. Las semillas de *R. sativus* y *M. sativa*, fueron semillas certificadas para siembra tratadas con Tirán con una pureza del 98% y porcentaje de germinación del 98 y 95% respectivamente. Estas fueron adquiridas en Casa Treviño de la Ciudad de México. Los detalles de la selección de las especies de estudio se encuentran en el Anexo I.

d. Pruebas de Toxicidad al Diesel

i. Primera etapa experimental (suelo industrial)

En esta etapa se realizó la prueba de toxicidad al diesel sobre el crecimiento para las dos especies de plantas seleccionadas utilizando el suelo industrial como sustrato para la siembra. El experimento se llevó a cabo bajo condiciones ambientales, con irrigación diaria para conservar la humedad al 30% aproximadamente. Se colocó un techo de plástico transparente a 1.80 m de altura en la parte más alta y a 1.40 m la parte más baja, para proteger de la lluvia. Se emplearon como unidades experimentales macetas de plástico de 21.5 cm de diámetro en la parte superior y 13.7 cm de diámetro en la parte inferior, con una profundidad de 13.7 cm y capacidad de 2.5 kg de suelo.

1. Diseño del experimento

Después de la homogeneización del suelo se llenaron con éste las macetas de plástico con 2.5 kg cada una. Posteriormente se contaminaron individualmente las unidades, agregando al suelo el volumen de diesel correspondiente y homogeneizando manualmente con una cuchara metálica. Para determinar el volumen de diesel se tomó en cuenta la densidad del diesel (0.83 g/ml) y la concentración de diesel residual existente en el suelo de manera inicial.

Las concentraciones de diesel que se aplicaron fueron 20000, 35000, 50000 y 70000 mg/kg, existió también un control de suelo con una concentración de diesel residual de 1247 mg/kg.

Las repeticiones de las concentraciones de diesel o tratamientos fueron por cuadruplicado, por lo tanto, se utilizó un arreglo bifactorial (planta x concentración de diesel) 3 x 5 en un diseño experimental completamente al azar. Los factores fueron la concentración de diesel (con 5 niveles) y las especies de plantas (con 3 niveles, *R. sativus*, *M. sativa* y suelo sin planta), dando un total de 15 condiciones con 4 repeticiones.

2. Siembra

La siembra se efectuó con 20 semillas aproximadamente, a una profundidad de 2 cm. Cuando las semillas germinaron a los 7 días de siembra y las plantas se establecieron a los 15 días, se eligieron 5 plantas por maceta hasta concluir el experimento que fue a los 56 días para el rabanito (*R. sativus*) y 84 días para la alfalfa (*M. sativa*), debido a que el ciclo de vida del rabanito es más corto. El periodo de siembra fue de junio a septiembre de 2004.

3. Monitoreo

Se tomó la temperatura ambiental tres veces al día (en la mañana entre las 9 y 10 h; tarde, en la tarde entre las 14 y 15 h y en la noche entre las 18 y 19 h), además de los valores extremos (máxima y mínima), con un termómetro ambiental valores máximos y mínimos del día. El riego se aplicó diariamente, para mantener la humedad del suelo al 30%.

De manera mensual se obtuvieron muestras de suelo de 3 puntos en cada maceta, para completar aproximadamente 50 g de éste. Las muestras se almacenaron en frascos de vidrio con tapa hermética y contratapa de teflón. Los frascos con las muestras se conservaron a 4°C.

En las muestras de suelo se realizaron las siguientes determinaciones: humedad, pH, nitrógeno total, fosfatos y diesel residual, para observar posibles cambios de estos parámetros a lo largo del experimento.

4. Cosecha

Al finalizar el tiempo de crecimiento considerado para cada especie, se cosecharon las plantas y se lavaron, para retirar el suelo adherido. A las plantas frescas se les midieron los siguientes parámetros: altura total, largo de raíz, número de hojas, número y diámetro de frutos. Posteriormente, las plantas fueron secadas a 105°C durante dos días para obtener su peso seco o biomasa total.

5. Pruebas de toxicidad en la germinación

De forma separada, se llevó a cabo una prueba de toxicidad en la germinación de el rabanito (*R. sativus*) y la alfalfa (*M. sativa*), para tener mayor exactitud en los porcentajes de germinación. Las semillas se colocaron en cajas de Petri con el suelo industrial como sustrato y se les contaminó con las mismas concentraciones de diesel que se emplearon con las macetas (20000, 35000, 50000 y 70000 mg/kg y un control con 1247 mg/kg). Las pruebas se hicieron por triplicado para cada concentración de diesel. En el caso de *M. sativus* se colocaron 100 semillas por caja de Petri y en el caso de *R. sativus* se colocaron 50 semillas por caja, por tener mayor tamaño. La germinación del control (1247 mg/kg) se comparó también con la germinabilidad de las muestras sin diesel.

Las cajas se mantuvieron en una incubadora a una temperatura de 37°C, durante 7 días. Diariamente se realizaban revisiones para adicionar agua en caso necesario, así como para contar y retirar las semillas que hubieran germinado. Se contaron las semillas germinadas y se sacaron los porcentajes de germinación de la primera etapa experimental.

6. Procesamiento de los datos

Con los datos obtenidos de porcentaje de germinación, altura de la planta, largo de raíz y biomasa, se llevaron a cabo Análisis de Varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias significativas entre las variables y las distintas condiciones. Previamente los porcentajes se transformaron en arcosenos y se les realizó una prueba de homogeneidad de varianzas. En el caso de no cumplir con la prueba de homogeneidad de varianzas se realizó un análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis para observar las diferencias significativas entre grupos basadas en las medianas de cada tratamiento.

A los parámetros medidos en el suelo (pH, nitrógeno total, fósforo y diesel residual) se les aplicaron análisis de varianza (ANOVA); para determinar las diferencias significativas se realizaron pruebas de rango múltiple para determinar cuáles grupos tenían diferencias significativas respecto a los promedios.

Los análisis de varianza y Kruskal-Wallis se llevaron a cabo con el programa STATGRAPHICS Centurion 2006.

ii. Segunda etapa experimental (suelo agrícola)

En esta etapa se llevó a cabo la prueba de toxicidad al diesel para el rabanito (*R. sativus*) y la alfalfa (*M. sativa*), en un suelo agrícola como sustrato de siembra, para comparar si las condiciones del suelo industrial afectaban a las plantas.

Las condiciones en las que se llevó a cabo el experimento fueron muy similares a las de la primera etapa, aunque éste no se realizó al mismo tiempo. El rabanito y la alfalfa fueron sembradas en el periodo de septiembre a diciembre de 2004, con un total de 56 días para rabanito y 84 días para alfalfa.

Las unidades experimentales fueron también macetas de 2.5 kg c/u, aunque esta vez sólo se manejaron tres concentraciones de diesel (0, 20000 y 50000 mg/kg) por triplicado. Por lo tanto el experimento tuvo un arreglo bifactorial (planta x concentración de diesel) 3x3, en un arreglo completamente al azar. Se aplicaron nueve condiciones con tres repeticiones.

La separación de las unidades experimentales y la adición del diesel al suelo para contaminarlo se hizo de la misma forma que se describió en la primera etapa.

El control de la humedad fue similar a la primera etapa, pero esta vez no se llevaron a cabo determinaciones de diesel residual, ni de nitrógeno total, ya que básicamente se deseaba comparar el efecto del diesel sobre la productividad de las plantas.

La cosecha se llevó a cabo con el mismo intervalo que en la primera etapa experimental, 56 días para rabanito (*R. sativus*) y 84 días para alfalfa (*M. sativa*), la obtención de datos y sus tratamientos también se realizó de la misma manera.

Se realizaron también las pruebas de toxicidad la germinación de forma separada al experimento empleando las tres concentraciones de diesel mencionadas, estas se llevaron a cabo en cajas de Petri como se realizó en la primera etapa experimental.

Para los datos de las plantas se realizaron comparación de diferencias significativas por medio de ANOVA y Kruskal-Wallis en caso de no cumplir con la homogeneidad de varianzas, al igual que en la primera etapa experimental.

En el caso de los datos obtenidos del suelo también se les comparó por medio de ANOVA y prueba de rango múltiple, para conocer si existían diferencias estadísticas y en los grupos que se dan.

B. TÉCNICAS ANALÍTICAS

a. Caracterización Física y Química del Suelo

Color del suelo. Método de Munsell (1954). Comparación del suelo húmedo y seco respecto a una tabla de color de Munsell.

Contenido de humedad. Método gravimétrico. Contenido de agua, expresado en porcentaje, obtenido por la diferencia entre el suelo húmedo en el experimento y el suelo secado a 105°C. El secado se realizó en un horno Felisa Mod. 243 (NOM-AA-16-1984; Allison, 1985).

Capacidad de retención de agua. Método de saturación del suelo con agua y drenado por gravedad (Klute, 1986).

Materia orgánica. Se obtuvo mediante el método de Walkley y Black (1947). Método en el que consiste en la oxidación de la materia orgánica con dicromato de potasio, y la posterior titulación del dicromato no consumido en la reacción, con sulfato ferroso FeSO_4 0.5 N.

Carbono orgánico. Se calculó por el método de Walkley y Black (1947). Mediante la fórmula:

$$c.o. = \frac{(\% m.o.)}{1.72}$$

Densidad real (ρ_m). Método picnométrico (Baver, 1956).

Densidad aparente (ρ_p). Método de la probeta (Baver, 1956).

Porosidad. Cálculo a partir de la densidad real y aparente, mediante la ecuación de porcentaje de porosidad (Carter, 1993):

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

Textura. Método del Hidrómetro de Bouyoucos (1962).

pH. Se determinó mediante el método potenciométrico con H_2O como medio para resuspender el suelo, en relación 1:2.5. Se empleó un potenciómetro Hanna HI9023C pH/mV/°C con electrodo de vidrio (Jackson, 1982).

Nitrógeno total. Se determinó por el método de combustión (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. En el caso del suelo industrial se empleó el Método de Olsen, para suelos alcalinos o calizos con un pH mayor a 8, que emplea como solución extractora, una solución de Bicarbonato de Sodio ($NaHCO_3$) 0.5 N. En el caso del suelo agrícola se utilizó el método de Bray I para suelos neutros, el cual emplea una solución de Fluoruro de amonio (NH_4F) y HCl 0.25 N como solución extractora.

Concentración de diesel. Método EPA 8015 (USEPA, 1996) fue realizado por los Laboratorios ABC, Química, Investigación y Análisis, S.A. de C.V.

b. Pruebas de Germinación de las Semillas

Prueba de germinación. Método de germinación de semillas (tres repeticiones con 100 semillas) en cajas de Petri, con sustrato de disco de papel filtro humedecido, colocando semillas e incubando a 37°C durante 7 días. El sustrato se mantenía húmedo añadiendo diariamente agua por aspersión pero evitando tener embebidas a las semillas.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. CARACTERIZACIÓN INICIAL FÍSICA Y QUÍMICA

Al iniciar cada etapa experimental se realizó una caracterización física y química de una muestra compuesta del suelo industrial y otra del suelo agrícola. Los resultados de ambas caracterizaciones se presentan en la Tabla III.1.

Tabla III.1 Características físicas y químicas de los suelos empleados

Parámetro	Suelo industrial	Suelo agrícola
Humedad total (%)	15.11	21.3
Humedad higroscópica (%)	0.035	0.995
Color	Pardo grisáceo (2.5 Y 5/2)- seco	Pardo (10 YR 5/3)- seco
Textura	Franca	Migajón arenoso
Composición (%)	Limo: 47 Arcilla: 16 Arena: 37	Limo: 23 Arcilla: 8.5 Arena: 68.5
pH	9.26	7.18
Porosidad (%)	67.20	59.36
Densidad real (g/cm ³)	2.63	2.44
Densidad aparente (g/cm ³)	0.89	0.99
Capacidad de retención de agua (ml/kg)	600.00	800.00
Materia orgánica (%)	2.95	3.58
Carbono orgánico (%)	1.71	2.08
Nitrógeno total (mg/kg)	719.67	927.19
Fósforo (mg/kg)	98.81	27.67
Diesel residual (mg/kg)	1247.36	63.00

El suelo industrial presentó una textura franca, con un bajo porcentaje de arcilla de 16% y mayor proporción de arenas y limos. Este tipo de textura indica que el suelo tiene una composición relativamente equilibrada de partículas, y que son suelos suaves, parejos y ligeramente plásticos (Aguilera, 1989). Debido a esta característica se observó la formación de agregados pequeños y duraderos, a pesar de la previa homogeneización del suelo. Esta formación de agregados facilita el movimiento de aire y agua, así como la formación de corredores para la extensión y expansión de las raíces.

La textura del suelo agrícola resultó ser migajón arenoso, con una alta proporción de arena (68.5 %) y baja de arcilla (8.5%), es suelo suave con formación débil de agregados. La alta proporción de arenas permite la adecuada aeración del suelo, y la presencia de limos y arcillas permiten la retención de agua, como lo muestra el valor de capacidad de retención de agua de 800 ml/kg.

El color del suelo, está influido por el porcentaje y tipo de materia orgánica, así como por la presencia de algunos minerales oxidados (Aguilera, 1989). En el caso del suelo industrial, éste mostró un color pardo grisáceo; denominación que se complementa con el contenido de materia orgánica de 2.95 %, que corresponde a la nominación de un suelo regular en materia orgánica (Tabla III.2). Los valores anteriores de materia orgánica y color, también indicaron que la concentración de diesel residual existente en éste es baja (1247 mg/kg), ya que el valor de materia orgánica y de porcentaje de carbono se ve afectado por el contenido de hidrocarburos.

En el caso del suelo agrícola, éste presentó un color pardo y un porcentaje de materia orgánica mayor al del suelo industrial (3.58%); sin embargo, según la Tabla III.2, en ambos casos tal parámetro es regular. La diferencia estriba en que en el suelo agrícola, la materia orgánica no se ve alterada por el contenido de diesel residual ya que éste es prácticamente nulo (63 mg/kg); por lo que se puede decir que el total de la materia orgánica proviene de la degradación de desechos orgánicos, no de productos petrogénicos, aprovechables para las plantas y microorganismos del suelo.

Tabla III.2 Nominación para suelos típicos
(Aguilera, 1989; Vázquez and Bautista, 1993; Tavera, 1985)

NOMINACIÓN	Materia orgánica (%)	Nitrógeno (mg/kg)	Fósforo (mg/kg)
Extremadamente pobre	0 - 0.2	< 320	
Pobre	0.8 - 2.0	320 - 630	< 4.0
Regular	2.0 - 4.0	640 - 950	
Medianamente rico	4.0 - 8.0	960 - 1260	4.0 - 6.9
Rico	8.0 - 15.0	1270 - 1580	7.0 - 12.5
Muy rico	15.0 - 30.0	1590 - 2210	
Extremadamente rico	> 30	> 2210	> 12.5

Los valores de densidad aparente toman en cuenta los espacios porosos, en el suelo industrial corresponde a 0.891 g/cm^3 y en el suelo agrícola a 0.995 g/cm^3 . Estos valores se encuentran en el intervalo típico de los suelos minerales. La densidad aparente, junto con el de densidad real, permite conocer el porcentaje de espacio poroso el cual en ambos suelos es alto (67% en el suelo industrial y 59% en el suelo agrícola). Al parecer la mayor cantidad de arcilla del suelo industrial favorece la formación de agregados y por lo tanto, de espacios porosos entre éstos. Los valores altos de espacios porosos indican una buena aireación del suelo y poca compactación, lo cual permite un buen crecimiento vegetal, ya que el desarrollo radical y la penetración de agua se ven limitados de manera significativa cuando las densidades aparentes oscilan entre 1.5 y 1.6 g/ml (Thompson and Troeh, 1982).

La densidad real, en cambio, es mayor ya que considera el peso de las partículas sin incluir el espacio poroso (Aguilera, 1989). Éste es un valor más estable, ya que refleja la densidad media de las partículas minerales más abundantes. El valor promedio de densidad real de la mayoría de suelos minerales se encuentra entre 2.6 y 2.7 g/cm^3 (Paul and Clark, 1996) y en el caso del suelo industrial tiene un valor de densidad real que cae en este intervalo (2.627 g/cm^3); en el caso del suelo agrícola tiene un valor más bajo, de 2.44 g/cm^3 . Lo cual indica en el suelo industrial posee una mayor cantidad de partículas inorgánicas y menor de compuestos orgánicos que el agrícola, pero que aún así, en ambos casos es favorable para las plantas.

En el caso del pH, se puede observar que el suelo industrial cae en el intervalo de pH alcalino lo cual puede en general disminuir la disponibilidad a micronutrientes como el fósforo y boro así como producir una deficiencia creciente de cobre, cobalto, hierro, manganeso y zinc en las plantas (Porta, 1988). Además valores de pH mayores a 8.5 disminuyen la actividad microbiana por lo tanto la degradación (Dibble and Bartha, 1979). Sin embargo, se consideró no modificar el pH, porque se conoce según diversos trabajos realizados (Margesin and Schinner, 1997; 1980; Bossert and Bartha, 1989; Block et al., 1991), la presencia de contaminantes orgánicos favorece la acidificación del suelo. Esto se debe a los ácidos orgánicos y CO_2 como producto de la degradación de los hidrocarburos (Pepper et al., 1996).

Una de las razones por las que el pH del suelo industrial fue tan alcalino es que aparentemente contenía carbonato de calcio (CaCO_3), esto se dedujo cuando a una pequeña porción del suelo se le trató con ácido clorhídrico y se observó efervescencia. Según la literatura los suelos con sales pueden tener un intervalo de pH entre 8.5 y 10 (Foth and Turk, 1972); sin embargo, no se realizó ninguna prueba para verificar la presencia de sodio.

Por otra parte, cada planta adquiere mayor vigor y productividad dentro de cierto intervalo de valores de pH según su tolerancia. En el caso del rabanito, su crecimiento óptimo es de 6 a 6.8, aunque tiene tolerancia a valores mayores. En el caso de la alfalfa su crecimiento óptimo es a pH 7.5 y tiene una mayor resistencia que el rabanito a pHs elevados. En el caso de la degradación de los hidrocarburos es óptima para los microorganismos en un intervalo de pH amplio de 6 a 8 (Pelkzar et al., 1982).

El suelo agrícola tuvo un pH neutro (7.16), por lo que de manera inicial este valor no representaba ningún problema para el adecuado crecimiento de las plantas. Aunque era posible que disminuyera por la contaminación con diesel.

Las concentraciones de nitrógeno en los suelos industrial y agrícola fueron regulares según la nominación de suelos (Tabla III.2). La concentración de fósforo en el suelo industrial fue de 98.81 mg/kg y en el suelo agrícola de 27.67 mg/kg, corresponden a un intervalo regular a óptimo para este parámetro según la Tabla III.2. Debido a que las concentraciones de fósforo y nitrógeno de ambos suelos resultaron suficientes, se consideró que no era necesario adicionar algún tipo de fertilizante.

B. EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DEL DIESEL SOBRE LA GERMINACIÓN

La germinación es uno de los parámetros más comunes que se utilizan en los ensayos de toxicidad (EPA, 1996 a). Estos permiten evaluar los niveles tóxicos de un contaminante a una planta ya sea cuando un suelo está contaminado o después de haber sido sometido a una remediación. Un aspecto importante es que cada especie de planta presenta cierto intervalo de sensibilidad en función del contaminante, de las condiciones del suelo y del clima (Safferman, 1998). Es por eso que para evaluar los niveles tóxicos del diesel se emplearon dos plantas, una resistente que fue el rabanito (*R. sativus*) y otra sensible, la alfalfa (*M. sativa*).

La razón por la que las dos semillas fueron sembradas en el suelo industrial y en el suelo agrícola fue para observar si la presencia de diesel residual en el suelo industrial pudiera afectar la germinación de las semillas.

De los ensayos de germinación realizados se obtuvieron los resultados que se resumen en la Tabla III.3, en los que se presentan los valores promedio de los porcentajes de germinación, su desviación estándar y si los grupos heterogéneos según la prueba de rango múltiple.

Tabla III.3 Porcentaje de germinación de las semillas en los suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel

Concentración de diesel (mg/kg)	PORCENTAJE DE GERMINACIÓN (%)			
	Suelo industrial		Suelo agrícola	
	Rabanito	Alfalfa	Rabanito	Alfalfa
0 (Control)			92 ± 4.36a	86±1.53 a
1247 (Control)	92 ± 4.16a	72 ± 5.51b		
20000	81 ± 6.65a	38 ± 6.65b	90 ± 8.18a	55±3.51 b
35000	81 ± 5.56a	41 ± 4.58b		
50000	83 ± 11.01a	37 ± 7.09b	71 ± 14.22a	60±7.63 b
70000	80 ± 8.02a	28 ± 17.95a		

Valores promedio por repeticiones analíticas, por concentración

Los porcentajes de germinación más bajos fueron los de la alfalfa (*M. sativa*) en el suelo industrial y también en el suelo agrícola. El menor porcentaje de germinación, de 28%, se obtuvo en el suelo industrial con una concentración de diesel de 70000 mg/kg. En cambio el rabanito presentó los mayores porcentajes de germinación en el suelo industrial, con valores mayores o iguales al 80% en todas las concentraciones de diesel.

Según los análisis de varianza (ANOVA) con los valores previamente transformados en arcosenos se observa que solamente existen diferencias significativas para la germinación de la alfalfa en el suelo industrial y suelo agrícola, lo cual significa que las concentraciones de diesel afectan el porcentaje de germinación de la alfalfa en estos suelos. En este caso del suelo industrial, la concentración de diesel 70000 mg/kg fue la que afectó más notoriamente a la germinación de la alfalfa, al ser el único grupo estadísticamente diferente respecto a los demás tratamientos. En el caso de la germinación de la alfalfa en suelo agrícola desde la concentración de diesel de 20000 mg/kg, se observan diferencias significativas.

En el caso de la germinación de rabanito en el suelo industrial y agrícola, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de diesel y se muestran valores altos de germinación, por lo que se puede decir que existe una tolerancia de esta especie al diesel.

En estudios realizados con alfalfa (Wiltse et al., 1998), se ha demostrado que la germinación se ve afectada por una concentración de petróleo de 20000 mg/kg. Sin embargo, también se ha encontrado que existen diferencias entre variedades. En un ensayo de toxicidad realizado por Adam and Duncan (1999), se observó que la alfalfa presentó una germinación de 84% y 66% en un suelo contaminado con diesel a 20000 y 50000 mg/kg, respectivamente. En cambio en los resultados obtenidos por este experimento se observa un porcentaje de germinación de 38% y 37% para las mismas concentraciones de diesel respectivamente, en el suelo industrial.

En el suelo agrícola también se observa un bajo porcentaje de germinación, aunque mayor con respecto al del suelo industrial. La alfalfa presentó un porcentaje de germinación de 60%, para el suelo con una concentración de diesel de 50000 mg/kg, lo cual es un valor semejante a lo obtenido por Adam and Duncan (1999), a la misma concentración, que fue de 66% de germinación.

En el caso del rabanito, aunque es una especie recomendada en la OEDC para pruebas toxicológicas y es una especie de rápido crecimiento, no se han encontrado registros de haberse utilizado en pruebas de toxicidad al diesel. Se utilizó como planta resistente por su alto porcentaje de germinación en sustrato sin contaminar y en un suelo contaminado con una concentración de diesel de 20000 mg/kg como se mencionó anteriormente (Anexo I).

En general se puede observar una disminución en los porcentajes de germinación, respecto al aumento de la concentración de diesel; y que la alfalfa es más sensible a este contaminante que el rabanito, ya que sus porcentajes de germinación presentan diferencias significativas y el rabanito no presenta estas diferencias (Anexo II). En las Figuras III.1, III.2, III.3 y III.4 se muestran las fotografías de las pruebas de germinación de alfalfa y rabanito en ambos tipos de suelo, en estas se puede notar también el desarrollo radicular de las plántulas.

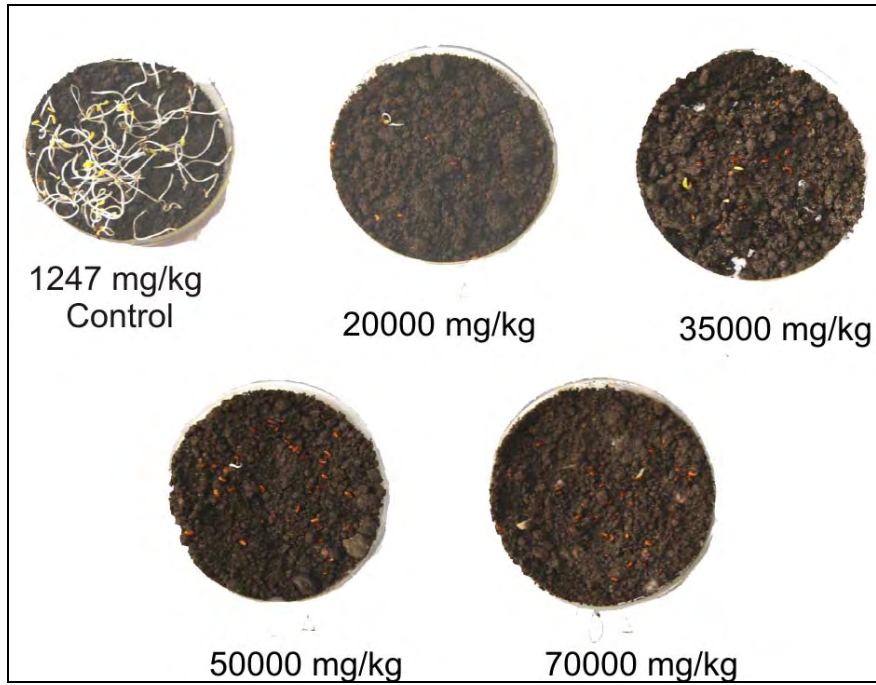


Fig III.1 Prueba de germinación de la alfalfa a diferentes concentraciones de diesel en el suelo industrial

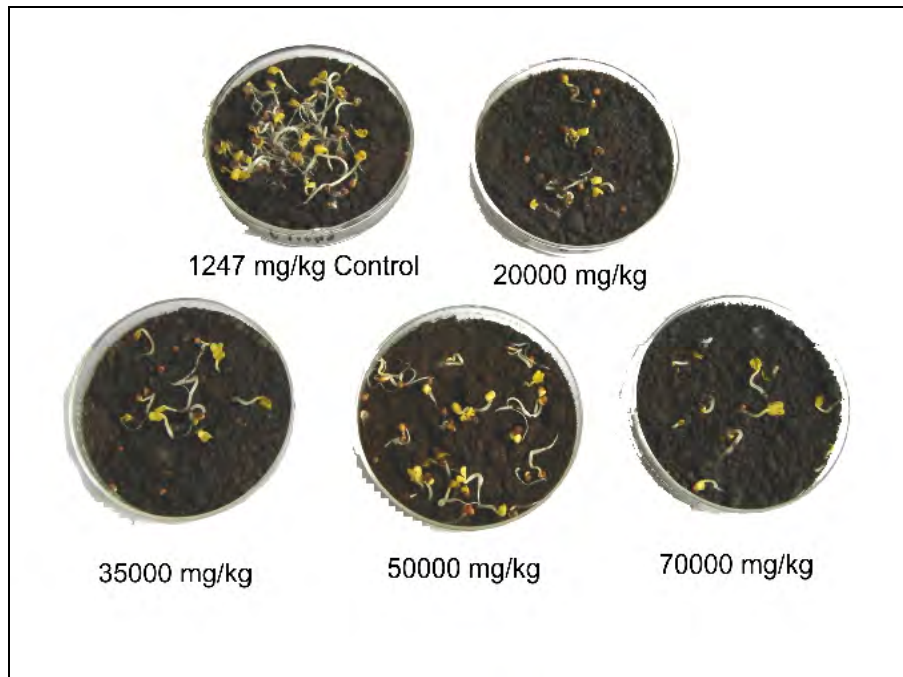


Fig III.2 Prueba de germinación del rabanito a diferentes concentraciones de diesel en el suelo industrial

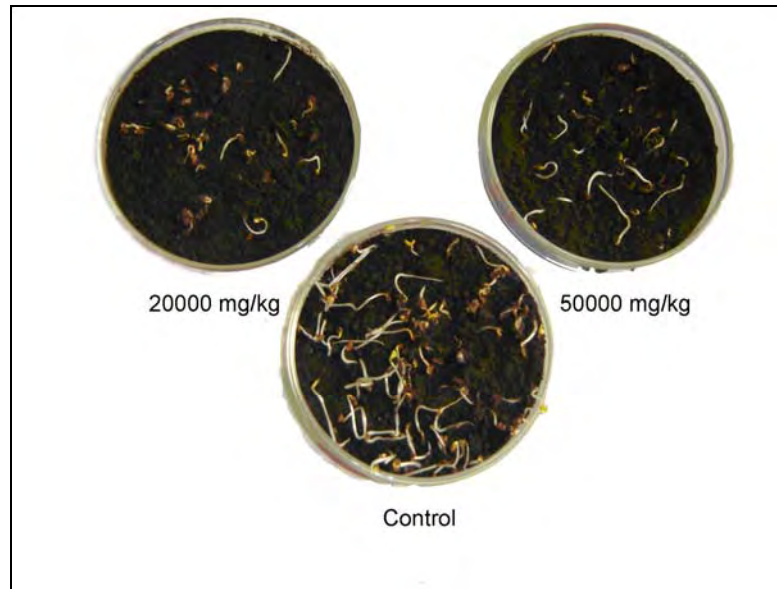


Fig III.3 Prueba de germinación de la alfalfa a diferentes concentraciones de diesel en el suelo agrícola

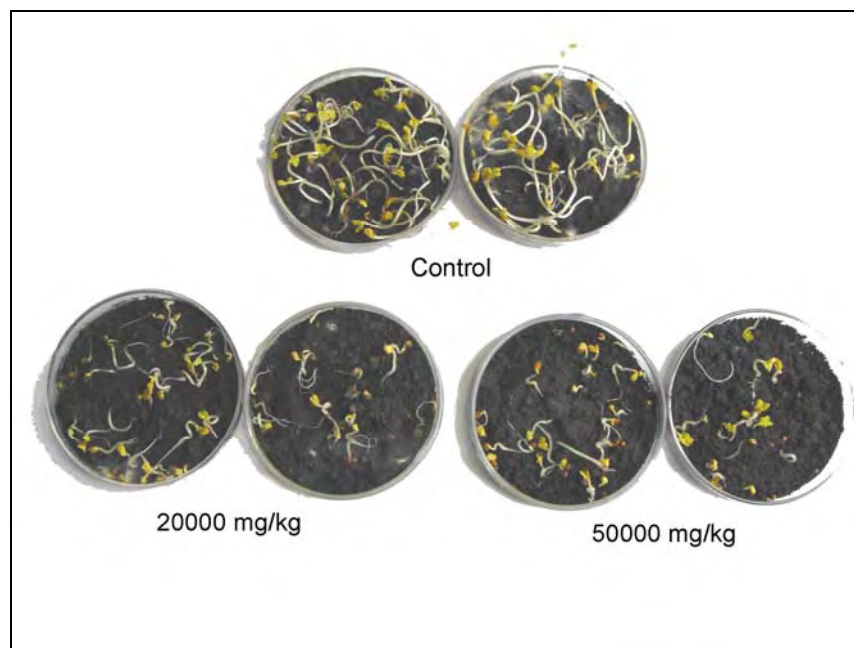


Fig III.4 Prueba de germinación del rabanito a diferentes concentraciones de diesel en el suelo agrícola

C. EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL DIESEL SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO

a. Altura de Tallo

La altura de tallo es un parámetro útil que se mide en los ensayos de toxicidad. Esto se debe a que se puede evaluar cuantitativamente, permitiendo observar el grado de afectación en el crecimiento que tiene una planta en presencia de un contaminante. Las guías OEDC (2000) y EPA (1996 b), sugieren medir el tamaño de la planta, en los ensayos de toxicidad, es por eso que se optó por hacer estas mediciones.

En general, las plantas tienen diferentes grados de afectación dependiendo de su especie y la sensibilidad a un contaminante puede variar en función de factores ambientales, así como de factores propios de la planta, como el estadio de vida. A este último factor se le dio importancia, ya que la germinación de una planta, no asegura la supervivencia, el establecimiento, ni el desarrollo adecuado de éstas.

Los datos obtenidos de la altura se presentan a continuación como los valores promedios obtenidos de cada maceta y a su vez de las repeticiones efectuadas; sin embargo, en todos los casos se promediaron las alturas de las plantas vivas, sin importar la sobrevivencia (Tabla III.4).

Tabla III.4 Altura de tallo de la alfalfa y del rabanito, en suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel

Concentración de diesel (mg/kg)	ALTURA DEL TALLO (cm)			
	Suelo industrial		Suelo agrícola	
	Rabanito	Alfalfa	Rabanito	Alfalfa
Control (0)			8.15 ± 0.35 a	13.87 ± 3.67 a
Control (1247)	5.29 ± 0.82 a	4.72 ± 1.72 a		
20000	3.20 ± 0.41 b	1.62 ± 0.16 b	2.7 ± 0.17 b	0.54 ± 0.33 b
35000	2.92 ± 0.41 b	1.13 ± 0.17 b		
50000	2.42 ± 1.15 bc	0.50 ± 0.31 c	0 ± 0 c	0 ± 0 b
70000	1.74 ± 0.41 c	0.50 ± 0.57 c		

Las alturas mayores se obtuvieron en el suelo agrícola sin contaminar (control) para el rabanito y la alfalfa, ya que el suelo agrícola no presentaban factores desfavorables como el diesel y la alcalinidad, que existió en el suelo industrial. La alfalfa mostró un mayor crecimiento respecto al rabanito puesto que es una planta forrajera, y el rabanito es una hortaliza de tamaño menor.

Sin embargo en los valores de ambas especies hubo una inhibición muy marcada del crecimiento en el suelo agrícola con concentraciones de diesel de 20000 mg/kg, y no lograron sobrevivir a 50000 mg/kg.

En el caso del suelo industrial, se observó que el crecimiento de las plantas se vio afectado a medida que la concentración de diesel aumentó; sin embargo, su sobrevivencia fue mayor que en el suelo agrícola. De manera más particular, el rabanito presentó valores más altos de crecimiento que alfalfa y mayor sobrevivencia, ya que las plantas de alfalfa en las concentraciones de diesel de 50000 y 70000 mg/kg se marchitaron en su mayoría.

De los análisis de varianza realizados, ANOVA (Anexo III), se observó que en todos los casos la altura presentó diferencias significativas; en el caso de los datos de altura de la alfalfa sembrada en el suelo industrial, se observó que no existió homogeneidad de varianzas por lo que se aplicó un análisis Kruskal-Wallis en el cual se observó que existían diferencias significativas entre los rangos de los valores comparando las medianas de los grupos ($p=0.0019$) y que formaban tres grupos marcados. Desde la concentración de diesel de 20000 mg/kg se observa una disminución de la altura y se forma otro grupo de menor altura con los datos de 50000 y 70000 mg/kg.

En el caso del rabanito sembrado en suelo industrial, las diferencias de los valores de altura se observaron desde la concentración de diesel de 20000 mg/kg; en las concentraciones de 20000 a 50000 mg/kg no se observaron diferencias estadísticas, hasta la concentración de 70000 mg/kg. Se puede observar una disminución más paulatina, que respecto a la alfalfa sembrada en este mismo suelo, lo cual indica una mayor resistencia que la alfalfa.

En los valores del suelo agrícola se observaron que las tres concentraciones presentaron diferencias significativas tanto para el rabanito como para la alfalfa, existió una marcada disminución de la altura a 20000 mg/kg de diesel, y una mortalidad completa a 50000 mg/kg.

La mortalidad de ambas semillas en el suelo agrícola, es un resultado no esperado puesto que el suelo agrícola tenía mejores características para el adecuado crecimiento de las plantas. Es posible que la causa sea la textura del suelo (migajón arenoso), que no pudo adsorber el diesel y por lo tanto éste formó una capa en la parte superior del suelo que causó toxicidad a las plantas, lo cual se observó en el suelo como una película oscura en la parte superior; con lo que se pudo haber ocasionado un ambiente anaerobio.

b. Longitud de la Raíz

Otro parámetro cuantitativo útil en estudios de toxicidad, es la longitud de la raíz, los resultados de los promedios de cada concentración se presentan en la Tabla III.5.

Tabla III.5 Longitud de la raíz de la alfalfa y del rabanito, en suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel

Concentración de diesel (mg/kg)	LONGITUD DE LA RAÍZ (cm)			
	Suelo industrial		Suelo agrícola	
	Rabanito	Alfalfa	Rabanito	Alfalfa
0 (Control)			7.66 ± 1.04 a	13.27 ± 2.47 a
1247 (Control)	5.94 ± 0.55 a	8.00 ± 2.53 a		
20000	4.26 ± 0.68 bc	2.62 ± 0.48 b	2.61 ± 0.70 b	0.46 ± 0.33 b
35000	3.07 ± 1.83 bc	3.06 ± 0.73 bc		
50000	2.86 ± 1.02 c	1.87 ± 1.17 bc	0 ± 0 c	0 ± 0 b
70000	1.59 ± 0.45 d	0.73 ± 0.86 c		

El valor más alto corresponde al crecimiento de la alfalfa en suelo agrícola, ya que al ser una planta forrajera que se establece en zonas con poca humedad, requiere raíces más largas que el rabanito. Sin embargo, nuevamente la alfalfa presentó una marcada disminución de la longitud de sus raíces a partir de una concentración de diesel de 20000 mg/kg lo cual es corroborado mediante el ANOVA realizado y la prueba de rango múltiple en la que se muestra que a partir de la concentración de diesel de 20000 mg/kg los valores de longitud son estadísticamente diferentes respecto al control.

En el caso del rabanito sembrado en el suelo industrial, aunque los datos muestran una disminución menor, el ANOVA y la prueba de rango múltiple muestran un comportamiento similar al de la alfalfa, siendo valores estadísticamente diferentes desde la concentración de diesel 20000 mg/kg. El rabanito presenta un marcado decrecimiento en el suelo agrícola con la misma concentración de diesel aunque la disminución fue menor respecto a la alfalfa y para ambos casos los datos presentan diferencias significativas en cada tratamiento (Anexo IV).

Para ambas especies, se puede observar que la longitud de la raíz es menor en el suelo agrícola que en el industrial, ya que al compararse este parámetro en las mismas concentraciones de diesel, se observan menores valores de longitud en el suelo agrícola que industrial; sin embargo, esto no es posible compararse directamente puesto que los experimentos no se llevaron a cabo en la misma temporada, lo cual también podría aportar diferencias en el crecimiento.

c. Biomasa

La biomasa se mide como el peso seco de una planta y es un parámetro muy empleado en la medición del crecimiento de las plantas en pruebas de toxicidad (OEDC, 2003; EPA, 1996 b; FDA, 1987; Quiñónez et al., 2003; Paez 2000; Cervantes, 1999; Salanito, 1997).

Las plantas de rabanito y alfalfa obtenidas a diferentes concentraciones de diesel tuvieron un desarrollo muy pobre por lo que los valores de biomasa, fueron muy bajos y se presentan en miligramos (mg) en la Tabla III.6.

Tabla III.6 Biomasa de la alfalfa y del rabanito en suelos industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel

Concentración de diesel (mg/kg)	BIOMASA (mg)			
	Suelo industrial		Suelo agrícola	
	Rabanito	Alfalfa	Rabanito	Alfalfa
0			188.2 ± 33.24 a	335.94 ± 178.81 a
C (1247)	37.78 ± 7.91 a	22.07 ± 13.30 a		
20000	23.72 ± 4.31 b	8.27 ± 6.70 b	16.8 ± 16.88 b	0.35 ± 0.10 b
35000	18.94 ± 14.03 bc	3.72 ± 1.64 b		
50000	16.42 ± 9.65 bc	1.34 ± 0.89 b	0 ± 0 b	0 ± 0 b
70000	6.88 ± 2.44 c	0.67 ± 0.84 b		

Los mayores valores de biomasa se obtuvieron para las dos plantas en el suelo agrícola sin contaminar, lo cual es de esperarse ya que eran las condiciones más favorables para su crecimiento. La alfalfa presentó la mayor biomasa, 335.94 mg, lo cual puede deberse, entre otros factores, a que es una planta forrajera y su crecimiento en longitud es mayor, además de que presenta una mayor cantidad de hojas respecto al rabanito (188.2 mg). Según los ANOVAS realizados todos los valores de biomasa presentaron diferencias significativas respecto a la concentración de diesel añadida (Anexo V). De forma más particular se puede observar en la Tabla III.6 que los valores de biomasa para rabanito son bajos respecto al control sin diesel del suelo agrícola, pero tuvieron un decrecimiento más paulatino que la alfalfa respecto al aumento de la concentración de diesel. Esto se observa en los valores de la prueba de rango múltiple en la que se muestra que las concentraciones de diesel de 20000, 35000 y 50000 mg/kg son grupos que no presentan diferencias significativas, en cambio los valores de la concentración de 70000 mg/kg presenta diferencias estadísticas respecto al resto de tratamientos. Esto indica tolerancia del rabanito al diesel, respecto a la alfalfa.

En cambio la alfalfa en el suelo industrial, presentó una disminución marcada a partir de la concentración de diesel de 20000 mg/kg, lo cual se comprueba en la prueba de rango múltiple que muestra que el control con diesel residual (1247 mg/kg) es el único grupo estadísticamente diferente, que presentó el mayor valor de biomasa (22.07 mg)

En el caso del suelo agrícola se observa una marcada disminución de la biomasa con respecto al incremento de la concentración de diesel en el suelo, y la prueba de rango múltiple lo corrobora al mostrar que los resultados de la biomasa para de las tres concentraciones, son estadísticamente distintos. A una concentración de diesel de 50000 mg/kg las plantas germinaron y emergieron pero no sobrevivieron hasta el final del experimento.

d. Número de Hojas

El número de hojas puede ser también parámetro de comparación del crecimiento de las plantas, los resultados de los valores promedio para cada concentración se muestran en la Tabla III.7.

Tabla III.7 Número de hojas de la alfalfa y del rabanito, en el suelo industrial y agrícola a diferentes concentraciones de diesel

Concentración de diesel (mg/kg)	NUMERO DE HOJAS			
	Suelo industrial		Suelo agrícola	
	Rabanito	Alfalfa	Rabanito	Alfalfa
0 (Control)			4 ± 1.61 a	20 ± 0.66 a
1247 (Control)	3.0 ± 0.5 a	4.5 ± 1.73 a		
20000	3.0 ± 0 a	1.25 ± 0.96 b	2 ± 1.73 ab	2 ± 0.66 b
35000	2.5 ± 1 ab	1.25 ± 0.5 b		
50000	2.5 ± 1 ab	1.25 ± 0.5 b	0 ± 0 b	0 ± 0.66 b
70000	1.75 ± 1 c	0.5 ± 0.57 b		

El rabanito es una especie que produce una corona de hojas escasas y en el caso de la alfalfa produce en sus primeros estadios abundantes hojas trifoliadas, lo cual se observó en el experimento.

Lo que se detectó en la medición del número de hojas fue que en el caso de rabanito prácticamente no existió diferencia entre el número de hojas en las distintas concentraciones de diesel, por lo que no es un parámetro que aporte mucha información para el caso del rabanito.

El promedio de hojas para el rabanito en el suelo industrial fue de 3 para el control con diesel 1247 mg/kg y 20000 mg/kg; este promedio disminuyó a 2.5 y 1.75 en concentraciones de diesel de 50000 y 70000 mg/kg. Según el ANOVA y la prueba de rango múltiple realizadas (Anexo VI) el efecto del diesel no es significativo en este parámetro para ningún tipo de suelo.

La alfalfa es una planta que produce más hojas, por lo que es posible observar mejor el decremento en esta variable conforme aumenta la concentración de diesel en el suelo. En el caso del suelo industrial la alfalfa tuvo el mayor número de hojas en el suelo control (4.5 hojas), posteriormente disminuyó su número a 1.25 hojas. En el suelo agrícola se observó que las plantas de alfalfa sembradas en ausencia de diesel presentaron el número de hojas más alto, que fue 20; mientras que a una concentración de diesel de 20000 mg/kg de diesel disminuyó a 2. Los ANOVAS realizados para alfalfa muestran un efecto significativo del diesel a partir de 20000 mg/kg para el suelo industrial y agrícola.

e. Fruto

El número o diámetro de los frutos, es un parámetro que puede servir para comparar el crecimiento y el desarrollo de las plantas. En el caso particular del presente estudio, el efecto del diesel se evaluó en el rabanito, ya que posee un ciclo corto, entre tres y cinco semanas, se pudo observar la existencia de fruto. La alfalfa, por ser una planta perenne requiere un tiempo mayor para producir fruto, superior al que duró el experimento.

Wilse et al., (1998) encontraron que en un suelo contaminado de hidrocarburos las plantas maduran más lentamente. En el suelo agrícola sin contaminar y el control del suelo industrial con una concentración de diesel de 1247 mg/kg, los frutos aparecieron entre la semana seis y siete; su tamaño fue pequeño, debido en parte a que la especie por naturaleza desarrolla frutos pequeños; además de que las condiciones ambientales, como el pH y la temperatura, así como el hecho de que fueran sembradas en maceta, no fueron las óptimas para su desarrollo.

En el control del suelo industrial, las plantas de rabanito que llegaron a presentar frutos tuvieron diámetros de 0.3 a 0.5 cm. De hecho el promedio de diámetro de rabanito fue de 0.2 cm. En el caso del suelo agrícola sin contaminar, los frutos presentaron diámetros de 0.5 a 1.1 cm.

No se realizaron ANOVAS, ya que fue evidente el efecto del diesel sobre el desarrollo de los frutos. En presencia de diesel el rabanito no pudo concluir su fase vegetativa, ya que no se observó la producción de frutos.

En las Figuras III.5 y III.6 se muestran fotografías de las plantas de alfalfa y rabanito obtenidas para las diferentes concentraciones de diesel crecidas en el suelo industrial, mientras que en las Figuras III.7 y III.8 Se muestra lo correspondiente en el suelo agrícola, omitiéndose las de la concentración de diesel de 50000 mg/kg debido a que no lograron sobrevivir. Se muestran las plantas obtenidas en una maceta.

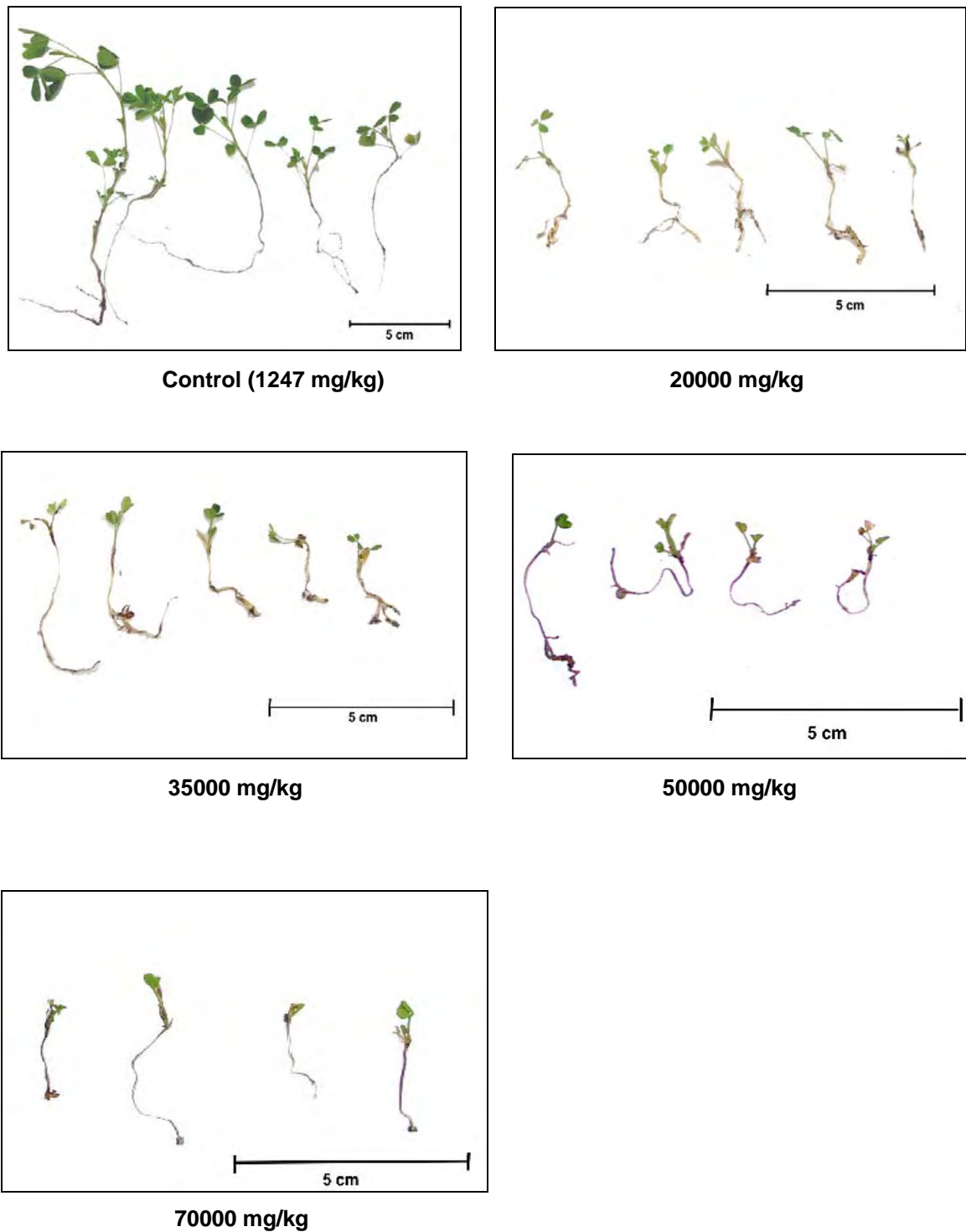


Fig III.5 Desarrollo de las plantas de alfalfa sembradas en suelo industrial a diferentes concentraciones de diesel

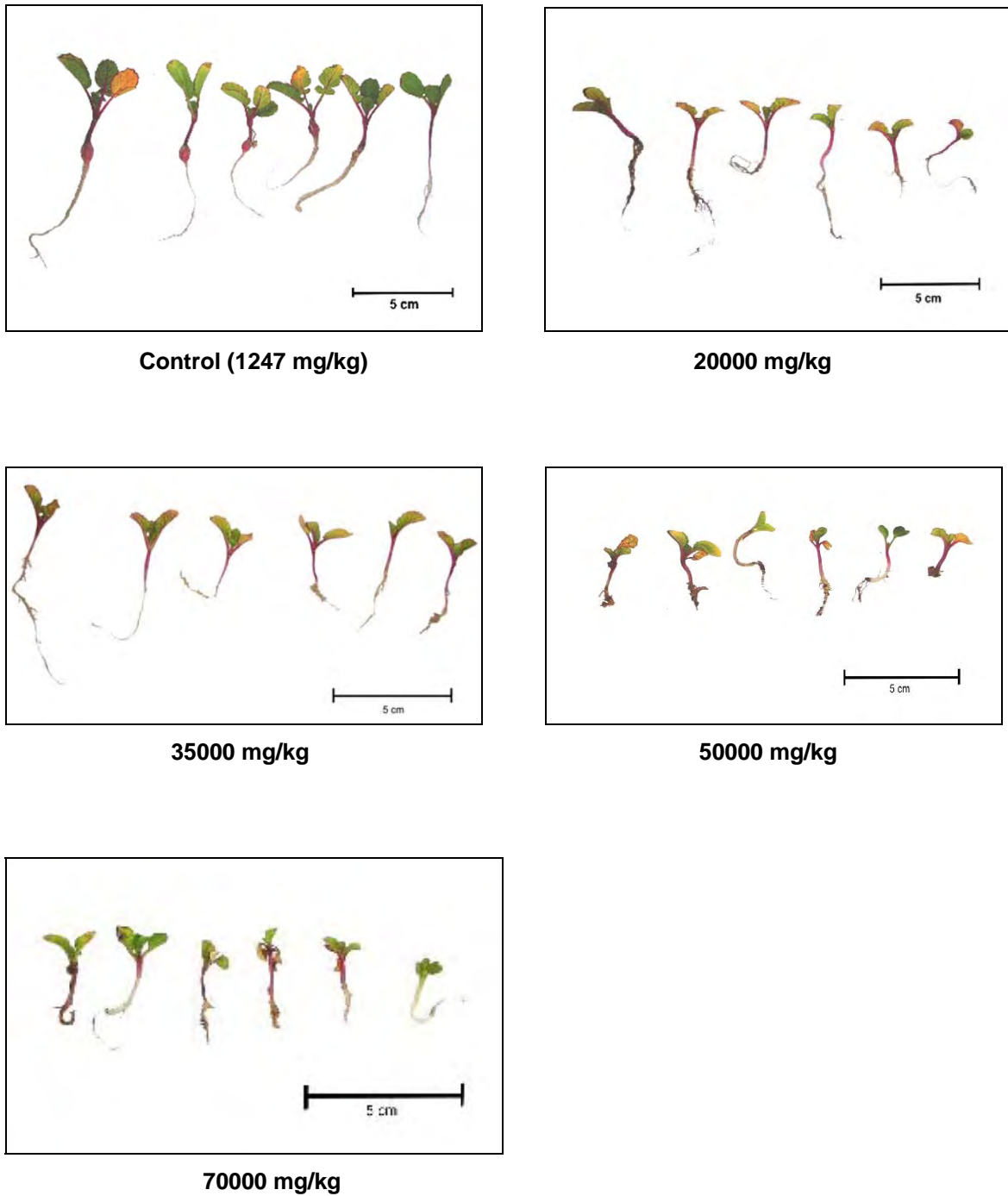
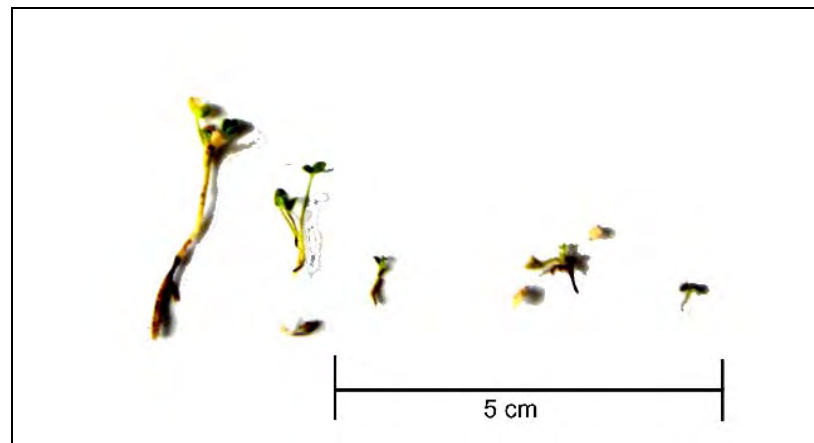


Fig III.6 Desarrollo de las plantas de rabanito sembradas en suelo industrial a diferentes concentraciones de diesel



Control



20000 mg/kg

Fig. III.7 Desarrollo de las plantas de alfalfa en suelo agrícola control y con una concentración de diesel de 20000 mg/kg



Control



20000 mg/kg

Fig. III.8 Desarrollo de plantas de rabanito sembradas en suelo agrícola control y con una concentración de diesel de 20000 mg/kg

D. PARÁMETROS QUÍMICOS DEL SUELO

a. pH

El pH es un índice representativo, que permite conocer el grado de saturación de las bases y orienta sobre los elementos nutritivos asimilables por las plantas (Porta, 1999). El pH óptimo para la mayoría de los cultivos es entre 6 y 7, aunque la tolerancia varía entre las especies de plantas.

En el estudio se midió el pH mensualmente, los valores obtenidos para el suelo industrial se presentan en la Tabla III.8. Los análisis estadísticos se realizaron con los datos hasta los 56 días para que el tiempo fuera un factor comparable para ambas plantas.

Tabla III.8 Variación del pH en el suelo industrial, donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito

	Concentración de diesel (mg/kg)	Tiempo (días)			
		0	28	56	84
Alfalfa					
	1247 (Control)	9.41	8.97	9.06	8.76
	20000	9.32	8.75	8.96	8.42
	35000	9.36	8.77	9.40	8.45
	50000	9.28	8.64	9.01	8.44
	70000	9.03	8.81	8.70	8.19
Rabanito					
	1247 (Control)	9.29	9.13	8.72	
	20000	9.32	8.68	9.54	
	35000	9.20	8.69	9.16	
	50000	9.25	8.69	9.14	
	70000	9.05	8.56	9.30	
Testigo sin planta					
	1247 (Control)	8.69	8.88	8.87	8.79
	20000	8.56	8.72	9.07	8.49
	35000	8.62	8.80	9.16	8.48
	50000	8.87	8.72	9.39	8.42
	70000	8.59	8.65	8.83	8.44

De los valores obtenidos se puede observar que el suelo es del tipo alcalino, ya que en casi todos los casos el valor es mayor a 8.5. Según Foth and Turk (1981), los suelos con pH entre 8.5 y 10 contienen carbonatos de calcio (CaCO_3) y de sodio (NaOH) en pH de 8.5 a 10.

Aunque en el ANOVA multifactorial aplicado (Anexo VII), se obtuvo que la especie sembrada afectó de manera significativa el pH; en la prueba de rango múltiple se señala que el grupo del testigo sin planta fue el que tuvo valores de pH significativamente diferentes. El hecho de que el pH del suelo es mayor en las unidades con plantas, sólo puede explicarse por la heterogeneidad del suelo ya que la disminución del pH se observa desde el inicio del experimento a los 0 días, correspondiendo la variación al tipo de muestra que se tomó que tenía un bajo pH.

Un aspecto que se observa en la Tabla III.9 es que el pH disminuyó ligeramente conforme aumentó la concentración de diesel, de hecho, menores valores para cada especie se encontraron en las concentraciones de diesel de 70000 mg/kg. Sin embargo, al realizar el ANOVA multifactorial (Anexo VII), se observa que el pH respecto al factor concentración no presentó diferencias significativas, por lo que no se demuestra que el pH del suelo se ve afectado con la presencia de hidrocarburos.

En el caso del factor tiempo, el ANOVA arrojó que los valores de pH también tienen diferencias significativas a lo largo del tiempo. Se observa que para el día 28 los valores de pH son menores (8.76 promedio), pero para el día 56 los valores en promedio aumentan (9.04), casi al valor inicial por lo que no se puede saber con certeza si la ligera disminución del pH es producto de la degradación del contaminante. Sin embargo, hay que tomar en cuenta que como se realizaron los ANOVAS con los datos hasta 56 días para ser comparables, los últimos valores del día 84 para la alfalfa podrían indicar una mayor disminución de este factor.

La variación del pH en el suelo agrícola se presenta en la Tabla III.10. Los ANOVAS también se realizaron con los datos hasta el día 56 para poderlo comparar entre especies de plantas.

Tabla III. 9 Variación del pH en el suelo agrícola, donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito

	Concentración de diesel (mg/kg)	Tiempo (días)			
		0	28	56	84
Alfalfa					
	0	6.92	6.92	7.17	7.02
	20000	7.13	6.83	7.31	7.04
	50000	6.81	6.89	7.16	7.01
Rabanito					
	0	7.10	7.10	7.26	
	20000	6.82	6.88	7.23	
	50000	6.67	6.69	6.17	
Testigo sin planta					
	0	6.90	6.68	7.09	6.86
	20000	7.09	6.74	7.28	7.11
	50000	6.83	6.75	6.93	7.10

Se puede observar que el pH del suelo agrícola es prácticamente neutro, óptimo para el crecimiento de las plantas. El intervalo de valores (6.68 – 7.28) es menor al del suelo industrial, por lo que comparativamente se podría decir que era un suelo menos heterogéneo.

Al realizar el ANOVA multifactorial, se encontró que los factores que afectaron al pH fueron la concentración de diesel y el tiempo transcurrido. Para el factor concentración, se encontró que el tratamiento con 50000 mg/kg disminuyó el pH con un valor promedio de 6.81; según la prueba de rango múltiple realizada, se muestra que éste es el grupo significativamente diferente, puesto que la concentración de 0 y 20000 mg/kg los promedios fueron muy similares, de 7 y 7.04 respectivamente. Por lo que, según la prueba estadística, la adición de diesel a una concentración de 50000 mg/kg produce una ligera disminución del pH, debido a los productos de la degradación de éste contaminante. Sin embargo, el hecho de que haya habido una variación de pH, probablemente se debe a que los suelos neutros no poseen una gran capacidad amortiguadora (Margesin and Schinner, 1997).

En el caso del factor tiempo, se observa la mayor disminución del pH para el tiempo de 28 días, con un promedio de 6.83, lo cual puede indicar que fue una etapa con mayor degradación del diesel, aunque en la prueba de rango múltiple, este decremento no es significativo ya que ésta señala que el grupo a los 56 días con un pH promedio de 7.06 es el estadísticamente diferente. Los datos más bien pueden reflejar la heterogeneidad del suelo.

b. Fósforo

El fósforo es un elemento indispensable para el desarrollo de las plantas, por lo que su variación se determinó en el estudio. Debido a la alcalinidad del suelo industrial, fue necesario aplicar el Método Olsen para cuantificar los fosfatos, ya que en pH mayores a 7, los fosfatos no se encuentran en forma soluble. Este método extrae todas las formas de fósforo asimilable aunque se encuentran atrapadas en ciertas estructuras, que podrían ser utilizadas a largo plazo. Los resultados de la cuantificación del fósforo se presentan en la Tabla III.10.

Tabla III.10 Concentraciones de fósforo (mg/kg) en el suelo industrial donde se cultivaron la alfalfa y el rabanito

Concentración de diesel (mg/kg)	Tiempo (días)			
	0	28	56	84
Alfalfa				
1247 (Control)	65.88	91.85	100.57	80.68
20000	147.02	68.58	106.69	58.41
35000	125.79	113.26	85.88	124.03
50000	46.08	59.48	94.08	161.88
70000	47.69	81.29	72.33	91.64
Rabanito				
1247 (Control)	82.69	90.73	109.80	
20000	157.01	108.20	66.09	
35000	42.19	161.60	80.91	
50000	58.98	47.97	157.21	
70000				
Testigo sin planta				
1247 (Control)	98.81	93.51	103.32	89.17
20000	164.36	96.53	72.75	64.94
35000	129.12	106.45	62.41	132.66
50000	56.29	82.00	103.20	158.36
70000	47.98	88.50	91.21	64.14

Las concentraciones de fósforo en el suelo fueron altas en todos los casos, corresponden a un suelo muy rico (Tabla III.2). Sin embargo, debido al método de cuantificación, estas concentraciones de fósforo incluyen a las formas insolubles que no son asimilables por las plantas y que pueden ser empleadas a largo plazo. Aunque las concentraciones de fósforo mostraron heterogeneidad y se encuentran en un intervalo entre 42.19 y 164.36 mg/kg, el ANOVA multifactorial (Anexo VIII) indica que el factor concentración de diesel afectó significativamente a la concentración de fósforo, pero no hay relación con el tiempo, ni con la especie plantada. La prueba de rango múltiple indica que los tratamientos con concentraciones de diesel de 50000 y 70000 mg/kg tienen valores promedio de fósforo menores (76.77 y 67.88 mg/kg) respecto a los tratamientos con menor concentración de diesel que tienen más de 90 mg/kg de fósforo.

En general la concentración de fósforo presenta una tendencia a disminuir al aumentar la concentración de diesel; esto puede deberse a que la incorporación de fósforo orgánico ocurre mediante la mineralización de compuestos fosfatados como nucleoproteínas, proteínas y ácidos nucleicos, proceso que catabolizan diversos microorganismos del suelo (Fassebender, 1987); por lo tanto, una concentración alta de diesel afecta a los microorganismos causándoles la muerte o una disminución en sus funciones metabólicas y una disminución en la tasa de fijación del fósforo.

En el caso del suelo agrícola, el método de cuantificación de fósforo fue el Bray-1, ya que corresponde a suelos neutros con un pH entre 5 y 7. Este es el método convencional ya que los fosfatos se encuentran en forma soluble en el suelo. Los resultados se presentan en la siguiente Tabla III.11.

Tabla III.11 Concentración de fósforo (mg/kg) en el suelo agrícola donde fueron cultivados alfalfa y el rabanito

Concentración de diesel (mg/kg)	Tiempo (días)			
	0	28	56	84
Alfalfa				
0	27.91	37.53	48.37	21.55
20000	37.87	33.44	57.03	33.11
50000	22.17	51.35	39.00	43.31
Rabanito				
0	30.87	24.90	36.58	
20000	34.46	42.33	49.09	
50000	10.49	20.09	27.37	
Testigo sin planta				
0	27.69	38.61	45.12	24.87
20000	34.13	50.06	49.55	32.80
50000	26.66	34.64	34.84	45.42

En general las concentraciones son menores a las correspondientes al suelo industrial cuantificadas por el método Olsen; la diferencia es que estos valores son de fósforo asimilable ya que el pH del suelo es neutro, y no adicionan formas asimilables a largo plazo como en el método de Olsen. En general, los valores son mayores a 12.5 mg/kg, por lo que se le considera suelo extremadamente rico en fósforo (Tabla III.2); la única concentración promedio baja fue de 10.49 mg/kg, lo cual corresponde a un suelo rico en fósforo. Lo anterior demuestra que no hubo limitación del crecimiento por escasez de fósforo.

Al realizarse el ANOVA multifactorial, se obtuvo que los tres factores analizados (especie, concentración de diesel y tiempo) afectaron de manera significativa a la concentración de fósforo (Anexo VIII). Según la prueba de rango múltiple, en el factor especie se observa que los valores de fósforo para el suelo donde se sembró el rabanito, muestran ser menores significativamente (30.68 mg/kg) pero no es posible explicarse excepto por la heterogeneidad del suelo. En el caso del factor concentración de diesel no ocurre lo mismo que en el suelo industrial, en este suelo se observa un aumento de la concentración de fósforo respecto al aumento de la concentración de diesel, esto es algo no esperado, puesto que se esperaría una inhibición de los microorganismos, no una fijación de fósforo. Esto parece más bien producto de la heterogeneidad del suelo.

En el caso del factor tiempo, se observa que el fósforo tiene una tendencia a aumentar conforme pasa el tiempo, probablemente existió fijación del fósforo a lo largo del experimento, ya que en todos los datos se observa este comportamiento.

c. Nitrógeno total

Se realizó la cuantificación del nitrógeno total al suelo industrial únicamente y debido a que el pH no altera la capacidad de asimilación de éste por las plantas, se empleó el método Dumas que incluye la concentración de nitritos, nitratos y nitrógeno amoniacal. Los resultados se presentan en la Tabla III.12.

Tabla III.12 Concentración de nitrógeno total (mg/kg) en el suelo industrial, donde fueron cultivados la alfalfa y el rabanito

Concentración de diesel (mg/kg)	Tiempo (días)			
	0	28	56	84
Alfalfa				
1247 (Control)	1714.7	1659.9	992.5	1338.0
20000	1457.1	1480.0	921.7	857.1
35000	1464.1	1638.4	1163.1	1652.2
50000	1446.8	1709.9	1313.2	1848.5
70000	1648.1	896.6	885.9	1144.0
Rabanito				
1247 (Control)	1627.7	4254.2	953.0	
20000	1515.2	3268.4	1047.8	
35000	1639.6	4419.4	1052.2	
50000	1388.0	1685.5	1001.5	
70000	1170.4	1145.3	927.3	
Testigo sin planta				
1247 (Control)	1587.9	2507.1	777.3	1625.0
20000	1460.4	5876.0	1267.6	1000.0
35000	1516.6	1268.5	763.8	1718.3
50000	1494.6	1239.5	856.9	1533.3
70000	1431.6	908.0	832.8	1362.3

Las concentraciones de nitrógeno total se encuentran en un intervalo amplio de 763.8 a 5876 mg/kg, lo cual corresponde a suelo de regulares a extremadamente ricos en nitrógeno (Tabla III.2). Sin embargo, el predominio la mayoría de los valores se encuentra por arriba de los 1000 mg/kg de nitrógeno lo cual corresponde a suelo medianamente ricos.

Al realizar el ANOVA multifactorial (Anexo IX), se observa que los factores concentración del contaminante y tiempo del experimento, afectaron significativamente la concentración de nitrógeno total.

La concentración de diesel, tiene influencia sobre la concentración de nitrógeno en el suelo. De la prueba de rango múltiple se observó que los valores promedio de nitrógeno, disminuyen a medida que la concentración de diesel aumenta. Esto probablemente se debe a la disminución de la tasa de fijación de nitrógeno que ocasiona la presencia de diesel sobre los microorganismos del suelo, ya que algunos hidrocarburos del diesel actúan disolviendo la membrana lipídica de las células (McGill and Cole, 1981); también ocasiona daños sobre las raíces por la falta de oxígeno y de humedad (De Jong, 1980). Al existir un aumento en el contenido de bacterias degradadoras, podría existir una competencia de recursos con las bacterias nitrificantes; por lo tanto, la cantidad de bacterias nitrificantes se puede ver afectada y haber una disminución del nitrógeno en el suelo, ya que la planta consume más nitrógeno del que es fijado. La concentración de 70000 mg/kg fue la más baja, siendo significativamente diferente del resto con un valor promedio de 1016.38 mg/kg (Anexo IX), en los demás tratamientos se puede observar la disminución gradual de los valores de nitrógeno provocado por la concentración de diesel. Aunque la concentración más alta nitrógeno total (2103.39 mg/kg) se encontró a una concentración de diesel de 20000mg/kg, lo cual puede deberse a heterogeneidad del suelo y no a la concentración del contaminante.

En el caso del factor tiempo en la prueba de rango múltiple (Anexo IX), se observa que la concentración promedio de las réplicas a los 28 días, donde hubo un aumento significativo, los demás concentraciones promedios en los otros tiempos mostraron cierta homogeneidad estadística. Posiblemente este alto valor promedio a los 28 días (2263.76 mg/kg) corresponda a un aumento de la tasa de fijación del nitrógeno y poco consumo de éste por parte de la planta, ya que algunas plantas no se encontraban suficientemente establecidas. Sin embargo, existen datos sumamente elevados (Tabla III.12) que seguramente se indican una heterogeneidad de la muestra tomada.

La concentraciones de nitrógeno promedio de todas las muestras tomadas a los 56 fueron notoriamente menores (983.77 mg/kg); lo anterior podría explicarse probablemente a un mayor consumo de nitrógeno por la planta, la inmovilización de compuestos nitrogenados por los microorganismos del suelo, o bien que al ser convertidos por los microorganismos a productos volátiles, éstos se pierden por difusión en la atmósfera. Sin embargo, el aumento de estos valores para el día 84 en el caso del control y la alfalfa, muestran que estas variaciones se deban a heterogeneidad del suelo o de la muestra.

d. Diesel Residual

Aunque el objetivo del estudio no fue promover la degradación del diesel, ésta se podría dar de manera natural debido a los microorganismos asociados a las raíces de las plantas, por ello se consideró conveniente cuantificar el diesel residual.

Las concentraciones de diesel residual correspondientes al suelo industrial se presentan en la Tabla III.13, además del porcentaje de degradación o disminución alcanzado al final del experimento. En el caso de los signos negativos que se presentan en algunos valores de degradación, indican que se encontró una mayor concentración de diesel al final del experimento que los valores iniciales.

Tabla III.13 Concentraciones de diesel residual y porcentaje de degradación en suelo industrial donde fueron cultivados la alfalfa y el rabanito

	Tiempo (días)				% Degradación ($T_o - T_{final}$)
	0	28	56	84	
Concentración de diesel (mg/kg)					
Alfalfa					
1247 (Control)	1255.5	5389.5	198.7	935.5	25.5
20000	5825.6	9347.0	13388.6	7826.8	-34.4
35000	25604.4	29158.8	15764.1	19173.0	25.1
50000	28962.2	37748.5	44853.5	16383.7	43.4
70000	90975.7	68780.4	149961.7	29932.4	67.1
Rabanito					
1247 (Control)	1530.4	1147.7	553.8		63.8
20000	11204.6	8599.7	8109.3		27.6
35000	24720.0	22726.1	20774.6		15.9
50000	38082.4	41539.3	22257.4		41.6
70000	79920.2	40125.3	36943.4		53.8
Testigo sin planta					
1247 (Control)	1234.7	1182.7	878.2	1119.1	9.4
20000	7405.7	10152.7	12863.7	7766.7	-4.9
35000	21318.4	25688.6	7010.8	31745.1	-48.9
50000	46542.7	38783.2	38883.9	18187.8	60.9
70000	72568.0	63694.2	48081.1	34607.6	52.3

De los resultados obtenidos se puede observar en general, que los valores son muy heterogéneos y que en muchos casos no corresponden a los valores teóricos calculados para la contaminación del suelo. Lo anterior se puede explicar por una incompleta homogeneización del diesel en el suelo al momento de preparar cada unidad experimental, la cual por haberse hecho manualmente es posible que hayan dado zonas con mayor o menor acumulación de diesel.

Al realizar el ANOVA multifactorial (Anexo X) se obtuvo que el único factor que afectó significativamente a la concentración de diesel residual, fue la cantidad adicionada de diesel añadida, lo cual era de esperarse; sin embargo, los valores promedio de la prueba de rango múltiple son menores a las concentraciones teóricas, lo cual es explicable ya que la prueba promedia los valores de todos los tiempos y los valores presentaron una gran heterogeneidad.

De los factores especie y tiempo, el ANOVA no concluye que las concentraciones se vean afectados por estos mismos; sin embargo, a partir de los resultados obtenidos es posible hacer algunas observaciones. Se observó que el rabanito presentó disminución de diesel residual en todos los tiempos y concentraciones, a diferencia de la alfalfa que aunque también presentó tendencia a la disminución, hay una mayor heterogeneidad en los resultados. En el caso del testigo sin planta también se observó heterogeneidad..

E. FACTORES AMBIENTALES DEL EXPERIMENTO

a. Humedad del suelo

La humedad total del suelo se mantuvo alrededor de 30% con una variación entre las unidades de $\pm 10\%$ aproximadamente. En temporada de verano el riego se realizó hasta dos veces al día dependiendo de la evaporación que se presentaba durante el día, mientras que en temporada de otoño se hizo diariamente. Lo que se buscaba era mantener húmedo el suelo, para no afectar el crecimiento de las plantas.

b. Temperatura ambiental

La temperatura se midió para determinar si la variación podría afectar al crecimiento de las plantas. Se realizaron tres mediciones a lo largo del día, además de obtenerse la máxima y la mínima, con estas se obtuvo la temperatura media que existió durante el experimento. Puesto que la siembra de las semillas en el suelo industrial se llevó a cabo en diferente temporada que para el suelo agrícola se presentan los dos gráficos por separado (Figuras III.9 y III.10).

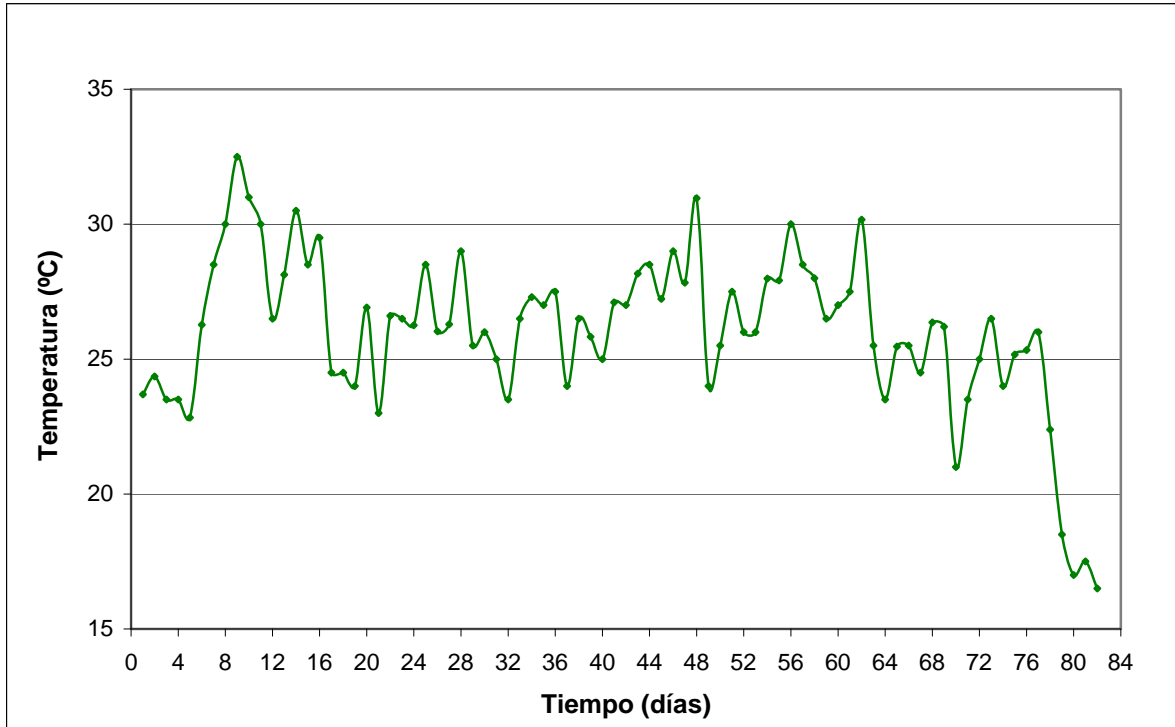


Fig. III.9 Variación de la temperatura media en el experimento para el suelo industrial

La temperatura media del suelo industrial se encontró entre 17°C y 31°C; sin embargo, las temperaturas máximas llegaron a ser tan altas que se encontraron entre 31°C y 45°C. Aunque estas condiciones de alta temperatura sólo existieron en algunos minutos de la tarde, entre las 14 y 15 horas, son temperaturas no favorables para el cultivo de las plantas. En el caso de las temperaturas mínimas, se observó que no existieron temperaturas muy bajas (9°C a 14°C), puesto que la temporada en la que se realizó este experimento correspondió al verano; sólo los últimos días del experimento se encontraron temperaturas mínimas de 0°C y 1°C, debido a la entrada del otoño.

En el caso del experimento con el suelo agrícola, fue realizado en la temporada de otoño, por lo que registró temperaturas menores (Figura III.18). En general la temperatura media se mantuvo entre 16°C y 29°C. La mínima se mantuvo entre 1°C y 13°C, y la máxima entre 26°C y 29°C. Aunque los valores son menores, éstos son favorables para el caso de la alfalfa, que su temperatura óptima de crecimiento es entre 28°C y 29°C. En cambio, el rabanito es más afectado por temperaturas altas, le favorecen temperaturas medias entre 15°C y 21°C; las cuales fueron menos rebasadas que en el experimento con el suelo industrial.

A pesar de lo anterior la temperatura no parece haber afectado fuertemente al crecimiento de las plantas tanto del suelo industrial como del suelo de siembra.

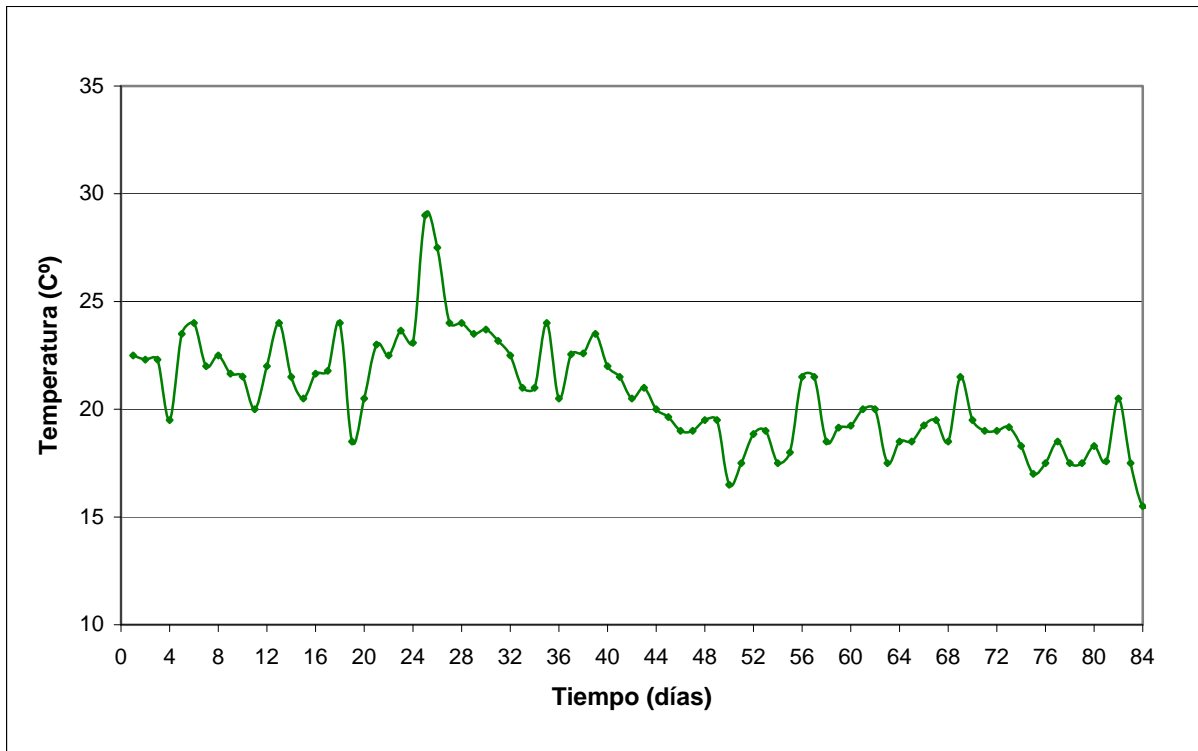


Fig. III.10 Variación de la temperatura media en el experimento para el suelo agrícola

IV. CONCLUSIONES

- La germinación de las semillas de rabanito (*Raphanus sativus*) y de alfalfa (*Medicago sativa*) se observó en todas las concentraciones de diesel (0 a 70000 mg/kg) en ambos suelos. Sin embargo, el rabanito mostró mayor resistencia que la alfalfa con un porcentaje de germinación mayor al 80% en el suelo industrial y mayor al 70% en el suelo agrícola. En el caso de la alfalfa resultó ser más sensible al presentar diferencias significativas a partir de la concentración de diesel de 20000 mg/kg.

- La concentración de diesel en el suelo afectó significativamente el crecimiento y desarrollo de ambas especies de plantas. La disminución fue significativa en los parámetros medidos desde la concentración de diesel de 20000 mg/kg para ambas especies; sin embargo, el rabanito presentó un decrecimiento más paulatino que la alfalfa al incrementarse la concentración de diesel en el suelo. El efecto del diesel en el desarrollo de frutos fue notorio en el rabanito, donde sólo se presentaron frutos en los controles sin contaminar.

- El suelo industrial aún con diesel residual y con pH básico, permitió un mayor crecimiento de las plantas que el suelo agrícola, posiblemente se debió a la textura más gruesa de éste suelo, la cual evitó una mayor absorción del diesel a los agregados del suelo.

- La presencia de diesel disminuyó significativamente el pH del suelo agrícola, así como concentraciones de fósforo y nitrógeno del suelo industrial. Posiblemente al afectar la tasa de fijación de estos elementos por parte de los microorganismos.

- En general se observó una disminución de la concentración del diesel al final del experimento; a pesar de que se reflejó cierta heterogeneidad en su distribución en el suelo. Esta disminución pudo darse posiblemente por transformación abiótica y biótica. Al observar los datos parece haber mayor degradación en los suelos con plantas respecto al control sin plantas; sin embargo, estadísticamente los factores tiempo, ni especie parecen haber afectado a la concentración de diesel en el suelo.
- El rabanito fue una planta más resistente al diesel que la alfalfa, al presentar mayor germinación y una disminución del crecimiento más paulatina que la alfalfa, conforme aumentó la concentración de diesel en el suelo.

V. RECOMENDACIONES

A partir de las observaciones realizadas, se plantean las siguientes recomendaciones:

- Emplear especies con duración de sus ciclos de vida similares, para poder comparar diferencias en su desarrollo y si concluyen o no su ciclo.
- Al realizar la adición del diesel al suelo es indispensable homogeneizar completamente con ayuda de algún equipo o aparato para mezclar, para disminuir el error de acumulación del contaminante en ciertas zonas. Además es recomendable dejar que el diesel se adsorba en el suelo unos días, evitando regar para que este no se lixivie.
- Si se tiene pensado comparar el crecimiento en dos suelos diferentes, realizar el crecimiento en la misma temporada, para que los factores ambientales no presenten diferencias.
- Se sugiere medir el área foliar en lugar del número de hojas, si se tiene pensado comparar el crecimiento de las plantas con las hojas, ya que en ciertos casos, como con el rabanito son tan escasas que no permiten una buena comparación y análisis.

REFERENCIAS

- Adam G. and Duncan H., 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*. 21:353-357
- Aguilera N., 1989. *Tratado de Edafología de México*. Tomo 1. Ciencias. UNAM. México
- Alexander M., 1990. *Introducción a la Microbiología del Suelo*. AGT. Editor. S.A. México. 491 pp.
- Alexander M., 1995. How Toxic are Toxic Chemicals in Soils? *Environ. Sci. Technol.* 29:2713-2717.
- Anderson, T., Guthrie E. and Walton B., 1993. Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27:2630-2636.
- Atlas R. and Bartha R., 1981. Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: An Environmental Perspective. *Microbiol. Rev.* 45:180-209.
- Atlas R. and Bartha R., 1993. *Microbial Ecology: Fundamentals and Applications*. Benjamin Cummings Publishing Co. Redwood City. 563 pp.
- Baker K. and Herson D., 1994. *Bioremediation*. McGraw-Hill. USA. 375 pp.
- Baver 1956., *Metodología de Análisis Físico-Químicos de Suelos*. Domínguez, I. y Aguilera, N. (eds.). UNAM
- Beyer N. and Greg L., 1995. Making Sense of Soil Ecotoxicology. *Handbook of Ecotoxicology*. Lewis Publishers. Boca Raton. 104 -116 pp.
- Blackburn, E., Shampay, J. and Szostak, J., 1984. The molecular structure of centromeres and telomeres. *Rev. Biochem.* 53, 163-194.
- Block R., Allworth N. and Bishop M., 1991. Assessment of diesel contamination in soil. In hydrocarbon contaminated soils. Volumen 1. *Remediation Techniques Environmental Fate. Risk Assessment Analytical Methodologies Regulatory Considerations*. E.J. Calabrese, (Eds.). Lewis Publishers. Michigan. USA.
- Bonetto J. and López S., 1999. Posibilidades de aplicación de la fitorremediación en la minería de Uranio. Grupo Agronómico. U.A. Aplicaciones tecnológica y agropecuarias. 1-7 pp.
- Bossert I. and Bartha R., 1984. The fate of petroleum in soil ecosystems. Atlas R.M. *Petroleum Microbiology* Macmillan Publishing Co. New York 473 pp.
- Bouwer E. and Zehnder A., 1993. Bioremediation of organic compounds- putting microbial metabolism to work. *Trends in Biotechnology*. Vol. 11:8. 360-367.
- Bouyoucos G., 1962. Hydrometer Improved Method for Making Particles Size Analysis of Soil. *Agron. J.* 54: 464-465.

- Bray R. and Kurtz L.,1945. Determination of Total Organic, and Available forms of Phosphorus in Soil. *Soils Science*.59:39-45.
- Carter M., 1993. *Soil Sampling and Methods of analysis*. Canadian Society of Soil Science. Lewis publishers, Boca Raton, USA.
- Cervantes D., 1999. Estudios de ecotoxicidad, biorremediación y fitorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos (diesel). *Ciencias*. UNAM. 54 pp.
- Connell W. and Miller. G., 1984. *Chemistry and Ecotoxicology of Pollution*. John Wiley and Sons. USA. 444 pp.
- DeJong E., 1986.The Effect of crude oil spill on cereals. *Environ. Pollut.* 22:187-196.
- Dineen D., 1992. Remediation options for diesel-contaminated soil. *Contaminated soils. Diesel Contamination*. E. j. Calabrese and P. T. Kosteki.. Association of American Ralilroads. Lewis Publishers. Michigan. USA. 191-191 pp.
- Domínguez A., 2001. Pruebas de biotratibilidad de un suelo contaminado con diesel mediante el uso de texturizantes orgánicos. *Ciencias*. UNAM. 88 pp.
- Duffus J.,1983, *Toxicología Ambiental*, Ed. Omega, Barcelona, 157 pp.
- Dumas A., 1826. *Annales de chimie*, 342 pp.
- Eisler R., 1987. Polycyclic aromatic hidrocarbon hazards to fix, wildlife and invertebrates: a synoptic review. *U.S. Fish Wild. Serv.Biol.Rep.* 85 (1-11).
- Environmental Protection Agency. 1996 a. *Ecological Effects Test Guidelines. Terrestrial Plant Toxicity Tier I (Vegetative Vigor)*. USA 1-6 pp.
- Environmental Protection Agency. 1996 b. *Ecological Effects Test Guidelines. Seed Germination/ Root Elongation Toxicity Test*. USA 1-6 pp.
- Fattah Q. and Wort D.,1970. Metabolic responses of bush bean plants to naphtenate. *Canadian Journal of Botany*, Vol. 48:5, 859-860
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO).1998. *World Reference Base for Soil Resources*.
- Foth D. and Turk M., 1981. *Fundamentos de la Ciencia del Suelo*. Cía. Editorial Continental. S.A. de C.V. México. 527 pp.
- Foth D.,1990. *Fundamentals of Soil Science*. John Wiley and Sons. USA. 360 pp.
- Food and Drug Administration. 1987. *Seed Germination and Root Elongation. Section 4.06. Environmental Assessment Technical Handbook*. US Departament of Health and Human Service. Food and Drug Aministration, Center of Food Safety and Applied Nutrition and center of veterinary Medicine. USA.

- Frankenberger Jr. W., 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. Kosteci (eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, USA.
- Gambaundo S., 2000. La Alfalfa. Producir XXI. 9. 16. España.
- Iannacone J. and Alvarino, 2005. Efecto ecotoxicológico de tres metales pesados sobre el crecimiento radicular de cuatro plantas. Agricultura Técnica. Vol. 65, No. 2. 198-203 pp.
- Iannacone J. and Gutiérrez A., 1999. Ecotoxicidad de los agroquímicos lindano y clorpirifos sobre el nemátodo *Panagreflus*, la microalga *Chlorella* y el ensayo con *Allium*. Agricultura Téc. (Chile).59, 85-95.
- International Agency for Research on Cancer (IARC). 2005. www.iarc.fr
- Klute A., 1986. Methods of soils analysis; physical and mineralogical methods. 2 Ed. USA.1188 pp.
- Jiménez B., 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. Limusa. México. 926 pp.
- Lewis M., 1995. Use of freshwater plants for phytotoxicity testing; a review. Environ. Pollut. 87(3):319-336.
- Li X., Feng Y. and Sawatsky N., 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils. Plant and Soil. 192:219-226.
- Margesin R. and Schinner F., 1997. Bioremediation of diesel-oil-contaminated alpine soils at low temperatures. Applied Microbiological Biotechnology. 47: 462-468.
- Martínez V. and López F., 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. Terra 19: 9-17.
- Mc Gill W. and Cole C.,1981. Comparative aspects of cycling of organic C, N, S and P through soil organic matter. Geoderma 26, 267-286 pp.
- Millner G., James R. and Nye A., 1992. Human health-based soil cleanup guidelines for diesel fuel no.2. Soil Contam. 1:103-157
- Munsell. 1954. Metodología de Análisis Físico-Químicos de Suelos. Domínguez, I. y Aguilera, N. (eds.). UNAM.
- NOM-AA-16-1984. "Contaminación del suelo-Residuos Sólidos Municipales. Determinación de humedad -"
- Organization for Economic Cooperation and Development. 2003. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 208 Terrestrial Plants, Seedling Emergence and Seedling Growth Test. 1-19 pp.

- Paez B., 2000. Aplicación de bioensayos de toxicidad aguada para evaluación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis de Licenciatura. UNAM. Facultad de Ciencias. 6 – 27 pp.
- Paul E. and Clark F., 1996. Soil microbiology and biochemistry. Academic Press. 2a Ed. San Diego. USA. 339 pp.
- Pelczar M., Reid R. and Chan E., 1982. Microbiología. 2a Edición. McGraw- Hill. México.
- Pepper I., Gerba C. and Brusseau M., 1996. Pollution Science. Academic Press. Canada. 397 pp.
- Petróleos Mexicanos, 2006. www.pemex.com
- Porta J., López-Acevedo M., Roquero de Laburu. C. 1999. Edafología. Para la agricultura y el medio ambiente. Mundi-Prensa. 2ª Edición. Madrid.
- Quiñones-Aguilar E., Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F., Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez y Alarcón A., 2003. Emergencia y crecimiento en maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37:585-594.
- Safferman S., 1998. Fundamentals of bioremediation/ Tratability. In: Bioremediation: Principles and Practice Vol. I. Fundamentals and Applications. S. Sikdar and Irvine (eds). Technomic Publishing CO. Inc. 765 pp.
- Salanitro J., Dorn P., Hueseman M., Moore K., Rodees I., Rive L., Vipond T., Western M., and Wisniewski H., 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Sci. Technol.* 31. 1764-1776.
- Sims R., 1990. Soil Remediation Techniques at Uncontrolled Hazardous Waste Sites. *J. Air Waste Management Association* 40(5) 704-732 pp.
- Slaga, T., Fischer, S., Nelson, K and Gleason, G., 1980. Studies on the mechanism of skin tumor promotion: Evidence for several stages in promotion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77 (6): 3659-3663.
- Statgraphics™ Centurion para Windows, 2006.
- Stevenson F., 1966. Lipids in soils. *Journal of the American Oil Chemists Society. Chemistry and Materials Science.* Berlin. 43(4). 203-210 pp.
- Stone Jr. W., 1991. Assessing Health Risks Associated with Diesel Contaminated Soils and Groundwater. In *Hydrocarbons Contaminated Soils.* (ed. E. Calabrese y P. Kosteci). Lewis Publishers. 167-179 pp.
- Tarbuck E. and Lutgens, F., 2000, *Ciencias de la Tierra: una introducción a la geología física.* Ed. Prentice Hall, Madrid.

- Tavera G. 1985. Criterios para la interpretación y aprovechamiento de los reportes de laboratorio para las áreas de asistencia técnicas. Publicación 3. Sociedad Mexicana de la Ciencia del Suelo. Delegación de la Laguna. Matamoros. Coahuila. 258 pp.
- Thompson L. and Troeh F., 1982. Los suelos y su fertilidad. Ed. Reverté España.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA), 1996. Method 8015, Nonhalogenated Organics using GC/FID (Segunda revisión)
- Vázquez A. and Bautista A., 1993. Guía para la interpretación de análisis químico de suelo y agua. Depto. Suelos. Universidad Autónoma Chapingo. México.
- Verhoef A. and Van Gestel. 1995. Methods to Assess the Effects of chemicals on Ecosystems. Methods to Assess the Effects of chemicals on Soils. In: Linthurst, A. R., Bourdeau P. and R. G. Tardiff (eds.). SCOPE. John Wiley and Sons. USA. 223-257 pp.
- Walkley and Black. 1947. Norma Oficial Mexicana Proy-Nom-021-Recnat-2000. Que establece las especificaciones de Fertilidad, Salinidad y clasificación de suelos. Estudios, Muestras y Análisis. Diario Oficial de la Federación.
- Wang X. and Bartha R., 1994. Effects of Bioremediation on Toxicity. Mutagenesis and Microbiota in Hydrocarbon-Polluted Soils. Remediation of Hazardous Waste Contaminated soils. Marcel Dekker. USA. 175-198 pp.
- Weissenfels W., Klewer H. and Langhoff J., 1992. Adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by soil particles: Influence on biodegradability and biotoxicity. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36:689-696.
- Whittaker C., Anderson M. and Reitemeier R., 1959. Liming Soils an Aid to Better Farming. USDA. Farmers. Bull. 2124.
- Wiltse C., Rooney W., Chen Z., Schwab A. and Banks M., 1998. Greenhouse Evaluation of Agronomic and Crude Oil-Phytoremediation Potential among Alfalfa Genotypes. Journal of Environmental Quality. 27:169-173.

ANEXO

I. RESULTADOS DE LA SELECCIÓN INICIAL DE ESPECIES MEDIANTE PORCENTAJE DE GERMINACIÓN

Especies de plantas	Porcentaje de germinación (%)	
	0 mg/kg	20000 mg/kg
Alfalfa	88 ± 1.25	52 ± 3.30
Alpiste	84± 2.87	46 ± 5.66
Cilantro	1± 0.82	47 ± 1.89
Girasol	0± 0.00	-
Jitomate	92± 1.63	89 ± 0.82
Pápalo	9± 3.77	11± 3.56
Pasto	81± 8.50	45 ± 8.64
Rabanito	96± 1.89	87 ± 4.32
Tomate	9 ±0.5	-
Trébol	62± 5.44	49 ± 2.16
Trigo	46± 10.08	39 ± 5.89
Frijol	83± 0.47	72 ± 0.47

II. ANÁLISIS DE VARIANZA EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS

Rabanito (*Raphanus sativus*)

ANOVA % Germinación del rabanito en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	264.933	4	48.1672	1.4	0.3027
Dentro de tratamientos	556.667	10	34.4208		
Total (corregido)	821.6	14			

ANOVA % Germinación del rabanito en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	484.332	2	242.166	3.75	0.0877
Dentro de tratamientos	387.281	6	64.5468		
Total (corregido)	871.613	8			

Alfalfa (*Medicago sativa*)

ANOVA % Germinación de la alfalfa en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	1270.86	4	317.714	7.29	0.0051
Dentro de tratamientos	435.685	10	43.5685		
Total (corregido)	1706.54	14			

ANOVA % Germinación de la alfalfa en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	736.982	2	368.491	42.98	0.0003
Dentro de tratamientos	51.439	6	8.57317		
Total (corregido)	788.421	8			

III. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA ALTURA DEL TALLO DE LAS PLANTAS

Rabanito (*Raphanus sativus*)

ANOVA Altura del tallo de rabanito en el suelo industrial

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	28.7567	4	7.18918	14.35	0.0001
Dentro de tratamientos	7.51318	15	0.500878		
Total (corregido)	36.2699	19			

ANOVA Altura del tallo de rabanito en el suelo agrícola

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	103.691	2	51.8457	1016.1	0.0000
Dentro de tratamientos	0.306133	6	0.0510222		
Total (corregido)	103.998	8			

Alfalfa (*Medicago sativa*)**ANOVA Altura del tallo de la Alfalfa en el suelo agrícola**

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	370.453	2	185.227	40.80	0.0003
Dentro de tratamientos	27.2397	6	4.53996		
Total (corregido)	397.693	8			

IV. ANÁLISIS DE VARIANZA DEL LARGO DE RAIZ DE LAS PLANTAS**Rabanito (*Raphanus sativus*)****ANOVA Largo de raíz del rabanito en el suelo industrial**

Fuente de variación	Suma de Cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	43.0934	4	10.7734	10.03	0.0004
Dentro de tratamientos	16.1088	15	1.07392		
Total (corregido)	59.2022	19			

ANOVA Largo de raíz del rabanito en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	90.974	2	45.487	86.40	0.0000
Dentro de tratamientos	3.15867	6	0.526444		
Total (corregido)	94.1326	8			

Alfalfa (*Medicago sativa*)**ANOVA Largo de raíz de la alfalfa en el suelo industrial**

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	125.011	4	31.2527	16.74	0.0000
Dentro de tratamientos	28.0075	15	1.86717		
Total (corregido)	153.018	19			

ANOVA Largo de raíz de la alfalfa en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	340.574	2	170.287	82.19	0.0000
Dentro de tratamientos	12.4315	6	2.07191		
Total (corregido)	353.006	8			

V. ANÁLISIS DE VARIANZA DE LA BIOMASA (PESO SECO EN mg) DE LAS PLANTAS

Rabanito (*Raphanus sativus*)

ANOVA Biomasa del rabanito en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	2053.07	4	513.266	6.80	0.0025
Dentro de tratamientos	1131.75	15	75.4499		
Total (corregido)	3184.81	19			

ANOVA Biomasa del rabanito en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	65052.7	2	32526.3	88.18	0.0000
Dentro de tratamientos	2213.25	6	368.874		
Total (corregido)	67265.9	8			

Alfalfa (*Medicago sativa*)

ANOVA Biomasa de la alfalfa en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	1245.3	4	311.324	6.88	0.0024
Dentro de tratamientos	678.564	15	45.2376		
Total (corregido)	1923.86	19			

ANOVA Biomasa de la alfalfa en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	225476.	2	112738.	10.58	0.0108
Dentro de tratamientos	63948.7	6	10658.1		
Total (corregido)	289425.	8			

VI. ANÁLISIS DE VARIANZA DE NÚMERO DE HOJAS DE LAS PLANTAS

Rabanito (*Raphanus sativus*)

ANOVA Número de hojas del rabanito en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	5.3	4	1.325	2.09	0.1326
Dentro de tratamientos	9.5	15	0.6333		
Total (corregido)	14.8	19			

ANOVA Número de hojas del rabanito en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	20.2083	2	10.1042	4.50	0.0762
Dentro de tratamientos	11.2267	5	2.2453		
Total (corregido)	31.435	7			

Alfalfa (*Medicago sativa*)

ANOVA Número de hojas de alfalfa en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	39.5	4	9.875	10.39	0.0003
Dentro de tratamientos	14.25	15	0.95		
Total (corregido)	53.75	19			

ANOVA Número de hojas de alfalfa en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado Medio	F- calc.	Nivel de significancia
Entre tratamientos	728.0	2	364.0	273.00	0.0000
Dentro de tratamientos	8.0	6	1.33333		
Total (corregido)	736.0	8			

ANÁLISIS DE VARIANZA Y PRUEBA DE RANGO MÚLTIPLE DE LOS PARÁMETROS DE LOS SUELOS

VII. pH

ANOVA pH en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
Efectos principales					
Concentración	0.405709	4	0.101427	1.66	0.1669
Especie	0.808533	2	0.404266	6.63	0.0022
Tiempo	1.67913	2	0.839563	13.76	0.0000
RESIDUAL	4.88115	80	0.0610144		
TOTAL	7.85371	88			

Prueba de Rango Múltiple para pH en el suelo industrial

Parámetros	Replicas	Promedio	Grupos homogéneos
Especie			
Alfalfa	30	9.01	a
Rabanito	30	9.04	a
Control	29	8.83	b
Tiempo			
0	29	9.07	a
28	29	8.76	b
56	31	9.05	a

ANOVA pH en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
EFFECTOS PRINCIPALES:					
Concentración	1.20416	2	0.602079	11.65	0.0000
Especie	0.264254	2	0.132127	2.56	0.0845
Tiempo	0.762714	2	0.381357	7.38	0.0012
RESIDUAL	3.82535	74	0.0516939		
TOTAL	6.05648	80			

Prueba de rango múltiple para pH en el suelo agrícola

Parámetros	Réplicas	Promedio	Grupos homogéneos
Concentración			
0	27	7.01	a
20000	27	7.03	a
50000	27	6.76	b
Tiempo			
0	27	6.91	b
28	27	6.83	b
56	27	7.06	a

VIII. FÓSFORO

ANOVA para fósforo en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
EFFECTOS PRINCIPALES:					
Concentración	19875.1	4	4968.76	3.18	0.0176
Tiempo	1062.16	3	354.054	0.23	0.8775
Especie	1142.9	2	571.45	0.37	0.6946
RESIDUAL	126425.	81	1560.8		
TOTAL	150537.	90			

Prueba de rango múltiple para fósforo en el suelo industrial

Parámetros	Réplicas	Promedio	Grupos homogéneos
Concentración			
1247	17	90.1152	abc
20000	17	108.369	a
35000	19	100.241	ab
50000	18	76.777	bc
70000	20	67.884	c

ANOVA para fósforo en el suelo agrícola

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
EFFECTOS PRINCIPALES:					
Especie	2474.81	2	1237.4	17.32	0.0000
Concentración	1175.71	2	587.853	8.23	0.0006
Tiempo	3062.78	2	1531.39	21.44	0.0000
RESIDUAL	5286.06	74	71.4333		
TOTAL	11999.4	80			

Prueba de rango múltiple para fósforo en el suelo agrícola

Parámetros	Replicas	Promedio	Grupos homogéneos
Especie			
Rabanito	27	30.6867	b
Control	27	37.923	a
Alfalfa	27	39.408	a
Concentración			
0	27	29.6241	c
20000	27	35.2874	b
50000	27	43.1063	a
Tiempo			
0	27	28.028	c
28	27	36.995	b
56	27	42.993	a

IX. NITRÓGENO TOTAL

ANOVA para nitrógeno total en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
EFFECTOS PRINCIPALES:					
Concentración	1.13163E7	4	2.82908E6	3.74	0.0083
Especie	3.76846E6	2	1.88423E6	2.49	0.0904
Tiempo	1.83788E7	2	9.18939E6	12.16	0.0000
RESIDUAL	4.98824E7	66	755794.		
TOTAL	8.3346E7	74			

Prueba de Rango Múltiple para nitrógeno total en el suelo industrial

Parámetros	Replicas	Promedio	Grupos homogéneos
Concentración			
1247	15	1841.67	ab
20000	15	2103.39	a
35000	15	1671.43	ab
50000	15	1286.65	bc
70000	15	1016.38	c
Tiempo			
0	30	1504.18	b
28	30	2263.76	a
56	15	983.77	b

X. DIESEL RESIDUAL

ANOVA para diesel residual en el suelo industrial

Fuente de variación	Suma de cuadrados	G.I.	Cuadrado medio	F- calc.	Significancia
EFFECTOS PRINCIPALES:					
Concentración	2.82438E10	4	7.06095E9	27.85	0.0000
Tiempo	9.846E7	2	4.923E7	0.19	0.8244
Especie	1.04764E9	2	5.23821E8	2.07	0.1415
RESIDUAL	9.12872E9	36	2.53576E8		
TOTAL	3.85186E10	44			

Prueba de Rango Múltiple de diesel residual en el suelo industrial

Parámetros	Réplicas	Promedio	Grupos homogéneos
Concentración			
1247	9	1485.69	d
20000	9	9655.21	cd
35000	9	21418.4	c
50000	9	37517.0	b
70000	9	72338.9	a

Nota:

Todas los ANOVAS se realizaron con un nivel de confianza de 95%