

UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO
División Académica de Ciencias Biológicas
(DACBioI)

Evaluación de la capacidad fitorremediadora de hidrocarburos en un sistema modelo por *Cyperus ligularis*

TESIS

Que para obtener el grado de:
Maestro en Ciencias Ambientales

PRESENTA:

Ing. Amb. Sara Pérez Montero

DIRECTORA

Dra. Erika Escalante Espinosa



Villahermosa, Tab., a 12 de Diciembre de 2012.



Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

La Maestría en Ciencias Ambientales de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco esta incluida en el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT.





UNIVERSIDAD JUÁREZ AUTÓNOMA DE TABASCO

"ESTUDIO EN LA DUDA. ACCIÓN EN LA FE"



DIVISION ACADÉMICA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

NOVIEMBRE 22 DE 2012

C. SARA PEREZ MONTERO
PAS. DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS AMBIENTALES
P R E S E N T E

En virtud de haber cumplido con lo establecido en los Arts. 80 al 85 del Cap. III del Reglamento de titulación de esta Universidad, tengo a bien comunicarle que se le autoriza la impresión de su Trabajo Recepcional, en la Modalidad de Tesis de Maestría en Ciencias Ambientales titulado: **"EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMIADORA DE HIDROCARBUROS EN UN SISTEMA MODELO POR *Cyperus ligularis*"**, asesorado por la Dr. Erika Escalante Espinosa, sobre el cual sustentará su Examen de Grado, cuyo jurado está integrado por la Dra. Violeta Ruiz Carrera, Dr. Jori Zavala Cruz, Dr. Erika Escalante Espinosa, Dr. José Roberto Hernández y Dr. Ildefonso Díaz Ramírez.

Por lo cual puede proceder a concluir con los trámites finales para fijar la fecha de examen.

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
ESTUDIO EN LA DUDA, ACCIÓN EN LA FE

M. EN C. ROSA MARTHA PADRON LOPEZ
DIRECTORA

U. J. A. T.
DIVISION ACADÉMICAS
DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



C.c.p.- Expediente del Alumno.
C.c.p.- Archivo





CARTA AUTORIZACIÓN

El que suscribe, autoriza por medio del presente escrito a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco para que utilice tanto física como digitalmente el Trabajo Recepcional en la modalidad de Tesis de Maestría denominado: **“EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD FITORREMIADORA DE HIDROCARBUROS EN UN SISTEMA MODELO POR *Cyperus ligularis*”**, de la cual soy autor y titular de los Derechos de Autor.

La finalidad del uso por parte de la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco el Trabajo Recepcional antes mencionada, será única y exclusivamente para difusión, educación y sin fines de lucro; autorización que se hace de manera enunciativa más no limitativa para subirla a la Red Abierta de Bibliotecas Digitales (RABID) y a cualquier otra red académica con las que la Universidad tenga relación institucional.

Por lo antes manifestado, libero a la Universidad Juárez Autónoma de Tabasco de cualquier reclamación legal que pudiera ejercer respecto al uso y manipulación de la tesis mencionada y para los fines estipulados en éste documento.

Se firma la presente autorización en la ciudad de Villahermosa, Tabasco el día Veintidós de Noviembre del año 2012.

AUTORIZO

SARA PEREZ MONTERO



Evaluación de la capacidad fitorremediadora de hidrocarburos en un sistema modelo por *Cyperus ligularis*

INFORME DE ORIGINALIDAD

17%

ÍNDICE DE SIMILITUD

FUENTES PRIMARIAS

1	revistas.ujat.mx Internet	366 palabras — 2%
2	colposdigital.colpos.mx:8080 Internet	338 palabras — 2%
3	www.researchgate.net Internet	198 palabras — 1%
4	(5-25-15) http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI10493.pdf Internet	165 palabras — 1%
5	pesquisa.bvsalud.org Internet	139 palabras — 1%
6	archivos.ujat.mx Internet	118 palabras — 1%
7	www.scielo.org.ar Internet	112 palabras — 1%
8	core.ac.uk Internet	103 palabras — < 1%
9	uaeh.redalyc.org Internet	82 palabras — < 1%
10	hdl.handle.net Internet	

		77 palabras — < 1%
11	1library.co Internet	76 palabras — < 1%
12	oa.upm.es Internet	73 palabras — < 1%
13	www.publicaciones.ujat.mx Internet	69 palabras — < 1%
14	bibliotecavirtual.unl.edu.ar 8080 Internet	63 palabras — < 1%
15	www.redalyc.org Internet	59 palabras — < 1%
16	www.scielo.org.mx Internet	58 palabras — < 1%
17	repositorio.uni.edu.pe Internet	54 palabras — < 1%
18	etheses.whiterose.ac.uk Internet	53 palabras — < 1%
19	www.colpos.mx Internet	53 palabras — < 1%
20	ribuni.uni.edu.ni Internet	49 palabras — < 1%
21	www.usb.edu.mx Internet	49 palabras — < 1%
22	doi.org Internet	48 palabras — < 1%

23	pt.scribd.com Internet	47 palabras — < 1%
24	link.springer.com Internet	44 palabras — < 1%
25	revistaciencias.univalle.edu.co Internet	44 palabras — < 1%
26	worldwidescience.org Internet	39 palabras — < 1%
27	Escalante-Espinosa, E.. "Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by <i>Cyperus laxus</i> Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system", <i>Chemosphere</i> , 200504 Crossref	38 palabras — < 1%
28	ejournals.swu.ac.th Internet	38 palabras — < 1%
29	es.wikipedia.org Internet	38 palabras — < 1%
30	ria.utn.edu.ar Internet	38 palabras — < 1%
31	www.medigraphic.com Internet	38 palabras — < 1%
32	issuu.com Internet	37 palabras — < 1%
33	monografias.umcc.cu Internet	37 palabras — < 1%
34	cybertesis.uach.cl Internet	34 palabras — < 1%

35	R. H. Adams, D. Olán-Castro, F. J. Guzmán-Osorio, I. J. Diaz-Ramírez. "Relationship between geomorphology and contamination with weathered hydrocarbons in an old river levee/marsh association", International Journal of Environmental Science & Technology, 2009 Crossref	33 palabras — < 1%
36	iosrjournals.org Internet	31 palabras — < 1%
37	www.tdx.cat Internet	31 palabras — < 1%
38	www.ijcce.ac.ir Internet	30 palabras — < 1%
39	acikbilim.yok.gov.tr Internet	27 palabras — < 1%
40	docplayer.es Internet	26 palabras — < 1%
41	inis.iaea.org Internet	26 palabras — < 1%
42	journal.abu.edu.ng Internet	26 palabras — < 1%
43	www.plantarchives.org Internet	26 palabras — < 1%
44	dokumen.pub Internet	24 palabras — < 1%
45	quimicahoy.uanl.mx Internet	24 palabras — < 1%
46	repositorio.unu.edu.pe	

Internet

24 palabras — < 1%

47 www.scielo.br
Internet

24 palabras — < 1%

48 cdn.www.gob.pe
Internet

23 palabras — < 1%

49 riaa.uaem.mx
Internet

23 palabras — < 1%

50 doczz.es
Internet

22 palabras — < 1%

51 pdffox.com
Internet

21 palabras — < 1%

52 repository.unad.edu.co
Internet

21 palabras — < 1%

53 repositorioinstitucional.uaslp.mx
Internet

20 palabras — < 1%

54 scholar.archive.org
Internet

20 palabras — < 1%

55 www.fao.org
Internet

20 palabras — < 1%

56 www.intechopen.com
Internet

20 palabras — < 1%

57 vdoc.pub
Internet

19 palabras — < 1%

58 www.minem.gob.pe
Internet

19 palabras — < 1%

59	datospdf.com Internet	18 palabras — < 1%
60	www.archive.org Internet	18 palabras — < 1%
61	es.slideshare.net Internet	17 palabras — < 1%
62	repositorioinstitucional.buap.mx Internet	17 palabras — < 1%
63	Henderson, Keri L., Jason B. Belden, and Joel R. Coats. "Mass Balance of Metolachlor in a Grassed Phytoremediation System", Environmental Science & Technology, 2007. Crossref	16 palabras — < 1%
64	I. Lenoir, A. Lounes-Hadj Sahraoui, J. Fontaine. "Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: a review", European Journal of Soil Science, 2016 Crossref	16 palabras — < 1%
65	bindani.izt.uam.mx Internet	16 palabras — < 1%
66	repository.its.ac.id Internet	16 palabras — < 1%
67	sinat.semarnat.gob.mx Internet	16 palabras — < 1%
68	www.ajol.info Internet	16 palabras — < 1%
69	www.universidadpersonal.net Internet	16 palabras — < 1%

EXCLUIR CITAS

ACTIVADO

EXCLUIR FUENTES

DESACTIVADO

EXCLUIR BIBLIOGRAFÍA

ACTIVADO

EXCLUIR COINCIDENCIAS < 16 PALABRAS

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.



Agradecimiento

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento brindado para mi desarrollo personal y el de esta investigación.

A la Dra. Erika Escalante Espinosa Directora de esta Tesis, por la confianza depositada en mi persona y valiosa colaboración en el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Violeta Ruiz Carrera, Dr. Joel Zavala Cruz, Dr. Ildefonso Díaz Ramírez, Dr. José Roberto Barajas Hernández distinguidos sinodales quienes con su apoyo y comentarios permitieron el progreso de esta investigación.

Al M. en C. Ulises López Noverola por el apoyo en la realización de la estancia en el Laboratorio de suelos de la División Académica de Ciencias Agropecuarias (DACA-UJAT).

A mis compañeros del Laboratorio de Bioprocesos por el incondicional apoyo prestado durante la realización de este proyecto. “Gracias a todos”.





Dedicatoria

A Dios por su infinita bondad y amor. Por pertenecer a una grandiosa familia, por haberme dado salud y por ayudarme a culminar una meta más en mi vida.

A mi familia por estar siempre conmigo, guiarme, apoyarme a pesar de las circunstancias.

A mis abuelitos † que siempre los recuerdo y llevo en mi corazón.

RESUMEN





En el presente trabajo se evaluó la capacidad fitorremediadora de hidrocarburos en suelo por *Cyperus ligularis* planta nativa que crece en suelos contaminados con hidrocarburos ubicado en el sureste de México. Se realizó una cinética de fitorremediación con *C. ligularis* en un sistema modelo (agrolita contaminada con hidrocarburos extraídos de suelo intemperizado a una concentración de 27,000 mg de HTP kg⁻¹ de agrolita seca) en condiciones de invernadero. La fitorremediación de hidrocarburos se determinó durante 90 días de cultivo, considerando la adición de un inóculo, aislado de la rizósfera de *C. laxus*, consorcio microbiano compuesto de 7 cepas bacterianas y 2 cepas fúngicas. En la cinética de fitorremediación en el sistema modelo, la adición del inóculo no mejoró el crecimiento de *C. ligularis*, observándose el efecto de la inoculación en la radicular. La remoción de hidrocarburos las plantas inoculadas presentaron los valores más altos a los primeros 15 días (0.47 mg de HTP removidos g⁻¹ de agrolita seca d⁻¹), obteniendo valores para las plantas inoculadas y no inoculadas de 34 y 55%, respectivamente, a los 90 días de cultivo. En cuanto a la remoción de las fracciones de hidrocarburos, la presencia de la planta removió con eficiencia las fracciones alifáticas y aromáticas en el periodo de la cinética. En relación a la sorción de hidrocarburos en la raíces las plantas inoculadas mostraron extracto café a los 30 días de cultivo, lo que indica presencia de hidrocarburos, en comparación con las plantas no inoculadas, las cuales presentan extracto café a los 45 días. Para los microorganismos, las mayores poblaciones de cuenta total y número de degradadores de hidrocarburos se presentaron en presencia de planta beneficiando el máximo valor de la tasa de remoción. La presente investigación demostró que *Cyperus ligularis* y la asociación de microorganismo en su rizósfera tiene la capacidad de fitorremediar hidrocarburos en un sistema model





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

ABSTRACT





In the present study evaluated the ability to phyto-remediating of hydrocarbons in soil by *Cyperus ligularis* plant native that grows in soils contaminated with hydrocarbons located in the Southeast of Mexico. Carried out a kinetics of phyto-remediation with *C. ligularis* in a model system (perlite spiked with hydrocarbons extracted from soil weathered at a concentration of 27,000 mg of HTP kg⁻¹ of dry perlite) under greenhouse conditions phyto-remediation of hydrocarbon was determined during 90 days of culture, considering the addition of an inoculum, isolated from the rhizosphere of *C. laxus*. A microbial consortium consisting of 7 bacterial strains and 2 fungal strains was used as inoculum. In the kinetics of phyto-remediation in the model system, the addition of the inoculum did not improved the growth of *C. ligularis*, showing the effect of inoculation in the root. Removal of hydrocarbons from inoculated plants showed higher values within 15 days (0.47 mg of HTP removed g⁻¹ of dry perlite d⁻¹), obtaining values for inoculated and not-inoculated plants by 34 and 55%, respectively, at 90 days of culture. As for the removal of fractions of hydrocarbons, the presence of the plant removed efficiently aliphatic and aromatic fractions during culture. Regards to hydrocarbons sorption by roots, inoculated plants showed brown extracts at 30 days of culture, indicating hydrocarbons presence, compared with non-inoculated plants which presented brown extracts at 45 days. For microorganisms, the largest populations of total viable count and hydrocarbon degraders were presented in the presence of plant benefiting the maximum removal rate. The research showed that *Cyperus ligularis* and the association of microorganism in its rhizosphere has the ability phyto-remediate hydrocarbon in a model system.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

TABLA DE CONTENIDO





Agradecimiento	4
Dedicatoria	6
RESUMEN	6
ABSTRACT	8
TABLA DE CONTENIDO	10
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	13
1. INTRODUCCIÓN	14
2. REVISIÓN DE LITERATURA	17
2.1. Contaminación del suelo con hidrocarburos	18
2.2. El petróleo y sus hidrocarburos	19
2.3. Destino de los hidrocarburos en el suelo	21
2.4. Biorremediación	22
2.5. Fitorremediación	23
2.5.1. Mecanismos de fitorremediación	24
2.5.2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación	25
2.6. Fitorremediación de hidrocarburos	26
2.7. Rizósfera	28
2.8. Microorganismos degradadores de hidrocarburos como inoculantes	29
2.9. Destino de los contaminantes orgánicos en las plantas	31
3. ANTECEDENTES	35
4. JUSTIFICACIÓN	41
5. HIPÓTESIS	43
6. OBJETIVOS	45
6.1. OBJETIVO GENERAL	46
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
7. MATERIAL Y MÉTODOS	47
7.1. Diseño experimental	49
7.2. Germinación de semillas y crecimiento de <i>Cyperus ligularis</i>	49
7.3. Preparación del sistema modelo	50





7.4.	Microorganismos	50
7.5.	Preparación de los inóculos	51
7.5.1.	Inóculo bacteriano	51
7.5.2.	Inóculo fúngico	51
7.6.	Cinética de fitorremediación en el sistema modelo	52
7.7.	Procedimiento de muestreo	53
7.8.	Métodos analíticos	54
7.8.1.	Medición del crecimiento de <i>C. ligularis</i>	54
7.8.1.1.	Tasa de crecimiento aérea y radicular	54
7.8.1.2.	Biomasa seca aérea y radicular	54
7.9.	Análisis microbiológicos	55
7.9.1.	Cuantificación de microorganismos rizosféricos	55
7.9.2.	Microorganismos degradadores de hidrocarburos (Número Más Probable)	56
7.10.	Análisis de hidrocarburos	57
7.10.1.	Extracción y cuantificación de hidrocarburos residuales	57
8.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	62
8.1.	Crecimiento de la planta durante la fitorremediación	63
8.1.1.	Biomasa seca	63
8.1.2.	Tasa de crecimiento	64
8.2.	Remoción de hidrocarburos	66
8.2.1.	Hidrocarburos residuales	66
8.2.2.	Tasa de remoción de hidrocarburos	69
8.2.3.	Remoción de las fracciones de hidrocarburos	71
8.2.4.	Sorción de hidrocarburos en raíces	74
8.3.	Microorganismos rizosféricos	75
9.	CONCLUSIONES	82
10.	ANEXOS	84
11.	LITERATURA CITADA	95





ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia experimental	48
Figura 2. Germinación y crecimiento de semillas <i>C. ligularis</i> en condiciones invernadero	50
Figura 3. Montaje de las unidades experimentales en condiciones invernadero	52
Figura 4. Aplicación del inóculo al inicio del experimento	53
Figura 5. Equipo soxhlet utilizado para la extracción de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP).	58
Figura 6. Precipitación de los asfaltenos para su cuantificación.	59
Figura 7. Método de separación de hidrocarburos por cromatografía en columna	59
Figura 8. Biomasa seca aérea (a) y biomasa seca radicular (b) durante la fitorremediación (■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).	64
Figura 9. Tasa de crecimiento aérea (a) y tasa de crecimiento radicular (b) durante la fitorremediación (■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).	65
Figura 10. Concentración de hidrocarburos residuales en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (---▲--- control; -◆- control con inóculo; -■- plantas no inoculadas; -●- plantas inoculadas).	67
Figura 11. Tasa de remoción de hidrocarburos en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (---▲--- control; -◆- control con inóculo; -■- plantas no inoculadas; -●- plantas inoculadas).	70
Figura 12. % remoción de las diferentes fracciones de hidrocarburos durante la cinética de fitorremediación a los 15 y 90 días de cultivo. T0: concentración inicial; TI: control; TII: control con inóculo; TIII: plantas no inoculadas; TIV: plantas inoculadas.	73
Figura 13. Extractos de raíces de <i>C. ligularis</i> durante la cinética de fitorremediación para plantas inoculadas (a) y no inoculadas (b).	75
Figura 14. Cuentas total de microorganismos (UFC g ⁻¹ de agrolita seca): Bacterias (a) y hongos (b) en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (■ control; ■ control con inóculo; ■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).	77
Figura 15. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (degradadores g ⁻¹ de agrolita seca) en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (■ control; ■ control con inóculo; ■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estructuras químicas de las diferentes fracciones de hidrocarburos.	20
Tabla 2. Tipos de procesos de fitorremediación.	25
Tabla 3. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.	26
Tabla 4. Solventes de separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos.	60





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

1. INTRODUCCIÓN





La contaminación con compuestos orgánicos en suelos y sedimentos es un problema ambiental importante por la gran cantidad de sitios contaminados (Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles, 2004). La contaminación por hidrocarburos en suelo y agua ha aumentado en los últimos años como resultado de la explotación, refinación, distribución y almacenamiento del petróleo y sus derivados. En México, el derrame accidental de hidrocarburos conduce a una contaminación constante de tierras de cultivo (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007). Algunos suelos agrícolas muestran alteraciones en sus propiedades físicas, químicas y biológicas causadas por estos contaminantes (Sangabriel *et al.*, 2006).

Como alternativa de limpieza de los suelos contaminados se ha recurrido a la utilización de elementos biológicos que contribuyen a la oxidación, degradación, transformación y mineralización completa de estos contaminantes (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). En la aplicación de estas tecnologías, es necesario tomar en cuenta elementos como el diagnóstico preciso del tipo de contaminante, la dimensión de la contaminación en suelo y mantos freáticos así como el futuro uso del lugar contaminado. Con estos elementos es posible evaluar las técnicas de remediación considerando las ventajas y desventajas de las mismas. Entre estas técnicas, la fitorremediación ocupa un lugar importante porque es una tecnología emergente basada en la acción combinada de plantas (terrestres o acuáticas) con comunidades microbianas nativas (López-Martínez *et al.*, 2005). La tolerancia vegetal a los contaminantes en el suelo evidencian la factibilidad de utilizar las plantas en tecnologías de remediación (Rivera-Cruz *et al.*, 2006). Muchas especies vegetales pueden ser empleadas para tratar una gran cantidad de contaminantes tales como hidrocarburos de petróleo, metales pesados y compuestos radioactivos, entre otros. Para aplicar la fitorremediación, las especies se seleccionan teniendo en cuenta la tolerancia al contaminante, el potencial de evapotranspiración, las enzimas degradadoras que pueden producir, la tasa de crecimiento, el tipo de crecimiento radicular y la capacidad para bioacumular y/o degradar los contaminantes, además de otros factores como puede ser la biodisponibilidad de los contaminantes debido a la sorción por las partículas del suelo y la adecuada actividad microbiana. La fitorremediación está adquiriendo reconocimiento como método





ambientalmente correcto, económico y estético de remediación de sitios contaminados (Larenas-Parada y De Viana, 2005).

En el sureste del Golfo de México, se encuentra un gran número de sitios con diferentes niveles de impacto ambiental llevado a cabo por lo menos en los últimos 100 años (Adams-Schroeder *et al.*, 2009; Adams-Schroeder *et al.*, 1999). Durante la mayor parte del tiempo, hubo muy poco esfuerzo para preservar el medio ambiente y los desechos de la industria fueron objeto de vertederos irresponsables cercanos a los ríos, canales, humedales y pantanos. Además, gran parte de la infraestructura en la región es muy antigua, especialmente las tuberías están sujetas a fugas y derrames crónicos. Durante los últimos 20 años, esta situación ha ido cambiando. Hoy en día, existe una mayor preocupación en la industria para evitar la contaminación del medio ambiente y restaurar las zonas que se han deteriorado (Adams-Schroeder *et al.*, 2009). Para la remediación de estas zonas contaminadas con hidrocarburos, en este trabajo se ha propuesto el estudio de la capacidad fitorremediadora de una planta nativa *Cyperus ligularis*, la cual sobrevive y desarrolla en estos sitios lo que la hace una candidata para la remediación de suelos contaminados en combinación con los microorganismos para la transformación de los compuestos a través de la inoculación considerando su ventaja primordial de aportar funciones metabólicas al aumentar la velocidad y el grado de biodegradación de los contaminantes.

En los apartados (4, 5 y 6) se muestra la justificación, hipótesis y objetivos de este trabajo. Los materiales y métodos se detallan en el apartado 7. En las últimas partes se presentan los resultados y discusión obtenidos durante la cinética de fitorremediación donde se analizó el efecto de la adición de un consorcio microbiano sobre las características fenológicas de *C. ligularis*, la remoción de los hidrocarburos, los microorganismos rizosféricos y la sorción de hidrocarburos en las raíces y se muestran las conclusiones generales en las diferentes etapas de este estudio.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

2. REVISIÓN DE LITERATURA





2.1. Contaminación del suelo con hidrocarburos

Un suelo contaminado es aquel al que se le encuentran presentes hidrocarburos o materiales extraños que por sus cantidades y características afectan la naturaleza del suelo (López-Ortiz, 2011; Piña-Maldonado, 2012). Existen dos tipos de contaminación : 1) *involuntaria*, que ocurre por defectos mecánicos, la corrosión de las tuberías y las fugas durante las etapas de transferencia y la contaminación y 2) *voluntaria*, que se ocurre con las prácticas de incineración y los vertidos en suelo y agua. La contaminación del suelo existe principalmente concentrada en los alrededores de las refinerías, pozos de petróleo, depósitos de petróleo, aeropuertos, bases militares y estaciones gasolineras (Braibant-Wayens, 2004). En México existen varias áreas contaminadas con hidrocarburos del petróleo como consecuencia de las actividades de extracción, refinamiento y transporte, además de los derrames accidentales. Los sitios más afectados se localizan esencialmente en el sudoeste de la república, al sur de Veracruz y en el norte de Tabasco (García-Rivero, 2003).

La contaminación del suelo con hidrocarburos impide la utilización de éste para actividades como la agricultura y la urbanización y adicionalmente pone en riesgo los mantos freáticos que en algunos países constituyen la fuente principal de agua potable. De aquí la importancia primordial de remediar estos suelos (Braibant-Wayens, 2004). Cuando se realiza un estudio de evaluación o de caracterización de un sitio contaminado con hidrocarburos, se determinan diversos parámetros físicos y químicos y si no se ha afectado de alguna forma, se considera aceptable. Sin embargo, el valor real de la concentración puede estar modificado de acuerdo con el tiempo, tipo y cantidad de hidrocarburos que se haya derramado sobre un suelo específico así como a sus propiedades. Un factor determinante en los posibles efectos por hidrocarburos, es la textura del suelo, es decir, por la presencia proporcional de partículas como arenas, limos o arcillas (Martínez y López, 2001).





Las propiedades físicas del suelo son afectadas por la presencia de hidrocarburos: al aglutinarse las partículas del suelo se generan estructuras más gruesas que cubren la superficie de las partículas y el espacio poroso y afectan la aireación del suelo. La película que cubre las partículas es hidrófoba y disminuye la retención de agua. Por otro lado, el contenido de materia orgánica del suelo se incrementa notablemente, así como la acidificación, la saturación de bases y la capacidad de intercambio catiónico. Todos estos factores acarrearán una disminución de la fertilidad del suelo (Pérez *et al.*, 2002).

2.2. El petróleo y sus hidrocarburos

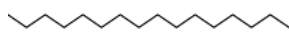

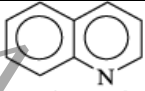
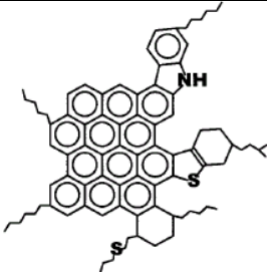
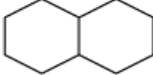
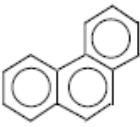
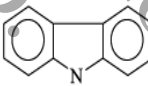
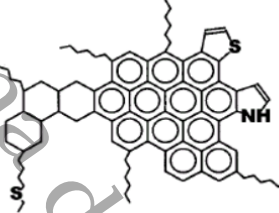



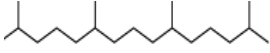
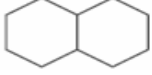
El petróleo es un combustible natural compuesto de varios tipos de hidrocarburos, es decir, de moléculas que contienen básicamente carbono e hidrógeno. Estas moléculas pueden estar formadas de cadenas de átomos de carbono largas o cortas y que pueden adoptar diferentes estructuras. El número de carbonos y su estructura química determina su clasificación (Olguín *et al.*, 2007). La composición química de los hidrocarburos es muy variable, en la naturaleza normalmente se encuentran como mezclas de diferentes especies moleculares, que en mayor o menor grado afectan a la flora, a la fauna y a los microorganismos del suelo (Fontúrbel, 2004). Todos los productos de petróleo se derivan del petróleo crudo cuyos mayores componentes son los hidrocarburos. Los componentes del petróleo está constituido por distintas fracciones de hidrocarburos (Acuña *et al.*, 2010): alifáticos (con 18 a 35 átomos de carbono llamados parafinas), aromáticos (con uno ó mas anillos como benceno, naftaleno y fenantreno), y los hidrocarburos polares, es decir asfaltenos altamente condensados y resinas (agregados de piridina, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y amidas) (Alemán-Caporal, 2009); en la Tabla 1 se muestran algunas de las estructuras químicas de las diferentes fracciones de hidrocarburos. Los saturados son hidrocarburos que no contienen doble ligadura. Por su estructura química se clasifican en alcanos y cicloalcanos. Los alcanos tienen cadenas de carbonos ramificados o sin ramificar llamados normales (Alemán-Caporal, 2009), y tienen la fórmula general C_nH_{2n+2} . Los





cicloalcanos tienen uno ó más anillos de átomos de carbono y su fórmula general C_nH_{2n} . La mayoría de cicloalcanos en el petróleo crudo tienen un sustituyente *alquilo*. Los aromáticos tienen uno ó más anillos aromáticos con ó sin sustituyente *alquilo*. En contraste con las fracciones saturadas y aromáticas, tanto las fracciones de resina y asfaltenos contienen compuestos polares. Sus compuestos contienen, además del carbono e hidrógeno, cantidades traza de nitrógeno, oxígeno y/o azufre. Estos compuestos forman a menudo complejos con metales pesados. Los asfaltenos consisten de compuestos de alto peso molecular que no son solubles en solventes tales como *n-heptano* ó *n-hexano*, mientras las resinas son moléculas polares solubles en *n-heptano* ó *n-hexano*. Las resinas contienen compuestos heterocíclicos, ácidos y sulfóxidos (Acuña *et al.*, 2010).

Tabla 1. Estructuras químicas de las diferentes fracciones de hidrocarburos.

Alifáticos	Aromáticos	Resinas	Asfaltenos
 n-alcenos	 Difenilo	 Quinolinas	
 Cicloparafinas	 Fenantreno	 Carbazoles	
 Pristano	 Benceno	 Piridinas	
 Isoprenoides	 Decahidronaftaleno		

Fuente: Delgado, 2006; Torres-Delgado y Zuluaga-Montoya, 2009.





2.3. Destino de los hidrocarburos en el suelo

El destino de los contaminantes en la matriz del suelo depende de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. La habilidad del contaminante para interactuar en el medio ambiente determina la persistencia mientras los procesos bióticos, tales como la biodegradación, determina el potencial de biorremediación. El destino de los contaminantes en la subsuperficie está determinado principalmente por los procesos de transporte de masa (advección, difusión y dispersión) y procesos de transferencia de masa (disolución, hidrólisis, sorción, volatilización y procesos biológicos). En algunos casos, la transferencia de masa puede incluir reacciones de oxidación-reducción (redox), reacciones ácido-base, complejación, precipitación y decaimiento radiactivo (Karthikeyan y Kulakow, 2003). En el suelo, la sorción de contaminantes constituye una forma de inmovilización que disminuye la toxicidad pero aumenta su longevidad y permanencia en este compartimiento ambiental. La sorción en los suelos es definida como la interacción de un compuesto en solución con un sólido donde se incluye la adsorción (retención en la superficie) y absorción (retención dentro de la superficie) que restringe su movilidad y disponibilidad para los organismos (Díaz *et al.*, 2010).

El destino de los hidrocarburos de petróleo en el ambiente depende en gran medida de factores abióticos e incluso de la misma biodegradación del petróleo. Estos factores a su vez, también influyen en la tasa de crecimiento microbiano y la actividad enzimática afecta la tasa de biodegradación de los hidrocarburos (Atlas, 1981). El desplazamiento de la contaminación en el suelo, contrariamente al que ocurre en el agua, se produce de manera vertical hasta alcanzar los mantos freáticos provocando con ello serios problemas de degradación de los recursos naturales (Braibant-Wayens, 2004). El destino de hidrocarburos acumulados en cualquier suelo contaminado depende de varios factores como las características químicas de los hidrocarburos, las propiedades del suelo, la magnitud de los procesos bióticos y abióticos que promueven su eliminación del sitio contaminado y las interacciones complejas que ocurren entre ellos (Ruberto *et al.*, 2008).





Por otra parte, en suelos contaminados por largos períodos (suelos intemperizados), los compuestos contaminantes llegan a ser inaccesibles (no biodisponibles) para los microorganismos nativos debido a las fuertes interacciones (puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals) que se producen entre dichos contaminantes y la materia orgánica del suelo (Volke-Sepúlveda y Velasco-Trejo, 2003). Los hidrocarburos intemperizados son más recalcitrantes a medida que transcurre el tiempo (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2010). El intemperismo es el conjunto de los cambios físicos y químicos que sufre el petróleo derramado por efecto de las condiciones ambientales (Ramírez-May, 2012). Esos cambios se refieren a cambios biológicos y no biológicos, que pueden ocurrir al mismo tiempo, estos procesos reducen las concentraciones de los constituyentes individuales de los hidrocarburos, produciendo cambios significativos, en la composición. Debido a las características fisicoquímicas de los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP), estos prevalecen como parte de los hidrocarburos residuales, su presencia crea un riesgo a la salud pública y al ambiente, por lo que es necesario llevar a cabo acciones de remediación que reduzcan los niveles de concentración de los tóxicos, dentro de valores normativamente aceptables o que minimicen su exposición al ambiente (Montes de Oca-García, 2001).

2.4. Biorremediación

El principio de la biorremediación está basado en el empleo de poblaciones microbianas que poseen la capacidad de modificar o descomponer ciertos contaminantes (Santos *et al.*, 2011). Sin embargo, se puede llevar años para completar la restauración y recuperación de las áreas impactadas, dependiendo entre otros factores, la cantidad de contaminante y condiciones ambientales que favorecen la proliferación y actividad de los organismos que se utilicen (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). La remoción de hidrocarburos del suelo puede realizarse usando tratamientos biológicos como la biorremediación si las condiciones ambientales son óptimas (temperatura, humedad del suelo, nutrientes) (Chaîneau *et al.*, 2003). Es importante estudiar qué poblaciones existen en el suelo contaminado ya que éstas probablemente ya se habrán adaptado a este ambiente. Las poblaciones nativas pueden ser





sensibles a la presencia y a la actividad de poblaciones extranjeras especializadas. Estas poblaciones, pueden producir algunos metabolitos e intermediarios tóxicos para la microflora nativa. Muchas veces también, estas poblaciones agregadas no se adaptan a las condiciones del sitio contaminado y debido a ello, no realizan la descontaminación con la misma eficiencia con la que lo hacen las poblaciones nativas (Braibant-Wayens, 2004). En el medio ambiente y especialmente en sitios contaminados con petróleo, es posible aislar microorganismos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos mono y polinucleares, o bien, hidrocarburos alifáticos como los *n*-alcanos. Numerosas bacterias son capaces de crecer sobre alcanos gaseosos y líquidos; pero existen muy pocos reportes acerca de la capacidad para degradar *n*-alcanos sólidos (parafinas) con cadena mayor a C18 (Salgado-Brito *et al.*, 2008). Las tecnologías de biorremediación de suelos pueden ser aplicadas en estrategias *ex situ* e *in situ*. *Ex situ* es un método donde se excava el suelo o el material a tratar y se le maneja en un sistema controlado como una celda de biolabranza o algún tipo de biorreactor. *In situ* requiere de un menor costo. Esta tecnología incluyen el bioventeo, bioaumentación, bioestimulación, biolabranza, atenuación natural y fitorremediación (López de Mesa *et al.*, 2006).

2.5. Fitorremediación

Los últimos años del siglo XX surgieron tecnologías basadas en el uso de organismos vivos para descontaminar suelos o lugares contaminados y recuperar los ecosistemas afectados (Vidal-Fernández, 2012). La fitorremediación de suelos con petróleo se ha convertido en una tecnología alternativa, en virtud de su bajo costo y porque reduce el riesgo para la salud humana y el ecosistema (Basumatary *et al.*, 2012; Purwanti *et al.*, 2012). La fitorremediación, consiste en el uso de plantas para remover contaminantes en suelo y aguas, y tienen diversas clasificaciones con base en la actividad fisiológica de las plantas en presencia de los contaminantes (Díaz-Martínez, 2012), por medio de la acción combinada de microorganismos con capacidad fisiológica y bioquímica para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a formas menos tóxicas (Villegas-Velázquez, 2011; Onwuka *et al.*, 2012). Esta tecnología consiste en el uso de plantas





verdes que aceleran la eliminación de hidrocarburos en el suelo por procesos de volatilización y degradación rizosférica con la participación de microorganismos estimulados por los exudados de las raíces (Zavala-Cruz *et al.*, 2005). La fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos se basa principalmente en la biodegradación llevada a cabo en la rizósfera por lo que el sistema radicular de la planta es un elemento importante (Sangabriel *et al.*, 2006).

En la fitorremediación, la degradación ocurre en la rizósfera así como dentro de la propia planta (Arthur *et al.*, 2005). Las plantas poseen diferentes mecanismos fisiológicos para mejorar los procesos de remediación (Alarcón *et al.*, 2006). El principal mecanismo de fitorremediación utilizado en esta investigación es la rizodegradación, es un mecanismo indirecto, se refiere a la transformación de contaminantes en la rizósfera, puede ocurrir por los microorganismos del suelo tales como hongos o bacterias, ó por medio de enzimas exudadas por los microorganismos ó la planta (Arthur *et al.*, 2005). Según Abhilash y Singh, (2010) en estudios previos se ha demostrado que la rizodegradación es el mecanismo dominante en la remoción de contaminantes orgánicos como fenantreno, diesel, mezcla de hidrocarburos alifáticos y HAP, benzo(a)pireno por especies de plantas adecuadas. La especie en estudio fue seleccionada debido a que se ha probado su capacidad de sobrevivir y desarrollarse en áreas contaminadas por petróleo, pero no se conoce su capacidad de fitorremediación.

2.5.1. Mecanismos de fitorremediación

Las diferentes fitotecnologías hacen uso de las diversas propiedades de la planta y típicamente se usan diferentes especies de plantas para cada una (Pilon-Smits, 2005). Los mecanismos y eficiencia de la fitorremediación dependen del tipo de contaminante, la diversidad microbiana y propiedades del suelo. En la Tabla 2 se muestran los tipos de procesos utilizados en la fitorremediación. Existen diferentes clasificaciones con base en la actividad fisiológica de las plantas al enfrentar los contaminantes.





Tabla 2. Tipos de procesos de fitorremediación.

Proceso	Descripción
<i>Fitoextracción</i>	Eliminación de contaminantes por las raíces de las plantas, seguida de la translocación de tejidos de la planta sobre el suelo, que posteriormente son cosechadas. Esta tecnología es aplicada a menudo en suelo o agua contaminado con metales.
<i>Rizofiltración</i>	Utiliza las raíces de las plantas para filtrar los contaminantes directamente un flujo con residuos, ya sea en cultivos hidropónicos o en instalación de humedales construidos.
<i>Fitoestabilización</i>	Inmovilización de un contaminante por absorción y acumulación por raíces, adsorción en las raíces, o precipitación dentro de la zona de la raíz.
<i>Fitodegradación</i>	La planta, junto con enzimas y cofactores de éstas, degradan y/o transforman el contaminante. Entre las enzimas más conocidas en fitorremediación destacan; deshalogenasas, peroxidasas, monoxigenasas, nitroreductasas, nitrilasas y fosfatasas.
<i>Control hidráulico</i>	Uso de plantas por la rápida captación de grandes volúmenes de agua para contener o controlar la migración de aguas subterráneas.
<i>Rizodegradación</i>	Transformación del contaminante en el suelo a través de la actividad microbiana que es mejorado por la presencia de rizósfera.
<i>Fitovolatilización</i>	Depende de la captación de contaminantes por las raíces de la planta, seguido por su liberación como productos químicos volátiles, bien por la raíz o retoño.

Fuente: U. S. EPA, 2001; Pilon-Smits y Freeman, 2006.

2.5.2. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

La fitorremediación tiene ventajas pero también limitaciones. En la Tabla 3 se muestran algunas de éstas.



**Tabla 3.** Ventajas y desventajas de la fitorremediación.

Ventajas	Desventajas/limitaciones
Buena imagen, alta aceptación pública, ya que es estéticamente agradable	Existe poca experiencia práctica
Aplicación <i>In situ/Ex situ</i>	Restringido a sitios con concentraciones bajas de contaminante
Puede ser combinado con otros métodos	No aplicable para todos los compuestos
Es aplicable a ambientes con concentraciones de contaminantes de bajas a moderadas	Se requieren áreas relativamente grandes.
Tiene una versatilidad potencial para tratar una gama diversa de materiales peligrosos	No todas las plantas son tolerantes o acumuladoras
Es de bajo costo, no requiere personal especializado para su manejo ni consumo de energía	La introducción de especies no nativas pueden afectar la biodiversidad biológica
Modifica una variedad de compuestos orgánicos e inorgánicos	Proceso lento comparado con otras tecnologías
Es una tecnología sustentable	El crecimiento de la vegetación puede estar limitado por extrema toxicidad ambiental.

Fuente: Núñez-López *et al.*, 2004; Vidal-Fernández, 2012.

2.6. Fitorremediación de hidrocarburos

Varias plantas han sido identificadas por su potencial para facilitar la fitorremediación de sitios contaminados con hidrocarburos del petróleo (Ndimele, 2010). Debido a su naturaleza sésil, las plantas desarrollan la capacidad de resistir una amplia gama de agresiones del medio ambiente (Jing *et al.*, 2008).

Especie

Recientemente se ha incrementado el interés de utilizar plantas para remediar sitios contaminados con hidrocarburos pero es necesario evaluar cuáles son las especies más adecuadas. La capacidad para fitorremediar presenta diferencias marcadas ya que la capacidad de una planta para estimular la degradación de contaminantes en la rizósfera





depende en gran medida de la especie vegetal, la edad y el vigor de la raíz (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003). Las plantas que restauran suelos contaminados son denominadas especies fitorremediadoras (Rivera-Cruz *et al.*, 2006). A continuación se describe la especie utilizada en este estudio.

Cyperus ligularis

Cyperus ligularis pertenece a la familia Cyperaceae es la tercer familia más numerosa de monocotiledóneas. Posee 98 géneros y más de 4,000 especies. Los géneros más representados son *Carex* (2,000 especies, especialmente diverso), *Cyperus* (600 especies), *Fimbristylis* (300 especies), *Scirpus* (300 especies), *Rhynchospora* (200 especies), *Scleria* (200 especies), y *Eleocharis* (200 especies) (Gómez-Laurito, 2009). Las Cyperaceae son la segunda familia más grande en el número de especies con estrategia fotosintética del tipo C₄, lo que les permite incrementar su tasa de asimilación de CO₂ en condiciones ambientales de alta incidencia lumínica (Rodrigues *et al.*, 2003; Martins y Alves, 2009). Las Cyperaceae, Poaceae e Hydrocharitaceae son las únicas familias con especies C₄ entre las monocotiledóneas (Martins y Alves, 2009; Giraldo-Ocaña, 2010; Raghavendra y Sage, 2011). Las plantas del género *Cyperus* acompañan a los cultivos que han evolucionado en sitios contaminados y cuya adaptación está dirigida hacia la supervivencia en situaciones en donde imperan factores limitantes y alta perturbación (Rivera-Cruz *et al.*, 2004a). La especie *Cyperus ligularis* presenta anatomía Kranz, la presencia de aire en cavidades bien desarrolladas en esta planta refleja una adaptación a zonas inundadas, ayudando a la acumulación de O₂ y CO₂ lo que facilita la aireación (Martins y Alves, 2009), esta especie pueden habitar a orilla de los ríos en un ambiente dulceacuícola, con vegetación acuática y subacuática, en zonas húmedas de vegetación halófila costera, halófilas de marismas y cultivos (Diego-Pérez, 1997). La forma biológica es herbácea y la de vida es enraizada emergente de abundancia regular. Se encuentra asociada con la siguiente vegetación *Polygonum*, *Conyza*, *Ludwigia F* y se distribuye a una elevación mínima de 0 a 150 m (UNIBIO, 2008). Son hierbas perennes, hermafroditas, monoicas; rizomatosas, cespitosas o





solitarias, robustas, de 30 a 90 cm de alto. Esta especie florece y fructifica todo el año, especialmente de julio a septiembre. Se ha encontrado en varias regiones como el sur de Estados Unidos, México (Baja California, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Colima, Durango, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Nayarit, Oaxaca, Quintana Roo, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán), América Central, Antillas, Brasil y Colombia. También en el Oeste de África tropical (Diego-Pérez, 1997).

2.7. Rizósfera

La rizósfera es una zona de actividad microbiana que incrementa la interacción entre el suelo y la raíz (Springgs *et al.*, 2005; Ramírez-May, 2012), ésta directamente influenciada por las secreciones de las raíces (Frick *et al.*, 1999; Berendsen *et al.*, 2012). En la naturaleza, la rizósfera tiene una ecología compleja de reacciones que regulan las interacciones de las poblaciones microbianas y la planta controlando el destino y degradación de los contaminantes orgánicos (Corgié *et al.*, 2006). El sistema radicular de las plantas tiene un papel preponderante en la capacidad de adaptación, supervivencia, absorción de nutrientes y agua en suelos contaminados. De manera particular, la rizósfera tiene especial importancia en la degradación de compuestos orgánicos de origen natural y xenobióticos; además de liberar enzimas que inician la oxidación de los contaminantes orgánicos, también contribuye significativamente a la estimulación de la actividad de grupos microbianos responsables de la oxidación, degradación y completa mineralización de los contaminantes en el suelo (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006). Existen tres compartimentos, que actúan recíprocamente, en los componentes reconocidos en la rizósfera: **1)** la rizósfera, es la zona del suelo influenciada por las raíces a través de la liberación de sustratos que afectan la actividad microbiana, **2)** el rizoplano, es la superficie de la raíz, incluso las partículas del suelo fuertemente adherido, y **3)** el tejido de la raíz que algunos microorganismos endofíticos (endófitos) son capaces de colonizar. Distinguiendo entre las propiedades físicas, químicas, y biológicas asociadas a la raíz, el suelo cercano a éstas, comparado con suelo sin plantas, la raíz es responsable por los cambios en la





diversidad microbiana y el aumento del número y la actividad metabólica de los microorganismos en el microambiente de la rizósfera, el fenómeno se llama *efecto rizósfera*. La densidad de las bacterias rizosféricas puede ser de dos a cuatro órdenes de magnitud mayor que las poblaciones en los suelos circundantes y poseen un rango mayor de capacidades metabólicas, incluyendo la habilidad de degradar varios xenobióticos recalcitrantes. Por lo tanto, no es sorprendente, encontrar incremento en la tasa de biodegradación de los contaminantes orgánicos en suelos con vegetación comparadas con suelo sin vegetación (Jussila, 2006).

2.8. Microorganismos degradadores de hidrocarburos como inoculantes

Las comunidades microbianas en ecosistemas contaminados tienden a ser dominadas por aquellos organismos capaces de utilizar o de sobrevivir a compuestos tóxicos. El estudio de la diversidad microbiana y de la dinámica de sus poblaciones en consorcios biodegradadores, está creciendo notablemente en el área de la ecología microbiana, lo cual ha permitido profundizar en el conocimiento acerca de la composición de las comunidades presentes en suelos contaminados, así como su evolución durante los procesos de biodegradación, para determinar cuáles son los microorganismos capaces de adaptarse y de explorar los hábitats contaminados. Hay innumerables cepas de microorganismos (bacterias, levaduras y hongos) que degradan o transforman compuestos contaminantes en sustancias más simples, más seguras o menos tóxicas (Godlewska-Żyłkiewicz, 2006). Las bacterias representan el grupo de microorganismos con mayor diversidad, encontrándose en todos los ambientes; sus características de crecimiento y metabolismo rápido, plasticidad genética y su alta posibilidad de adaptación a una gran variedad de condiciones originan que sea el grupo microbiano más utilizado en los procesos de biorremediación (Hernández-Acosta *et al.*, 2003).

El cultivo de consorcios microbianos es una de las técnicas utilizadas para estudiar los mecanismos que emplean los microorganismos para establecerse y permanecer en distintos ambientes (Madueño *et al.*, 2009). A través de los exudados radicales, las plantas controlan





el desarrollo de la microflora rizosférica, y estas actúan directa e indirectamente sobre las plantas (Pettenello *et al.*, 2002). La inoculación de las plantas con bacterias degradadoras es uno de los planteamientos para mejorar los procesos de rehabilitación, pero no siempre tienen éxito debido a la competencia con los microorganismos autóctonos (Afzal *et al.*, 2012). Un inoculante bacteriano es una formulación que contiene una o más cepas bacterianas benéficas, debe ser fácil de usar, y económico (Bashan, 1998). La mayoría de los microorganismos degradadores de contaminantes específicos y/o bacterias promotoras del crecimiento de las plantas que son aplicados deben competir con los microorganismos de la rizósfera, siendo esto un factor crucial en el éxito de los inoculantes (Afzal, 2010). La aplicación exitosa de los microorganismos específicos seleccionados como inoculantes es un primer paso para mejorar la fitorremediación de suelos contaminados. También es importante que los microorganismos puedan colonizar el ambiente de la planta (Afzal *et al.*, 2012). Algunos inoculantes con bacterias de vida libre pueden interactuar positivamente con diferentes microorganismos simbióticos de la planta, tales como, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Frankia* y hongos micorrízicos (Kloepper *et al.*, 1989). Muchos suelos y especialmente bacterias de la rizósfera pueden estimular el crecimiento de los cultivos, en ausencia de un patógeno importante, al afectar el metabolismo de la planta. Los microorganismos más estudiados pertenecen a géneros diferentes, incluyendo: *Acetobacter*, *Achromobacter*, *Anabaena*, *Arthrobacter*, *Azoarcos*, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Frankia*, *Hydrogenophaga*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Microcoleus*, *Phyllobacterium*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Streptomyces*, y *Vibrio*. Uno de los ejemplos más conocidos es la simbiosis leguminosa *Rhizobium* que culmina con la formación de un nódulo, una nueva estructura vegetal bien organizada y funcionalmente reguladas (Loredo-Osti *et al.*, 2004; Bashan *et al.*, 2008). Los métodos para la inoculación ya sea con bacterias Gram positivas ó Gram negativas requieren el uso de un vehículo para liberar el inóculo en el suelo y permitir que las células se mezclen con este. Esto puede incluir acarreadores de bajo costo como: turba, arcilla calcinada que se mezclan con las suspensiones bacterianas y posteriormente se secan. La eficiencia de la inoculación





depende de la competencia de la bacteria en la rizósfera de la planta (Martínez-Viveros *et al.*, 2010). La colocación del inóculo a una profundidad adecuada también es un factor importante que puede influir en los beneficios de la inoculación del suelo (Kyei-Boahen *et al.*, 2002). De la misma manera, las cepas inoculadas pueden ser afectadas por la depredación de protistas y por la competencia con los microorganismos indígenas por los nutrientes o aceptores de electrones (Chauhan *et al.*, 2008).

2.9. Destino de los contaminantes orgánicos en las plantas

El destino de los contaminantes dentro de la célula de la planta depende de su naturaleza química, temperatura externa, variedad de las plantas y la fase de crecimiento, entre otros (Kvesitadze *et al.*, 2009). La mayoría de los compuestos orgánicos parecen sufrir algún grado de transformación en las células de la planta antes de ser secuestrado en vacuolas o unido a las estructuras celulares insolubles tales como la lignina (Singh y Jain, 2003). La magnitud y la eficiencia de la sorción dependen de la concentración del contaminante, las características del mismo, las especies de plantas, el tiempo de exposición, y otras variables del sistema como suelo-microorganismo-rizósfera (Su y Zhu, 2007).

Sorción por las raíces

Los contaminantes orgánicos entran a las raíces de una manera que difiere mucho de las hojas. Generalmente son absorbidos por las raíces en dos etapas: i) primero se difunden rápidamente en el medio que rodea a la raíz, la tasa de sorción es directamente proporcional a la concentración del compuesto en el suelo o solución nutritiva y ii) posteriormente, se acumulan lentamente en los tejidos (Kvesitadze *et al.*, 2004). El grado del proceso de sorción depende del peso molecular de los compuestos, la concentración, la polaridad, pH, temperatura, humedad del suelo y otros factores. La vía principal por donde entran los contaminantes orgánicos en el sistema de la planta es la translocación del agua dentro de la raíz con la transpiración. Una vez que el contaminante entra en contacto con la superficie de la raíz, la captación se rige principalmente por la hidrofobicidad relativa de los





compuestos, medida por el coeficiente de partición octanol-agua (K_{ow}). Los compuestos extremadamente hidrofóbicos ($K_{ow} > 4$) no serán transportados a través de la planta debido a su afinidad por los lípidos y, por lo tanto, su tendencia a ser sorbidos en la superficie de la raíz. Los compuestos extremadamente hidrófilos ($K_{ow} < 1$), no serán sorbidos por las raíces de la planta, pero tampoco pueden atravesar la endodermis de la raíz, debido, a la baja permeabilidad de la raíz (Gunderson, 2006). Las raíces sorben un amplio espectro de moléculas orgánicas hidrofílicas y lipofílicas (hidrocarburos alifáticos, aromáticos y hidroaromáticos, alcoholes, fenoles, aminas, etc), incluso compuestos con una muy baja solubilidad en el agua, como los hidrocarburos policíclicos (Kvesitadze *et al.*, 2004).

Sorción por las hojas

Con el fin de penetrar en una hoja, los xenobióticos orgánicos deben pasar a través de las estomas, o atravesar la epidermis, cubierta por la cutícula. Las estomas se encuentran normalmente en la parte inferior (abaxial) y la capa cuticular gruesa en la parte superior (adaxial). El sistema de los estomas consta de numerosos orificios, que pueden cambiar de tamaño cuando sea necesario y regular la penetración de compuestos en las hojas. Al cambiar el diámetro de apertura, controla la entrada de los compuestos de diferentes pesos moleculares. La apertura y cierre de los estomas es controlado por el movimiento de dos células guardia, que modifican las células epidérmicas (Kvesitadze *et al.*, 2004). Los gases y los líquidos penetran en las hojas a través de las estomas. La permeabilidad de los gases depende del grado de apertura de las aberturas de la estoma (4-10 nm), y la permeabilidad de los líquidos depende del grado de humedad de la superficie de la hoja, la tensión superficial del líquido y la morfología de los estomas. La mayoría de los compuestos orgánicos penetran en la hoja como una solución (pesticidas, contaminantes aéreos, aerosoles líquidos, etc.) (Kvesitadze *et al.*, 2009).





Metabolismo de los contaminantes orgánicos dentro de la planta

Las interacciones específicas de un contaminante con el suelo, el agua y las plantas pueden variar dependiendo de las propiedades químicas del contaminante, las propiedades fisiológicas de la especie de plantas introducidas y el medio contaminado. El metabolismo de compuestos orgánicos procede en tres pasos generales: transformación, conjugación y compartimentalización ó secuestro (Singh y Jain, 2003).

Transformación. Es un proceso mediante el cual una molécula de un xenobiótico orgánico hidrofóbico adquiere el grupo funcional hidrofílico (hidroxilo, carboxilo, amino, etc.) como resultado de la oxidación enzimática, reducción, hidrólisis, etc. (Kvesitadze *et al.*, 2009).

Conjugación. Es el segundo paso, los metabolitos resultantes de las reacciones de transformación se unen covalentemente con aminoácidos hidrofílicos endógenos, los intermediarios compuestos orgánicos iniciales o los compuestos originales que poseen grupos funcionales capaces de reaccionar con compuestos endógenos intracelulares son susceptibles a la conjugación (Gunderson, 2006; Kvesitadze *et al.*, 2009).

Compartimentalización. En esta fase temporal (corto o largo plazo) de almacenamiento de los conjugados de compuestos tóxicos (junto con péptidos, azúcares, aminoácidos, etc.) se acumulan en las vacuolas, mientras que los conjugados insolubles (lignina, junto con la proteína, almidón, pectina, celulosa, xilano y otros polisacáridos) se mueven fuera de la célula a través de exocitosis y se acumulan en el apoplasto o la pared celular (Kvesitadze *et al.*, 2006).





El proceso de compartimentalización es análoga a la excreción de los mamíferos, fundamentalmente la eliminación de compuestos tóxicos de los tejidos metabólicos. La diferencia principal entre los procesos de descontaminación en los mamíferos (y otros animales) y las plantas es que no tienen un sistema especial para la eliminación de los compuestos resultantes de las reacciones de conjugación (Kvesitadze *et al.*, 2006). El modelo de "hígado verde" se utiliza a menudo para describir el destino y disposición de contaminantes orgánicos (compuestos xenobióticos) dentro de las plantas. El metabolismo de compuestos extraños en los sistemas de las plantas es generalmente considerado como una "desintoxicación" proceso que es similar al metabolismo de compuestos xenobióticos en humanos (Singh y Jain, 2003).





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

3. ANTECEDENTES





Estudios recientes han demostrado que algunas plantas con determinadas características incrementan la biodegradación de una variedad amplia de moléculas orgánicas xenobióticas (herbicidas, insecticidas, acaricidas e hidrocarburos, entre otros) en suelos contaminados. Sin embargo, se sabe poco acerca de la participación directa o indirecta y de los mecanismos y etapas que ocurre en las plantas para transformar estos compuestos. López-Martínez *et al.*, (2005) muestran a la fitorremediación como una opción tecnológica útil para la limpieza de suelos contaminados, los mecanismos que la planta utiliza, las interacciones que se llevan a cabo en el suelo entre planta, microorganismos y compuestos orgánicos xenobióticos. Estos conocimientos permitirán proponer soluciones a los problemas de la contaminación y la eventual recuperación de suelos.

Evaluaciones realizadas por Rivera-Cruz *et al.*, (2006) determinaron la capacidad del pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) asociado a poblaciones autóctonas de bacterias y hongos para limpiar suelos contaminados con benzo(α)pireno (BaP). Las bacterias, los hongos y la asociación bacterias-hongos registraron poblaciones mayores a los 60 días y significativamente diferentes entre los tratamientos con rizósfera del pasto alemán en suelo con 100 mg kg^{-1} de BaP. La biodegradación del hidrocarburo a los 120 días fue significativamente mayor en suelo rizosférico inoculado con la asociación bacterias-hongos. Esta degradación removió hasta el 66.5% del BaP. La producción de materia vegetal seca fue significativamente mayor en suelo con BaP, y con el inóculo de los hongos *Paecilomyces sp* y *Trichoderma sp* se promovió la producción de biomasa hasta con un incremento de 48.3% con respecto al control.

Miranda-Martínez *et al.*, (2007) utilizaron cinco cepas bacterianas degradadoras de fenantreno y fijadoras de nitrógeno atmosférico: RM1S, RM10S (aisladas de suelo contaminado con petróleo), RM12A (aislada de suelo contaminado con fenantreno), *Azospirillum brasilense* cd. y *A. halopraeferens* (aisladas de suelos no contaminados) para determinar su dinámica poblacional en arena contaminada con Fenantreno (30 mg kg^{-1}), en presencia o ausencia del pasto alemán, *Echinochloa polystachya* (HBK) Hitch. La





población de las cepas RM1S, RM10S y RM12A presentó un incremento en los primeros 10 días después de la inoculación (DDI); sin embargo, después de esta fecha, la población disminuyó paulatinamente hasta dejar de ser detectada. La mayor población de las bacterias inoculadas se observó en los tratamientos sin planta. En cuanto a las cepas *A. brasilense* cd. y *A. halopraeferens*, su población no se detectó a 20 DDI en presencia o ausencia de la planta. La degradación de fenantreno a 30 DDI no presentó diferencias significativas entre tratamientos; sin embargo, la presencia de la planta contribuyó a la mayor degradación del contaminante (39.8%). A 60 DDI, la degradación de fenantreno fue mayor en plantas inoculadas con *A. brasilense* cd (57.02%), así como con el consorcio bacteriano (59.01%), en comparación con el testigo sin planta (41.7%). Debido a que las unidades experimentales no fueron sistemas completamente cerrados, se observó la presencia de microorganismos no inoculados a partir de 30 DDI.

Por otro lado, Castro-Carrillo *et al.*, (2008) estudiaron la capacidad de crecimiento y remoción de fenantreno (FEN) por el helecho *Azolla caroliniana*, utilizando bioaumentación con microorganismos hidrocarbonoclastas. *A. caroliniana* fue seleccionada de entre cuatro colectas de *Azolla* de México, por su tolerancia a concentraciones crecientes de FEN. Posteriormente, *A. caroliniana* fue expuesta a tres concentraciones de FEN: 20, 40 y 60 mg L⁻¹ de solución nutritiva de Yoshida, inoculada con el complejo microbiano *Bacillus stearothermophilus* y *Oscillatoria sp.* (BST+OSC) con tolerancia *in vitro* a 100 mg FEN L⁻¹ de medio de cultivo. A los 49 días después de la inoculación (DDI), la mayor producción de materia seca se presentó en el tratamiento con 20 mg FEN y en el que se aplicó bioaumentación con BST+OSC en presencia de 40 mg FEN. Ambos tratamientos superaron en 19,7% al control. Los tratamientos con mayor producción de materia seca presentaron mayor actividad nitrogenasa (7-12 nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹), mientras que la menor actividad se observó en los tratamientos con 60 mg FEN (3-4 nmol C₂H₄ g⁻¹ h⁻¹). La menor remoción de FEN (45%) se observó en *A. caroliniana* sin BST+OSC con 20 mg FEN; en contraste, la mayor remoción (80%) se presentó en *A. caroliniana* inoculada y/o sin inocular en presencia de 60 mg FEN.





Por otra parte, Ibrahim *et al.*, (2008) probaron la presencia de bacterias heterótrofas (HB) y bacterias utilizando hidrocarburos (HUB) en la rizósfera y sin rizósfera del suelo de tres plantas, *Eucalipto camaldulensis*, *Lablab purpureus* y *Moringa oleifera*. Compararon cuentas para la rizósfera y sin rizósfera del suelo de las plantas. En la rizósfera del suelo de *M. oleifera* tuvieron cuentas máximas más altas (31.4×10^8 CFU g^{-1}) de HB seguido por *L. purpureus* (27.0×10^8 CFU g^{-1}) y *E. camaldulensis* con (22.8×10^8 CFU g^{-1}). Sin rizósfera de *E. camaldulensis* tuvo la cuenta más alto de HB 40.4×10^8 CFU/g mientras la menor cuenta se obtuvo para *L. purpureus* (5.0×10^8 CFU g^{-1}). Las cuentas de la rizósfera del suelo para *M. oleifera* de HUB con rango de 9.0×10^4 a 4.0×10^5 CFU g^{-1} , mientras las cuentas para *L. purpureus* con rango de 1.6 a 2.1×10^5 CFU g^{-1} . El *E. camaldulensis* tuvo HUB de $3.0-4.2 \times 10^5$ CFU g^{-1} . La menor cuenta del HUB para sin rizósfera del suelo se observó en *L. purpureus* (1.9×10^5 CFU g^{-1}) mientras la cuenta más alta era observada en *M. oleifera* (4.2×10^5 CFU g^{-1}). Los degradadores del hidrocarburos se identificaron como *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus casei*, *Enterococcus gallinerium*, *Cedecea niteri*, *Viscosus actinomyces*, *Gardnarella sp*, *Erisipelothrix rhusiopathae*, *Corynebacterium ovis*, *Corynebacterium hofmanii*, *Aeromonas sp*, *Brochothrix campestris* y *Listeria murrayi*. La mayoría de los aislados crecieron bien en hidrocarburos excepto el *L. murrayi*. Los resultados sugieren que los organismos pueden servir como semillas para bioaumentación durante la remediación de ambientes contaminados además estas plantas puede ser usadas en la rehabilitación de suelos contaminados con petróleo.

Jing *et al.*, (2008) llevaron a cabo un experimento del efecto rizósfera en la fitorremediación del suelo contaminado con petróleo en tres especies de hierbas, a saber *Panicum*, *Eleusine indica* (L.) Gaerth, y *Tall fescue*. Después de un periodo de 150 días, este experimento en macetas mostró que la rizósfera de estas tres especies aceleró la degradación de los hidrocarburos de petróleo en magnitudes diferentes. Los resultados mostraron que el número de microorganismos en la rizósfera aumentó tres órdenes de magnitud. La degradación de hidrocarburos de petróleo en la rizósfera fue 3-4 veces que en





los suelos sin planta. La actividad de la dehidrogenasa en la rizósfera fue de 1.61-2.20 veces que en suelo sin planta, pero la actividad de la catalasa fue 0.90-0.93 veces que en un suelo sin planta, y el volumen de humedad del suelo aumentó por 5% comparado con la de sin planta.

Estudios recientes por Toledo-Ramos *et al.*, (2009) fueron realizados con el objetivo de evaluar el potencial de fitorremediación de *Sebastiania commersoniana* en un suelo contaminado por petróleo. Esta especie es un árbol nativo, seleccionada debido a que se ha probado su capacidad de sobrevivir en áreas contaminadas por petróleo. Los experimentos se llevaron a cabo con suelo vegetado pero no contaminado, suelos recién contaminados (25, 50 y 75 g kg⁻¹) sin vegetación, y un suelo con vegetación y contaminado, las muestras fueron colectadas a los 60 y 424 días después de la contaminación con el propósito de evaluar la degradación. Los resultados obtenidos permiten declarar que *S. commersoniana* muestra ser tolerante a la contaminación de petróleo con respecto al crecimiento de planta. La degradación de los hidrocarburos de petróleo fueron evaluados por cromatografía de gases con un detector de ionización de flama (GC-FID) equipado con una columna capilar HP-5 (5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m; 0.25 mm; 0.25 μm). De acuerdo a los análisis de cromatografía, las muestras en contacto con *S. commersoniana* mostraron una reducción significativa. El análisis de las muestras a los 60 días mostraron una reducción de hidrocarburos de petróleo superior de 60% y las muestras a los 424 días mostraron una reducción superior de 94%.

Como antecedente directo de estudio con la especie, Pérez-Montero y Hernández-Morales, (2009) evaluaron los efectos de los hidrocarburos (HC) sobre el crecimiento de dos especies de plantas *Cyperus laxus* y *Cyperus ligularis*. Realizaron dos bioensayos, durante 21 días, en agrolita contaminada con HC (2,500, 5,000, 10,000, 25,000 y 50,000 mg de HTP kg⁻¹ de agrolita base seca) y suelo contaminado con HC (10,000, 25,000, 50,000, 100,000, 150,000 mg de HTP kg⁻¹ de suelo seco) en condiciones de invernadero siendo la composición de estos alifáticos 41%, aromáticos 23%, polares 22% y asfaltenos 14%. El grado de influencia del petróleo se determinó en función de las variables de mortalidad y crecimiento (longitud de hojas y raíces, biomasa seca aérea y radicular, biomasa seca total).





Para *C. laxus*, tanto en el sistema modelo como en el suelo contaminado, las plantas crecieron de manera saludable sin mostrar signos de estrés, resultando una mayor cantidad de biomasa en concentraciones bajas (2,500 y 5,000 mg de HTP kg⁻¹ de agrolita base seca) comparada con 0% de HTP (sin hidrocarburos). La presencia de contaminantes tuvo un efecto negativo más notorio en la velocidad promedio de crecimiento de raíces. En el caso de *C. ligularis*, se presentó mayor efecto fitotóxico en el sistema modelo puesto que murieron individuos a partir de 30,000 mg de HTP kg⁻¹ de agrolita base seca hasta alcanzar el 100% de mortalidad en la mayor concentración probada (50,000 mg de HTP kg⁻¹ de agrolita base seca). La biomasa seca aérea, radicular y total disminuyó al aumentar la concentración de HC así como la velocidad promedio de crecimiento de raíces y hojas. En el caso del suelo contaminado no se presentó mortalidad de las plantas y también se observó el decremento en las variables medidas a partir de la concentración de 10,000 mg de HTP kg⁻¹ de suelo seco. A partir de estos resultados se concluye que la planta que presenta menor tolerancia a los HC fue *C. ligularis* comparada con *C. laxus*. De los sistemas utilizados, la agrolita recién contaminada favoreció un mayor efecto fitotóxico, en ambas especies, con respecto al suelo contaminado debido a la mayor biodisponibilidad de los HC. Las variables más afectadas por la presencia de contaminantes fueron la velocidad promedio de crecimiento raíz y de hojas.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

4. JUSTIFICACIÓN





La contaminación de algunos suelos y acuíferos con petróleo crudo y sus subproductos es un problema mundial, ocasionado por un mal manejo en las actividades de la industria petrolera (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003) y es de amplia distribución geográfica, teniendo en cuenta que independientemente de la zona afectada (lagos, suelos, zonas freáticas, ríos y playas), por procesos biológicos y físicos, los hidrocarburos tienen como destino final los mares y océanos (Narváez-Flórez *et al.*, 2008). La contaminación del suelo, es un problema medioambiental muy importante, ha estado llamando la atención pública durante las últimas décadas. La fitorremediación de contaminantes orgánicos es una tecnología muy prometedora para la remoción de contaminantes en los sitios contaminados (Alkorta y Garbisu, 2001; Lu *et al.*, 2010), es una tecnología emergente que usa plantas para limpiar contaminantes en el medio ambiente. Los derrames y fugas de petróleo, los desechos de perforación y aguas aceitosas alteran las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Aunque se han realizado estudios de los niveles de concentración del petróleo en los horizontes superficiales en suelo orgánico y minerales, se desconocen las repercusiones en el subsuelo y en las poblaciones de bacterias y hongos en los horizontes del suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). Algunos suelos agrícolas han sido gravemente afectados por las actividades de la industria petrolera, por lo que es necesario generar tecnologías para su recuperación (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003). En este contexto, como etapa previa a la aplicación de una tecnología como la fitorremediación, es importante seleccionar la especie adecuada y diseñar un sistema modelo donde se simule el suelo, favoreciendo las condiciones de biodisponibilidad de los contaminantes con el objetivo de determinar el papel de la planta nativa y los microorganismos asociados en relación con la remoción de hidrocarburos en un suelo contaminado.

En el presente estudio se determinó si *Cyperus ligularis*, planta nativa de un sitio contaminado, tiene capacidad fitorremediadora de hidrocarburos en suelo, con la finalidad de aplicarse posteriormente en estrategias de biorremediación.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

5. HIPÓTESIS





La planta nativa *Cyperus ligularis* posee capacidad fitorremediadora. La adición de microorganismos degradadores mejorará el crecimiento y la remoción de hidrocarburos.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

6. OBJETIVOS





6.1. OBJETIVO GENERAL



Evaluar la capacidad fitorremediadora de hidrocarburos por *Cyperus ligularis* en un sistema modelo.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS



Evaluar el efecto de los hidrocarburos y la adición de microorganismos degradadores en el crecimiento de *C. ligularis*.



Determinar la remoción de hidrocarburos por *C. ligularis*.



Evaluar la remoción de alifáticos, aromáticos, polares y asfaltenos durante la fitorremediación.



Evaluar la sorción de hidrocarburos en las raíces de *C. ligularis*.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

7. MATERIAL Y MÉTODOS





En la Figura 1 se muestra la estrategia experimental del presente proyecto, posteriormente se describe cada una de las etapas de ésta.

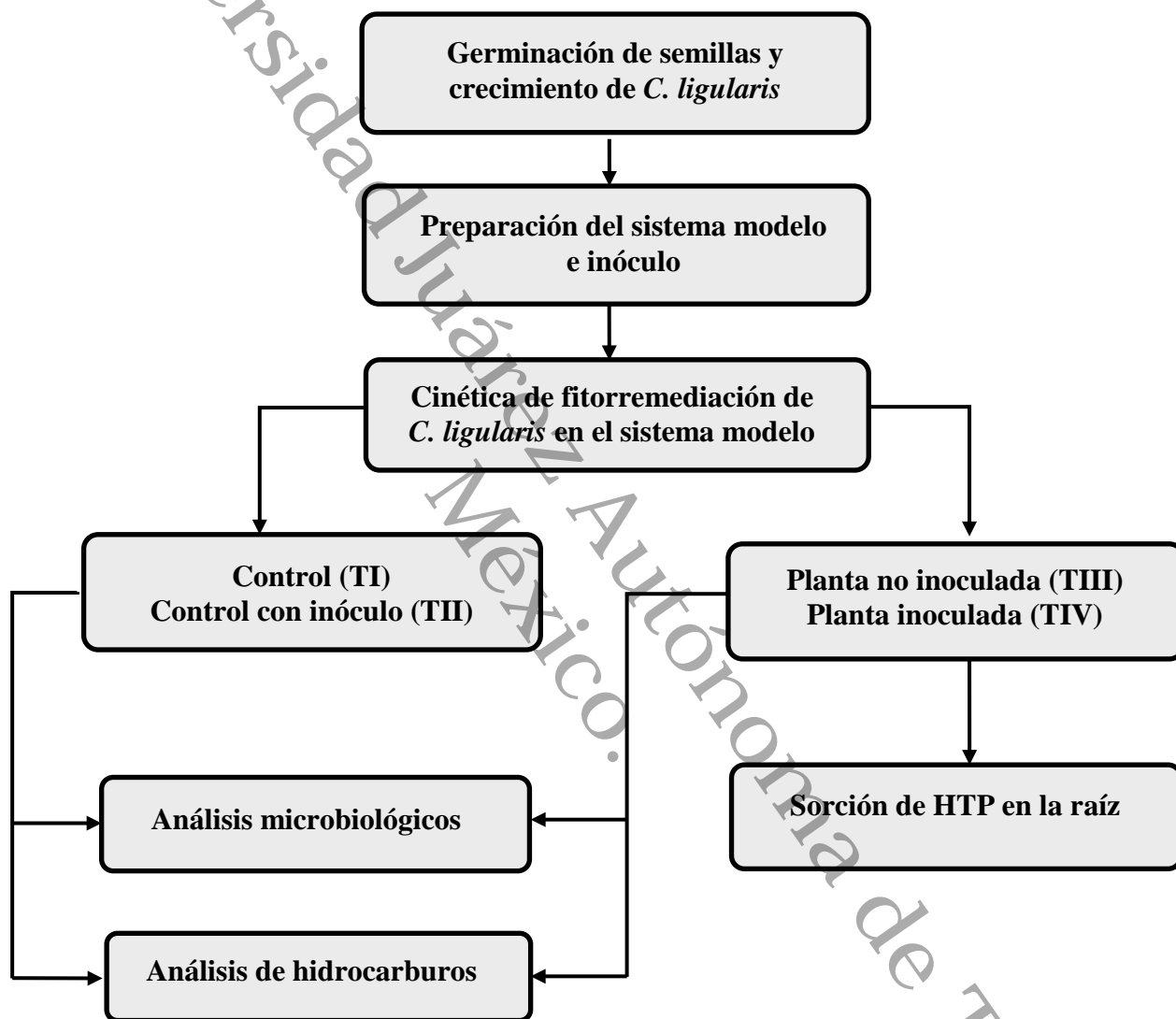


Figura 1. Estrategia experimental.





7.1. Diseño experimental

En el presente trabajo se estableció un experimento de tipo factorial de tres factores (planta, inóculo y tiempo) con dos, dos y cinco niveles respectivamente (2x2x5), con 4 repeticiones y un total de 80 unidades experimentales. Dos niveles de plantas (con planta y sin planta), dos niveles de inóculo (con inóculo y sin inóculo) y cinco niveles del tiempo: 15, 30, 45, 60 y 90 días. Cada unidad experimental consistió en frascos de vidrio (250 ml) con 27 g de agrolita y una duración de 3 meses. Se muestrearon 4 contenedores cada vez. Las variables de respuesta a medir fueron: biomasa seca aérea y radicular, tasa de crecimiento aérea y radicular, tasa de remoción, remoción de hidrocarburos, sorción de hidrocarburos en la raíz, número de microorganismos totales y número de degradadores.

Análisis estadístico

El análisis de datos consistió en un Análisis de Varianza Factorial con interacción seguido de una prueba de contrastes múltiples de Tukey y ANOVA simple según sea el caso. Para el análisis estadístico se aplicó el programa *Statgraphics plus* (versión 5.1 para Windows).

7.2. Germinación de semillas y crecimiento de *Cyperus ligularis*

Se colectaron semillas de *C. ligularis*, planta nativa que crece en una zona contaminada de La Venta, municipio de Huimanguillo, Tabasco. Éstas se dejaron secar al aire y guardaron dentro de bolsas de papel oscuro para estudios posteriores. Se sembraron (100 semillas) en charolas de aluminio con turba y se le añadió solución nutritiva comercial (Triple 17) cada 15 días, crecieron en condiciones de invernadero hasta los 60 días de edad (Figura 2).





Figura 2. Germinación y crecimiento de semillas *C. ligularis* en condiciones invernadero.

7.3. Preparación del sistema modelo

Como soporte modelo se utilizó agrolita (material de origen volcánico, con pH neutro y diámetro de partícula de 1.5 a 3.1 mm, tiene la capacidad de retener agua de 3 a 4 veces su peso) para simular suelo (Arriaga *et al.*, 1994). La agrolita se tamizó a través de mallas de 8 mm y 6 mm de abertura, se lavó con agua caliente y dejó secar al aire. Se contaminó artificialmente con hidrocarburos (disueltos en acetona:hexano 1:1) a una concentración de 27,000 mg HTP kg⁻¹ agrolita seca, los hidrocarburos fueron extraídos previamente del suelo contaminado de La Venta, municipio de Huimanguillo, Tabasco por el método de reflujo con equipo Soxhlet.

7.4. Microorganismos

El consorcio microbiano que se utilizó como inóculo está formado por 7 cepas bacterianas (*Bacillus cereus*, *Gordonia rubripertincta*, *Kocuria rosea*, *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus subtilis A*, *Basillus subtilis B* y una no identificada) y dos cepas fúngicas (*Aspergillus carneus* y *Aspergillus terreus*) aisladas de la rizósfera de la planta nativa *Cyperus laxus* Lam, en un pantano altamente contaminado con hidrocarburos, adyacentes a la refinería en





Minatitlán, Veracruz, México. Se seleccionaron con base a su capacidad de degradación de hidrocarburos (Díaz-Ramírez *et al.*, 2003).

7.5. Preparación de los inóculos

7.5.1. Inóculo bacteriano

Cada cepa bacteriana se cultivó en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de caldo nutritivo (Bioxon), se incubaron durante 72 h a 150 rpm y 30 °C. Posteriormente se tomaron 25 ml de cada cultivo y se transfirieron a medio fresco (22.5 ml), incubándose nuevamente hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial (Contreras-Juárez, 2009). Al final del cultivo se ajustó la densidad óptica de la suspensión bacteriana a 0.3 unidades de absorbancia ($\lambda = 600$ nm) para estandarizar el inóculo. Se utilizó el espectrofotómetro UV-visible (Thermo) para estandarizar el inóculo, en cada caso el inóculo se preparó mezclando volúmenes iguales de cada una de las suspensiones ajustadas de cepa bacteriana.

7.5.2. Inóculo fúngico

Cada una de las cepas fúngicas se cultivaron en matraces Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de medio de propagación (en $g L^{-1}$): $NaNO_3$, 5.14; $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.25; KCl, 0.50; KH_2PO_4 , 12.8; K_2HPO_4 , 1.0; glucosa, 20.0; extracto de levadura, 3.0 y 2 ml solución mineral ($FeSO_4 \cdot 7 H_2O$, 0.100; $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 0.015; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.16 y $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.088). Los matraces inoculados se incubaron durante 5 días bajo las mismas condiciones que las cepas bacterianas. Al final, los pellets se transfirieron a tubos para centrifuga de plástico estériles de 50 ml. Los pellets formados se disgregaron agitando manualmente con perlas de vidrio hasta que se formó una suspensión homogénea (Contreras, 2009). Se colocaron 40 ml de cada matraz en tubos de centrifuga cónicos de 50 ml, se centrifugó a 5,000 rpm/5 min ó 3,500 rpm/7 min) desechando el sobrenadante, a continuación se resuspendió el pellet en 20 ml de solución salina (0.85% de NaCl) en vórtex por 3 min. Se





realizaron dos lavados con la solución y se centrifugó nuevamente para tratar de eliminar el medio de cultivo.

7.6. Cinética de fitorremediación en el sistema modelo

Las cinéticas de fitorremediación se llevaron a cabo en unidades experimentales de vidrio (frascos de 250 ml) con 27 g de agrolita seca previamente contaminada (27,000 mg de HTP kg^{-1} de agrolita seca) con una duración de tres meses donde se evaluó la capacidad de remoción de los hidrocarburos. En la Figura 3 se observa el montaje de las unidades experimentales. Cuatro tipos de experimentos (20 contenedores cada uno), se probaron simultáneamente: i) control (TI), ii) control con inóculo (TII), iii) planta no inoculada (TIII) y iv) planta inoculada (TIV). Durante la cinética se realizaron muestreos a los 15, 30, 45, 60 y 90 días por cuadruplicado para todos los tratamientos.



Figura 3. Montaje de las unidades experimentales en condiciones de invernadero.

En los tratamientos con plantas no inoculadas e inoculadas, se trasplantó a cada contenedor una plántula de *C. ligularis* de 60 días de edad crecidas en turba. A los tratamientos control con inóculo y planta inoculada se les adicionó el consorcio microbiano el mismo día del montaje (Figura 4). Como nutrientes se adicionó la solución hidropónica Long-Ahston





modificada (en mg L^{-1}): KNO_3 , 808; $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 944; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 184; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 368; y 1 ml de solución de oligoelementos (en mg L^{-1}): $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 2.23; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 0.25; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.29; H_3BO_3 , 3.10; NaCl , 5.90; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 0.088 y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02, una vez a la semana. Los contenedores se mantuvieron en condiciones de invernadero.



Figura 4. Aplicación del inóculo al inicio del experimento.

7.7. Procedimiento de muestreo

Los muestreos se realizaron a los 15, 30, 45, 60 y 90 días durante la cinética de fitorremediación, retirando por cada muestreo 4 contenedores de cada tratamiento. Se tomó agrolita de cada contenedor, se colocó en un recipiente para los análisis microbiológicos y de hidrocarburos. El contenido de agrolita de los tratamientos con planta se consideró como suelo rizosférico.





7.8. Métodos analíticos

7.8.1. Medición del crecimiento de *C. ligularis*

Se evaluó en los diferentes tiempos de muestreo la tasa de crecimiento y la biomasa seca de la parte (aérea y radicular) en los tratamientos con plantas no inoculadas e inoculadas. Estos parámetros se calcularon en 4 contenedores de cada tratamiento.

7.8.1.1. Tasa de crecimiento aérea y radicular

Las plantas se recolectaron y posteriormente se lavaron para eliminar la agrolita. Para determinar la tasa de crecimiento de cada plántula se midió la longitud de hojas y raíces de manera manual al momento del trasplante con una regla graduada.

7.8.1.2. Biomasa seca aérea y radicular

La biomasa se cuantificó después de cada muestreo. Se separó la parte aérea de la parte radical. Se etiquetó y colocó cada muestra por tratamiento y repeticiones en bolsas de papel. Posteriormente las bolsas fueron colocadas en una estufa a 60 °C para después pesar de manera individual las dos partes con una balanza analítica (Scientech-ZSA-120) hasta alcanzar el peso constante.

7.8.2. Sorción de hidrocarburos en raíz

Al final del experimento, se extrajeron los hidrocarburos de las raíces mediante el método Soxhlet. Los extractos se depositaron en frascos de 30 ml (Escalante-Espinosa, 2005b).





7.9. Análisis microbiológicos

A continuación se describen los análisis microbiológicos que se utilizaron en el desarrollo del trabajo.

7.9.1. Cuantificación de microorganismos rizosféricos

La cuantificación total de los microorganismos se llevó a cabo por la técnica de conteo en placa propuesta por Lorch *et al.*, (1995) usando agar soya y tripticaseína (AST, Bioxon) para bacterias y agar papa dextrosa (PDA, Bioxon) para hongos (Escalante-Espinosa, 2005a).

Preparación de diluciones

En la campana de flujo laminar se adicionaron 9 ml de solución salina a cada uno de los tubos de ensayo. Posteriormente se pesó 1g de agrolita y transfirió cuidadosamente al tubo de ensayo (10^{-1}), se agitó por 10 min en el vórtex en dos tiempos de 5 min. Después se tomó 1 ml de la dilución, y transfirió al siguiente tubo (10^{-2}) y se agitó por 5 min, así sucesivamente hasta la última dilución (10^{-6}). Se prepararon cajas Petri de cada medio de cultivo (por triplicado) las cuales fueron inoculadas con 100 μ l de las diluciones seriadas, con ayuda de una varilla de vidrio se dispersó el inóculo sobre la superficie del medio. Una vez realizada la siembra, las placas se incubaron a 30 °C. Cada 24 h se observó el crecimiento y se contó el número de colonias. Las UFC (Unidades Formadoras de Colonias) se calcularon de acuerdo a la siguiente ecuación, considerando el factor de dilución correspondiente (Landeró-Ocaña, 2010).

$$\text{UFC / ml} = \frac{\# \text{ Colonias}}{0.1 \text{ ml}} \times (\text{factor de dilución})$$





7.9.2. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (Número Más Probable)

Uno de los métodos más empleados en el monitoreo de los procesos de biorremediación de hidrocarburos es la cuantificación de microorganismos degradadores. Numerosos estudios han utilizado la técnica de Número Más Probable (NMP) para estimar la densidad de microorganismos degradadores de hidrocarburos (# células g^{-1} suelo) en sedimentos y muestras de suelo. Los degradadores de hidrocarburos se cuantificaron durante cada muestreo mediante el Método del Número Más Probable (NMP). El iodonitrotetrazolio (INT) se utilizó como indicador de crecimiento microbiano. Las muestras se incubaron durante dos semanas a 30 °C.

Preparación de la solución madre

En un vaso de precipitados de 10 ml se pesaron 250 mg de HTP. En la campana, se agregó hexano hasta la disolución de los hidrocarburos y se vació a un matraz aforado de 5 ml y nuevamente se lavó el vaso con el solvente hasta recuperar todo el HTP. Después se agregó más hexano al matraz hasta aforar. Se agitó ligeramente el matraz para homogenizar (Landeró-Ocaña, 2010).

Preparación de tubos con HTP

En una gradilla se colocaron los tubos, dentro de la campana de extracción se adicionó la solución madre a cada uno de los tubos y se dejó evaporar el hexano por completo. Después se taparon todos los tubos (incluyendo controles) usando tapones de algodón y junto con el medio mineral se colocaron en el autoclave para esterilizar a 121 °C (15 psi) durante 15 min y se dejó enfriar el material (Landeró-Ocaña, 2010). A continuación se adicionó a los tubos 500 μl de medio mineral y 250 μl del inóculo a cada tubo correspondiente con la dilución, se tapó e incubó por 14 días.





Preparación y esterilización de la solución iodonitrotetrazolio (INT) (3 g/l).

Se pesaron 30 mg de INT y transfirió a un matraz aforado de 10 ml con 1 ml de alcohol absoluto y agitó hasta disolver. Después se agregó agua destilada estéril hasta aforar.

Adición del INT a tubos

Se adicionó a cada tubo la solución INT. Se dejaron a la incubadora durante 48 hrs. Los tubos que presenten microorganismos degradadores tendrán un cambio de color. El número de microorganismos degradadores se expresa en NMP g⁻¹ y se calculó tomando la dilución más alta que tuviera el mayor número de tubos positivos y las dos diluciones posteriores (Landero-Ocaña, 2010).

7.10. *Análisis de hidrocarburos*

7.10.1. *Extracción y cuantificación de hidrocarburos residuales*

Los hidrocarburos residuales se extrajeron a partir de 5 g de agrolita seca y suelo usando el método soxhlet (Figura 5) según Fernández *et al.*, (2006). Donde se pesaron 5 g de agrolita y suelo contaminado, se colocaron en cartuchos de celulosa 33 x 80 mm y se le adicionó 5 g de sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄). Los cartuchos se colocaron en el equipo y mediante la acción de una mezcla de solvente de (acetona-hexano 1:1) fue reflujo a través de la mezcla durante un tiempo de 8 h. Los hidrocarburos residuales se usaron para determinar su composición (alifáticos, aromáticos, asfaltenos y polares) al inicio y al final de cada cinética.





Figura 5. Equipo soxhlet utilizado para la extracción de los hidrocarburos totales de petróleo (HTP).

7.10.2. Precipitación y cuantificación de los asfaltenos

Los asfaltenos se cuantificaron por gravimetría previa precipitación utilizando hexano, solvente en el que esta fracción es insoluble (Figura 6). Aproximadamente 1 g de los HTP extraídos del suelo, fueron colocados en un vaso de precipitados adicionando 20 ml de hexano a temperatura ambiente. Con ayuda de una espátula se homogenizó la muestra y se filtró posteriormente a vacío (papel Whatman 41 a peso constante) en un matraz Kitazato. Se realizaron de 3 a 5 lavados cada uno con 10 ml de hexano frío. Posteriormente el solvente se eliminó por evaporación. Para obtener una mayor precisión en la cuantificación se pesaron los asfaltenos adheridos en: *a)* papel filtro, *b)* vaso de precipitado y *c)* espátula. El análisis se realizó por triplicado (ASTM, 1991).





Figura 6. Precipitación de los asfaltenos para su cuantificación.

7.10.3. Fraccionamiento de hidrocarburos sin asfaltenos

Este método basado en la separación de los hidrocarburos por cromatografía en columna (Figura 7), utilizando gel de sílice (mallas 60-200) como fase estacionaria y solvente orgánico como agentes de elución. La determinación se realizó gravimétricamente. Para el análisis se emplearon columnas de vidrio con llave de paso así como viales previamente pesados; el gel de sílice se activó previamente secándose en una estufa a 105 °C durante 24 h; el procedimiento se detalla a continuación:



Figura 7. Método de separación de hidrocarburos por Cromatografía en columna.





7.10.4. Empacado de las columnas

Al fondo de cada columna de vidrio se colocó un fragmento pequeño de fibra de vidrio en forma de cono, posteriormente se adicionaron aproximadamente 3.5 g de sílice activada, compactándose con unos ligeros golpes. Encima de la sílice se colocó otro fragmento pequeño de fibra de vidrio y finalmente se adicionaron 0.5 g de sulfato de sodio anhidro.

7.10.5. Formación del gel e incorporación de la muestra

Se agregaron 25 ml de hexano en la columna dejándolo salir por goteos constantes. El hexano se recirculó en la columna hasta que la sílice se observó transparente. En un vaso de precipitado previamente pesado se solubilizó 0.1 g de hidrocarburos sin asfaltenos en 15 ml de hexano. Esta solución se vertió en la columna y se colectaron las muestras en viales a peso constante.

7.10.6. Eluciones en las columnas

La separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos se basa en su diferente solubilidad en cada uno de los solventes (Tabla 4), las eluciones fueron de 15 ml y se realizaron en el orden siguiente utilizando viales:

Tabla 4. Solventes y observaciones en la separación de las diferentes fracciones de hidrocarburos.

Solventes	Observaciones en la separación de fracciones
Hexano	Se depositó la muestra en la parte superior de la columna y se colectó la fracción hasta que la mancha amarilla observada alcanzó la parte inferior de la columna.
Tolueno-Hexano	Cuando la mezcla presente coloración amarilla. Se realiza una sola elución.
Tolueno	Hasta que la mancha amarilla abandone por completo la columna.
Tolueno-Metanol	Cuando la mezcla se observe oscura, ya que está eluyendo los HAP. Se realiza una sola elución.
Acetona-Metanol	Elución con la mezcla hasta que abandone por completo todos los HAP. Se realiza una sola elución.





La primera fracción con el solvente *hexano* corresponde a los hidrocarburos alifáticos. Las fracciones con la mezcla *tolueno-hexano* y *tolueno*, se consideraron como los hidrocarburos aromáticos. Las dos últimas fracciones con las mezclas de *tolueno-metanol* y *acetona-metanol* contienen a los hidrocarburos polares. Los viales se evaporaron bajo campana de extracción y se colocaron en el desecador por 24 h, posteriormente se pesaron para el cálculo de cada fracción (Díaz-Ramírez, 2000).





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN





A continuación se presentan los resultados obtenidos en las diferentes etapas durante el estudio. Durante el experimento de fitorremediación se analizó el efecto de la adición de un consorcio microbiano aislado de la rizósfera de *C. laxus* sobre el crecimiento de *C. ligularis*, la remoción de los hidrocarburos, los microorganismos rizosféricos y la sorción de hidrocarburos en las raíces.

8.1. Crecimiento de la planta durante la fitorremediación

Durante la cinética de fitorremediación se determinaron las siguientes variables de crecimiento: biomasa seca aérea y radicular y tasa de crecimiento aérea y radicular, en ambos tratamientos: plantas no inoculadas e inoculadas. Es importante mencionar que durante el experimento se presentó mortalidad en las plantas inoculadas, siendo ésta del 27%.

8.1.1. Biomasa seca

En la Figura 8 se muestra la producción de biomasa seca aérea (Figura 8a) y biomasa seca radicular (Figura 8b) durante los 90 días de cultivo.

Los valores máximos de biomasa seca aérea y radicular para las plantas no inoculadas fueron de 1.50 y 0.08 g a los 90 días de cultivo, respectivamente, presentándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) [ver *anexo*]. Estos valores fueron 1.24 y 1.31 veces más altos que los obtenidos para las plantas inoculadas encontrando diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para este tratamiento [ver *anexo*]. Se sabe que diversos microorganismos ejercen un efecto benéfico sobre las plantas, pero también pueden ser dañinos o no presentar efecto en éstas.



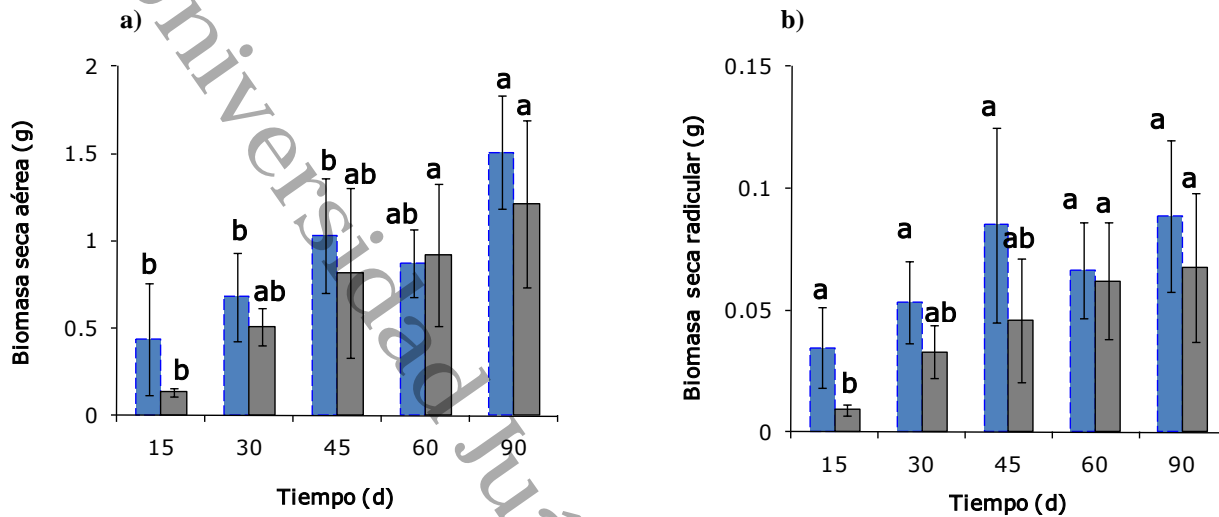


Figura 8. Biomasa seca aérea (a) y biomasa seca radicular (b) durante la fitorremediación (■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Los resultados de esta investigación son congruentes a los encontrados en otras investigaciones, Fernet, (2008) utilizó dos especies de plantas *Lolium perenne* y *Festuca rubra*, obtuvo que con *L. perenne* no se observó un aumento en la biomasa de la raíz y brotes cuando se inoculó con *Sphingomonas yanokuyae*. Por otro lado, Rabie, (2005) probó tres especies de plantas: trigo (*Triticum aestivum* cv. *Sakha 8*), frijol (*Vigna radiata* V 2010) y berenjena (*Solanum melongena* L.) para evaluar el efecto de la adición de un inóculo del hongo micorrízico *Glomus moseae* en suelo contaminado y no contaminado con HTP. Los resultados mostraron que el peso seco del trigo se redujo de 1.24 a 0.93 g en un suelo contaminado comparado con el suelo sin contaminar.

8.1.2. Tasa de crecimiento

En la Figura 9 se muestra la tasa de crecimiento aérea (Figura 9a) y radicular (Figura 9b). La mayor tasa de crecimiento aérea y radicular en las plantas no inoculadas se observó a los 15 días siendo de 0.26 cm d^{-1} y 0.05 cm d^{-1} , estos valores fueron 4 y 0.96 veces más





altos en comparación para las plantas inoculadas disminuyendo considerablemente a los 90 días (0.09 cm d^{-1}). Con respecto al tiempo, la tasa de crecimiento aérea no mostraron diferencias estadísticas significativas ($p > 0.05$), en cambio con la tasa de crecimiento radicular se presentaron diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) [ver anexo]. En esta última se observaron valores de 5 y 7 veces más bajos al final de la cinética de fitorremediación para ambos tratamientos, respectivamente.

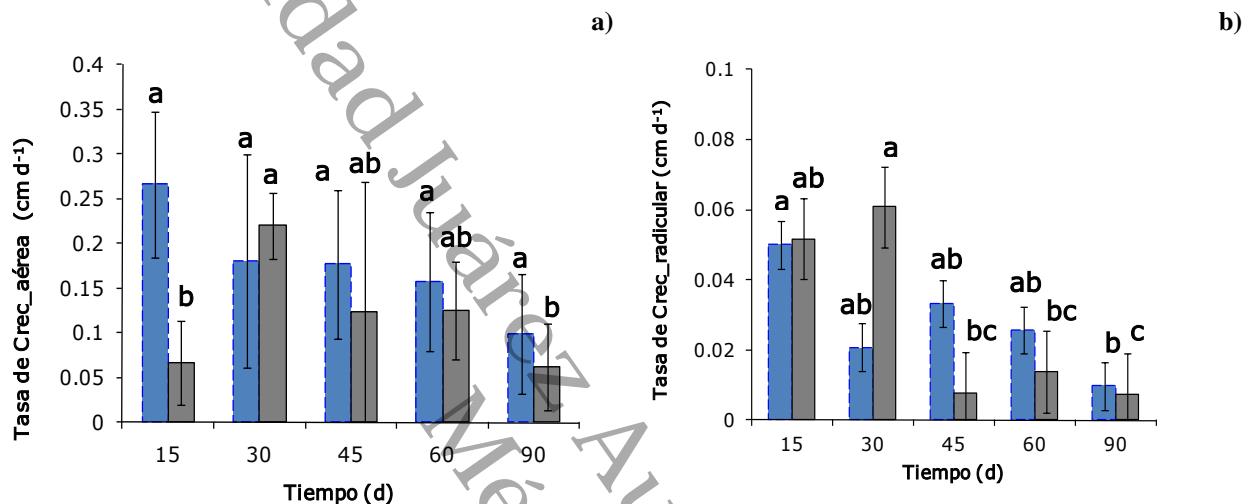


Figura 9. Tasa de crecimiento aérea (a) y tasa de crecimiento radicular (b) durante la fitorremediación (■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas). Letras diferentes indican diferencias estadísticas significativas.

Estos resultados muestran que la adición del inóculo no mejoró el crecimiento de *C. ligularis*, sin embargo se observó un ligero efecto de la inoculación en la parte radicular. Esta tendencia es posible debido a que los inóculos deben competir con la microflora autóctona que está mejor adaptada a las condiciones de crecimiento edáfico y climatológicas particulares o también porque el inóculo puede contener rizobacterias que influyen negativamente en el crecimiento y la fisiología de la planta. Este hecho es coincidente con el trabajo de Al-Zalzaleh *et al.*, (2009) los cuales realizaron dos experimentos para evaluar el efecto de la inoculación de hongos formadores de micorriza arbuscular vesicular (VAM) sobre la altura de plantas ornamentales. Las especies de plantas seleccionadas para el experimento I fueron: *Prosopis chilensis*, *Ficus infectoria* y *Conocarpus lancifolia*. Para el experimento II: *Acacia acuminata*, *Parkinsonia aculeata*,





Prosopis spicigera, *Nerium oleander* y, *Vitex negundo* en dos tipos de suelos: biorremediado y agrícola. En el experimento I a los 210, 270 y 360 días la altura de las plantas fue significativamente mayor en los tratamientos sin inóculo en todas las especies estudiadas. En el experimento II sólo *V. migundo* mostró la altura más baja.

8.2. Remoción de hidrocarburos

8.2.1. Hidrocarburos residuales

Durante la cinética de fitorremediación se cuantificaron los hidrocarburos residuales por el método gravimétrico (mg de HTP kg^{-1} de agrolita seca) y se calculó la tasa de remoción (mg de HTP removidos g^{-1} de agrolita seca d^{-1}). La persistencia del petróleo depende de la cantidad y calidad de la mezcla de hidrocarburos y las propiedades de los ecosistemas afectados. En el medio ambiente los hidrocarburos del petróleo pueden persistir indefinidamente, mientras que en otras condiciones los mismos hidrocarburos puede ser completamente biodegradados en un lapso de pocas horas o días (Atlas, 1981). En la Figura 10 se muestran los valores obtenidos para cada uno de los tratamientos. A los 15 días de iniciada la cinética se observó una disminución en todos los tratamientos, siendo mayor para las plantas inoculadas, posteriormente los valores se mantuvieron constantes hasta los 90 días con una concentración promedio de hidrocarburos residuales de 19,000 mg de HTP kg^{-1} de agrolita seca, exceptuando las plantas inoculadas en donde la concentración disminuyó a 12,500 mg de HTP kg^{-1} de agrolita seca. El análisis de ANOVA simple para la concentración de hidrocarburos residuales mostró diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) a los 15 y 90 días [*ver anexo*].



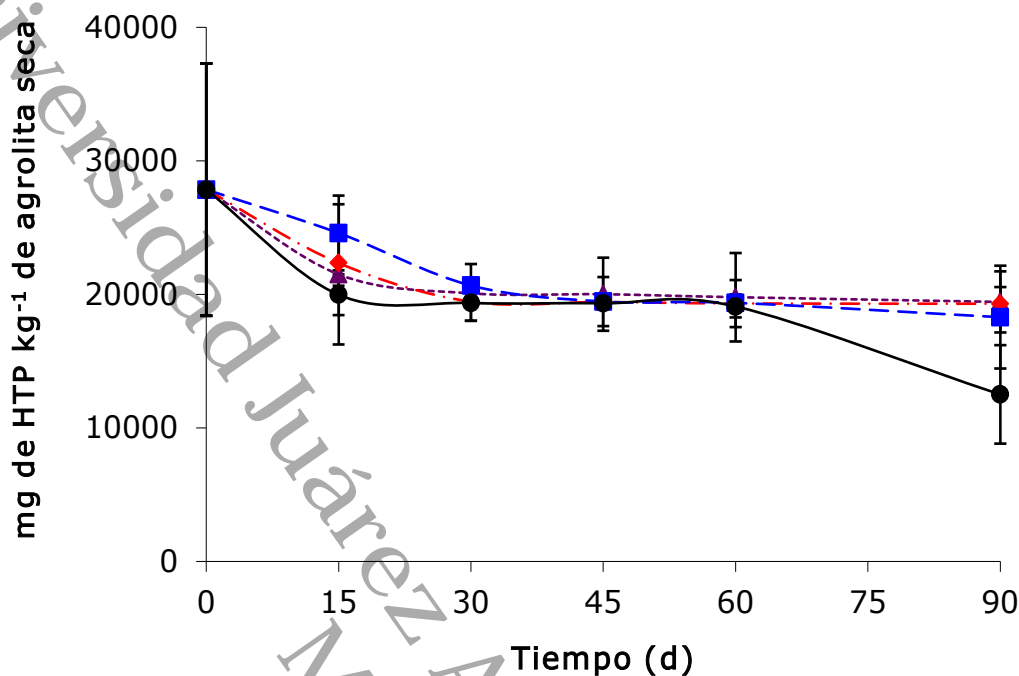


Figura 10. Concentración de hidrocarburos residuales en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (—▲— control; —◆— control con inóculo; —■— plantas no inoculadas; —●— plantas inoculadas).

Al final del cultivo, la menor remoción de HTP fue del 30%, en los tratamientos sin planta (controles), mientras que en los tratamientos con planta la remoción fue 34% para las no inoculadas y del 55% para las inoculadas. Estos resultados indican que la presencia de las plantas mejoró la remoción de hidrocarburos, considerando que la degradación de los hidrocarburos fue estimulada por las raíces de las plantas. Según Macek *et al.*, (2000) las interacciones entre las plantas y los microorganismos de la rizósfera son complejas y en algunos casos han evolucionado al beneficio mutuo de ambos organismos. Esta relación sinérgica es responsable de acelerar la degradación de los contaminantes del suelo en presencia de las plantas. Además de este efecto rizósfera, las plantas pueden captar o sorber una amplia gama de compuestos orgánicos del suelo a través de sus raíces. Este hecho es coincidente con el trabajo de Gaskin, (2008) probó tres especies por separado (*Brachiaria*





decumbens, *Cymbopogon ambiguus*, y *Microlaenas stipoides*) y realizó una prueba multiespecie (*B. decumbens* más *C. ambiguus*) mostrando que la concentración residual de HTP (10,000 mg kg⁻¹ inicial) fue significativamente menor en presencia de plantas que sin planta. A los 100 días después de la siembra (DDS) la concentración residual de HTP fue significativamente menor con *B. decumbens* (4,510±506 mg kg⁻¹) comparado con un suelo sin planta (5,966±546 mg kg⁻¹) esto corresponde a un 49% de remoción comparado con el 33% en el suelo sin planta. *C. ambiguus* la concentración residual de HTP fue significativamente menor (1,132 ± 550 mg kg⁻¹) que en el suelo sin planta (4,743 ± 334 mg kg⁻¹) esto corresponde al 88% en presencia del pasto. Para *M. stipoides* la concentración residual de HTP fue significativamente menor (1,781±455 mg kg⁻¹) que en un suelo sin planta (4,363 ± 411 mg kg⁻¹). *M. stipoides* presentó una remoción de HTP del 80% en la primera mitad del experimento (55 DDS). En la prueba multiespecie se obtuvo una máxima remoción del 85% a los 100 DDS teniendo una concentración promedio de 1,353 ± 474 mg kg⁻¹ en el suelo de la rizósfera comparado en un suelo sin planta (4,085 ± 612 mg kg⁻¹).

Otros estudios han tenido éxito similar a la presente investigación, en la remoción de hidrocarburos usando inóculos, Castro-Carillo *et al.*, (2008) estudiaron la remoción de fenantreno (FEN) por el helecho *Azolla caroliniana*, posteriormente, fue expuesta a tres concentraciones de FEN: 20, 40 y 60 mg L⁻¹ de solución nutritiva de Yoshida, inoculada con el complejo microbiano *Bacillus stearothermophilus* y *Oscillatoria sp.* (BST+OSC). La menor remoción de FEN (45%) se observó en *A. caroliniana* sin BST+OSC con 20 mg L⁻¹ FEN; en contraste, la mayor remoción (80%) se presentó en *A. caroliniana* inoculada y/o sin inocular en presencia de 60 mg L⁻¹ FEN.

Por otra parte, Huang *et al.*, (2005) probaron la efectividad de un sistema de multiproceso de fitorremediación (MPPS, por sus siglas en inglés) compuesto por biolabranza, biorremediación y fitorremediación con alta festuca (*Festuca arundinacea*) para la remoción de HTP en suelos contaminados con 50 g kg⁻¹ de lodos de refinería de petróleo. Los HTP en el suelo removido por el MPPS disminuyeron de 50 a 23 g kg⁻¹ (más del 50% de remoción) en un periodo de crecimiento de 4 meses. En un segundo periodo de 4 meses, MPSS removió 40% adicional de la cantidad original HTP del suelo. Así, en un período de





8 meses, el MPPS había removido aproximadamente el 90 % de los HTP en el suelo. Muratova *et al.*, (2003) realizaron un estudio durante dos años de aplicación de fitorremediación en suelos contaminados con 79.8 mg kg⁻¹ de HAP con dos especies de plantas alfalfa (*Medicago Sativa*) y caña (*Phragmites australis*), siendo la remoción para *M. sativa* de 68.7% y para *P. australis* alcanzando 74.5%. Shirdam *et al.*, (2009) evaluaron el potencial de fitorremediación de dos especies de plantas: zarza ardiente (*Kochia scoparia* (L.) Schard) y lino (*Linum usitatissimum* L.) a una concentración de 40,000 mg kg⁻¹ HTP en un suelo altamente contaminado (80%) más turba como fertilizante (20%). La mejor y mayor remoción se registró para el lino de 87.63% removiendo más de 35,000 mg kg⁻¹ HTP y para la zarza ardiente de 65.29% removiendo más de 16,000 mg kg⁻¹ HTP en comparación con la concentración inicial.

8.2.2. Tasa de remoción de hidrocarburos

En la Figura 11 se muestra la tasa de remoción de hidrocarburos de cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación. El máximo valor de la tasa de remoción de HTP se obtuvo a los 15 días por plantas inoculadas (0.47 mg de HTP removidos g⁻¹ de agrolita seca d⁻¹), este valor fue 2.2 veces mayor que para las plantas no inoculadas (0.21 mg de HTP removidos g⁻¹ de agrolita seca d⁻¹). En todos los tratamientos la tasa de remoción disminuyó a los 30 días durante el tiempo del experimento hasta alcanzar en promedio 0.1 mg de HTP removidos g⁻¹ de agrolita seca d⁻¹ a los 90 días del cultivo. La relación entre las plantas y microorganismos es favorable para la degradación de los hidrocarburos ya que estos disminuyen debido a los microorganismos presentes en la rizósfera, o bien mediante la modificación a través de la excreción de exudados de las raíces durante el proceso de rizodegradación (Teng *et al.*, 2011). También puede ser por la naturaleza compleja de los compuestos del petróleo, la mayoría de los microorganismos del suelo no pueden crecer en su presencia, aunque existe una tolerancia microbiana, esto induce a la selectividad y disminución de la biodiversidad (Pérez-Silva *et al.*, 2008). El análisis de ANOVA simple presentó diferencia altamente significativa (p<0.001) a los 15 y 90 días [*ver anexo*]. La tasa





de degradación de hidrocarburos de petróleo es mayor en la rizósfera por el incremento de la actividad microbiana fomentada por la secreción de enzimas liberadas por las raíces de la planta, así, como la liberación de compuestos de carbono y nitrógeno, la acumulación de nutrientes disponibles y la oxigenación en las raíces. Según Madueño *et al.*, (2009) algunos autores han encontrado que la inoculación produce un aumento en la velocidad de biodegradación y reduce los tiempos del proceso de biorremediación de los HAP de bajo peso molecular.

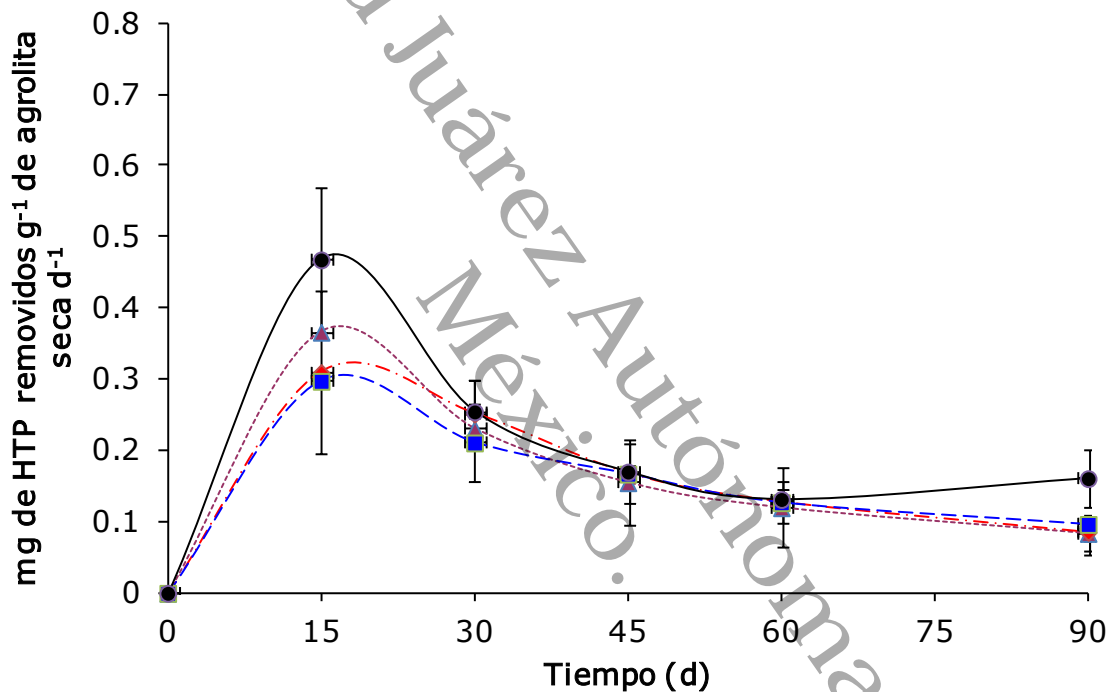


Figura 11. Tasa de remoción de hidrocarburos en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (—▲— control —◆— control con inóculo —■— plantas no inoculadas; —●— plantas inoculadas).

Otros estudios han encontrado resultados similares a esta investigación, Zand *et al.*, (2010) evaluaron la eficiencia de fitorremediación de tres especies de plantas zarza ardiente (*Kochia scoparia* (L.) Schard), lino (*Linum usitatissimum* L.) y alta festuca (*Festuca arundinacea*) en un suelo contaminado ($34,358 \pm 1,633$ mg kg⁻¹ HTP) con fertilizante y sin fertilizante a los 30, 60 y 120 días. Encontraron que la mayor tasa de remoción fue 473.8





mg kg⁻¹ HTP d⁻¹, obtenida por *F. arundinacea* a los primeros 30 días. La tasa más baja se obtuvo a los 120 días (133.7 mg kg⁻¹ HTP d⁻¹). Jing *et al.*, (2008) realizaron un estudio sobre el efecto rizósfera con tres especies de gramíneas: pasto guinea (*Panicum*), hierba blanca (*Eleusine indica* (L.) Gaerth) y *alta festuca* (*Festuca arundinacea*). Después de un período de 150 días, con un suelo contaminado con 5,000 mg kg⁻¹ encontraron que la rizósfera de estas tres especies aceleró la degradación de hidrocarburos de petróleo en diferentes grados. En un suelo sin planta, la degradación de hidrocarburos de petróleo fue sólo el 10%. Pero la degradación de los hidrocarburos de petróleo alcanzó un 30-40% en el suelo con planta, tres veces mayor que en el suelo sin planta. En esta investigación se obtuvieron valores similares con un nivel de concentración ($\approx 30,000$ ppm) en un suelo con planta, siendo seis veces más alto. Liu *et al.*, (2004) determinaron que durante los 90 días del periodo de crecimiento la tasa de degradación de benzo(α)pireno en concentraciones de 1, 10 y 100 mg kg⁻¹ con alfalfa inoculadas con *Glomus caledonium* fue 86, 87 y 57%, respectivamente; mientras que un suelo sin planta fue 53, 53 y 33%, respectivamente.

8.2.3. Remoción de las fracciones de hidrocarburos

Los hidrocarburos residuales se dividieron en fracciones mediante el método de cromatografía en columna, los resultados se muestran en la Figura 12. De las fracciones de hidrocarburos, los alifáticos presentaron la mayor remoción a los 90 días para los tratamientos con plantas siendo de 9%. En cuanto a las fracciones restantes se observó una tendencia similar. El análisis de varianza factorial de los factores fracciones-días-planta presentó diferencias altamente significativas en el factor fracciones ($p < 0.001$) a los 15 y 90 días. En el factor días presentó un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.01$) y en los factores planta e interacciones no se mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) [ver anexo]. Debido a la complejidad de la composición del petróleo, la biodegradación por parte de los microorganismos dependerá de las proporciones que tenga cada una de sus fracciones. El riesgo asociado a un contaminante presente en el ambiente no depende únicamente de su concentración total, sino principalmente de la fracción que





está disponible y la cual puede ser asimilada y causar algún efecto en los organismos (Díaz *et al.*, 2010). La fracción de hidrocarburos alifáticos es degradada más fácilmente que las fracciones de hidrocarburos aromáticos y polares extraídas del suelo. Esto es lógico debido a que la fracción alifática está formada principalmente por *n*-alcanos, que son fácilmente metabolizados por los microorganismos utilizándolo como fuente de carbono dificultándose a medida que ramificaciones y anillos se incorporan en su estructura. Debido a las características toxicológicas de la fracción aromática, especialmente los compuestos policíclicos recalcitrantes debido a su tendencia de bioacumulación como fluoranteno, benzo(α)pireno, criseno, pireno. Se realizó un ANOVA simple para esta fracción a los 0 y 15 días de cultivo encontrándose diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), [ver anexo] estos resultados muestran que la presencia de las plantas mejoró la remoción de esta fracción en un 22%, comparada con la inicial de 32%. En la rizósfera, los microorganismos ofrecen protección externa a la planta, a su vez, se benefician de los exudados de las raíces y de la adición del oxígeno de la misma. Es aquí donde la asociación planta-microorganismos desempeña un papel importante en la captación de los hidrocarburos más disponibles para la sorción y biodegradación por la planta. Además, cuando los contaminantes orgánicos llegan al suelo, éste reduce principalmente su movilidad de dos maneras: por sorción y por degradación química o biológica (Díaz *et al.*, 2010).



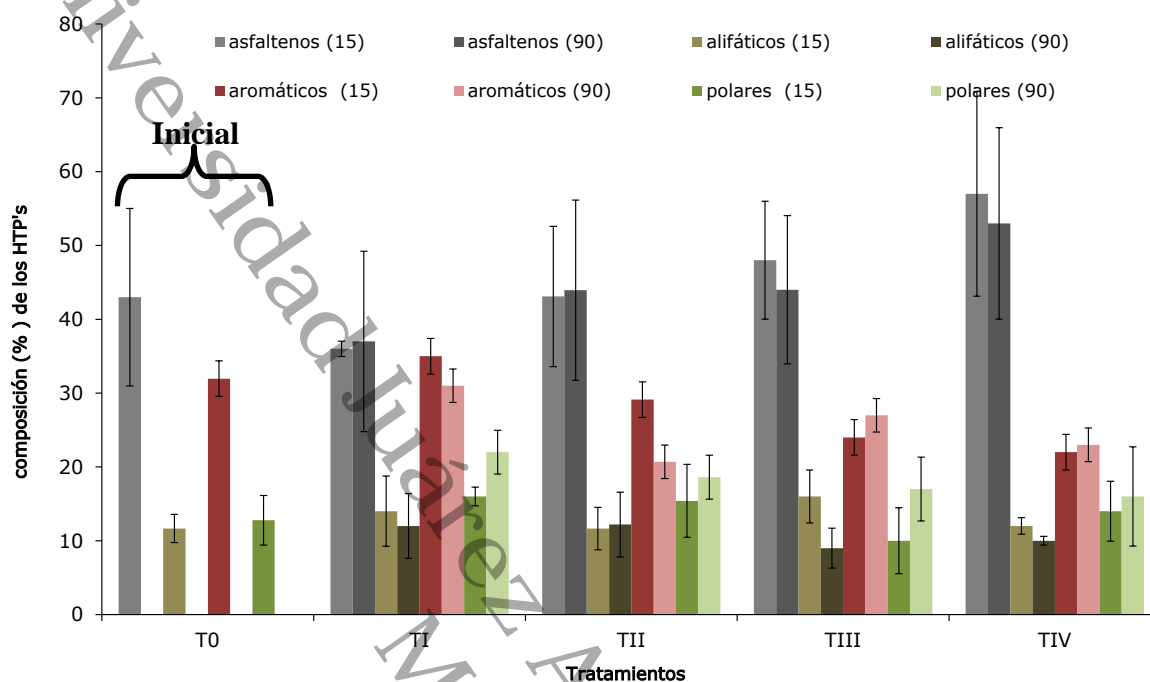


Figura 12. Composición (%) de los HTP's durante la cinética de fitorremediación a los 15 y 90 días de cultivo. T0: concentración inicial; T1: control; T2: control con inóculo; T3: plantas no inoculadas; T4: plantas inoculadas.

Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores, Diab *et al.*, (2008) mostraron que la rizósfera de *Vicia faba* fue capaz de reducir en mayor proporción las fracciones saturada (47.0%) y aromáticos (26.2%), en comparación con la rizósfera de *Zea mays* (37.4% y 8.2%) y de *Triticum aestivum* (33.2% y 3.9%) en una concentración inicial de 2.2-2.3% p/p de suelo. También encontraron que el 5.3% de la fracción resinas o polares fue degradada en la rizósfera de *V. faba*. Además que la fracción de asfalténos recalcitrantes se redujo 3,6% en la rizósfera de *T. aestivum* y 1,9% en la rizósfera de *V. faba*. Cai *et al.*, (2010) reportaron que la presencia de *Impatiens balsamina* L mejoró significativamente la biodegradación de los hidrocarburos saturados en comparación con los suelos sin planta. Los aromáticos fueron fácilmente más biodegradados comparados con





las fracciones de asfaltenos y polares. El cambio más notable que observaron fue el aumento de la precipitación de asfaltenos y la fracción de polares en suelo con planta (7,8% y 2,4%, respectivamente). Según estos autores se ha reportado que un 15-20% de la biodegradación máxima de las fracciones de asfaltenos y polares podrían producirse en cultivos óptimos. Resultados de Diab y Brady, (2011) encontraron que la fracción saturada en la rizósfera de *Tamarix naltica* se redujo en un 87.5%, mientras que los aromáticos se redujeron en un 60.7% en comparación con un suelo sin planta en una concentración inicial de 2.25% (p/p) de suelo. Las fracciones no degradables de asfaltenos y resinas disminuyeron en la rizósfera en un 1 y 2.5%, respectivamente.

8.2.4. Sorción de hidrocarburos en raíces

Los hidrocarburos en las raíces fueron extraídos mediante el método Soxhlet, aún con ser un método gravimétrico, estos no pudieron ser cuantificados debido a que el solvente también extrae otros compuestos de carácter lipídico que se encuentran en la composición de las raíces; de tal forma que la determinación fue solamente cualitativa. Las plantas pueden estar expuestas a los contaminantes de diferentes maneras, éstos pueden entrar en las raíces de las plantas por procesos pasivos o activos, y luego pasar a otros tejidos de la planta. En la Figura 13 se presentan los extractos de las raíces de plantas inoculadas y no inoculadas, puede observarse que a los 30 días el color del extracto de raíces es café, indicando una mayor sorción de hidrocarburos en plantas inoculadas, mientras que esto mismo se observó a los 45 días en las plantas no inoculadas. En concordancia con estas observaciones, Escalante-Espinosa, (2005b) reportó que la sorción de hidrocarburos por las raíces de la planta *C. laxus* inoculadas y no inoculadas fue 15% y 17%, respectivamente del contenido de hidrocarburo inicial (5 g HTP kg⁻¹ de suelo seco). Otro estudio realizado por Zurita-Cruz, (2012), también con *Cyperus laxus* utilizando hidrocarburos modelo (hexadecano, fenantreno y pireno) reportó la sorción de los tres hidrocarburos, siendo mayor para el pireno alcanzando una concentración máxima de 1,606 mg kg⁻¹ de raíz seca en siete días de cultivo con una concentración inicial de 2,000 mg kg⁻¹.



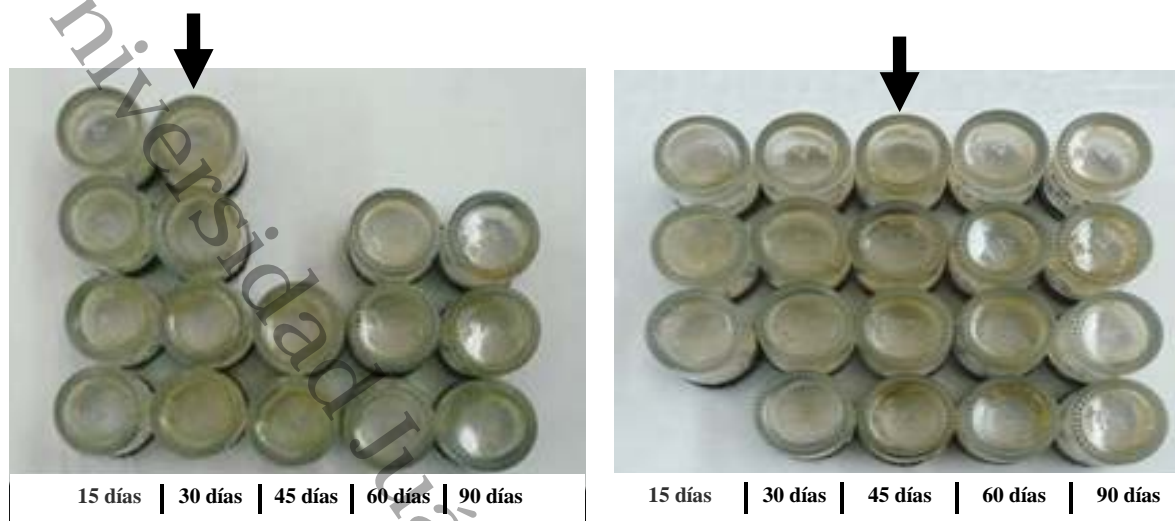


Figura 13. Coloración de extractos de raíces de *C. ligularis* durante la cinética de fitorremediación para plantas inoculadas (a) y no inoculadas (b).

En términos generales, los hidrocarburos del petróleo son compuestos intermedios entre más móviles en el ambiente, son también los más fácilmente biodegradados y difícilmente biodegradables (Martín-Moreno *et al.*, 2004; Pardo-Castro *et al.*, 2004). La mayoría de los microorganismos se especializan en degradar una sola familia de hidrocarburos, si bien algunos poseen enzimas para degradar tanto alifáticos como aromáticos (Otoniel-Rojas *et al.*, 2005). Según Maldonado-Chávez *et al.*, (2010) la combinación planta-microorganismos muestra que la inoculación favorece la degradación de los hidrocarburos debido a que es mayor en presencia de las raíces de las plantas porque el metabolismo y cometabolismo de los hidrocarburos se ve mejorada en la zona de la rizósfera.

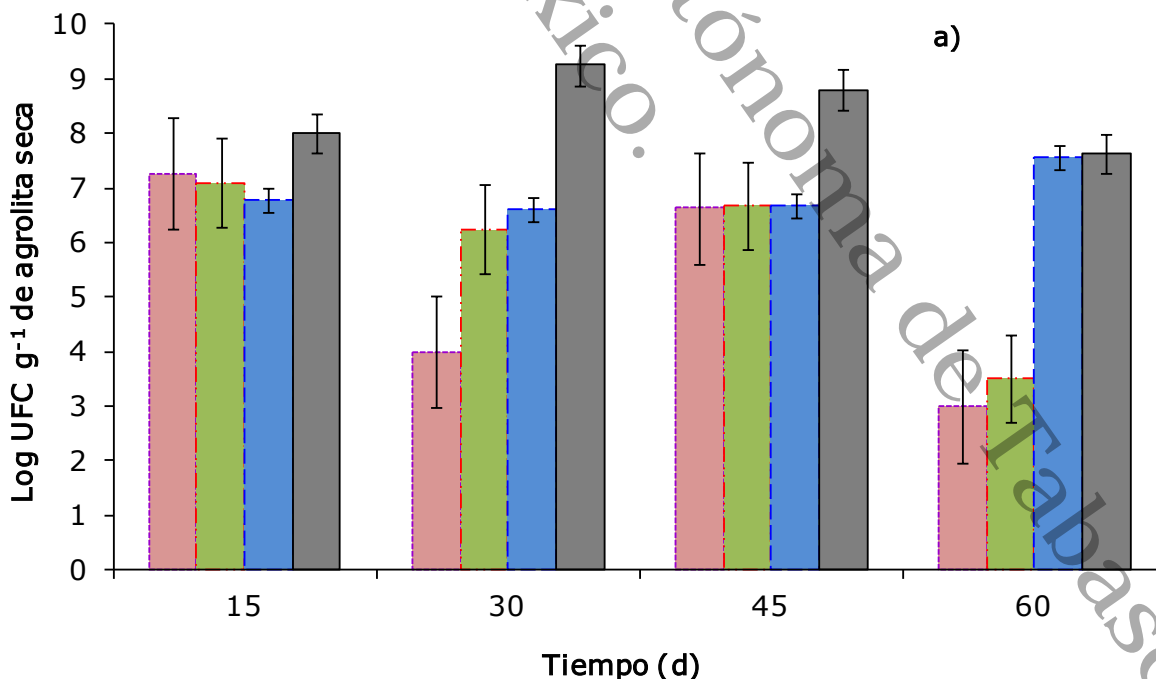
8.3. Microorganismos rizosféricos

Con la finalidad de evaluar el crecimiento de los microorganismos heterotróficos totales durante la cinética de fitorremediación se realizó el método de conteo en placa. Los microorganismos asociados a las raíces difieren de los del suelo, en consecuencia, la actividad microbiana rizosférica será diferente de la del suelo no rizosférico. En la Figura



14 se muestran los resultados de conteo total tanto para bacterias (Figura 14a) como para hongos (Figura 14b).

En ambos tratamientos con plantas, se observó que las mayores poblaciones de bacterias se presentaron a los 30 días en las plantas inoculadas (10^9 UFC g^{-1} de agrolita seca). Para las plantas no inoculadas fue de 10^7 UFC g^{-1} de agrolita seca a los 60 días. El número de bacterias fue menor en los tratamientos sin plantas (suelos no rizosféricos, controles). Estos resultados reflejan que la población de bacterias disminuyó con el tiempo tal vez debido a la baja disponibilidad de la fuente de carbono (hidrocarburos) lo que se evidenció con una disminución en el número de microorganismos. El análisis de varianza factorial de los factores (planta-días-inóculo) para la población de bacterias presentó diferencias altamente significativas en el factor planta ($p < 0.001$), mientras que en los otros dos factores se sugiere un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.01$). En las interacciones (días-planta y días-inóculo) presentó diferencias significativas ($p < 0.05$), mientras que en las demás interacciones no presentó efectos ($p > 0.05$) [ver anexo].



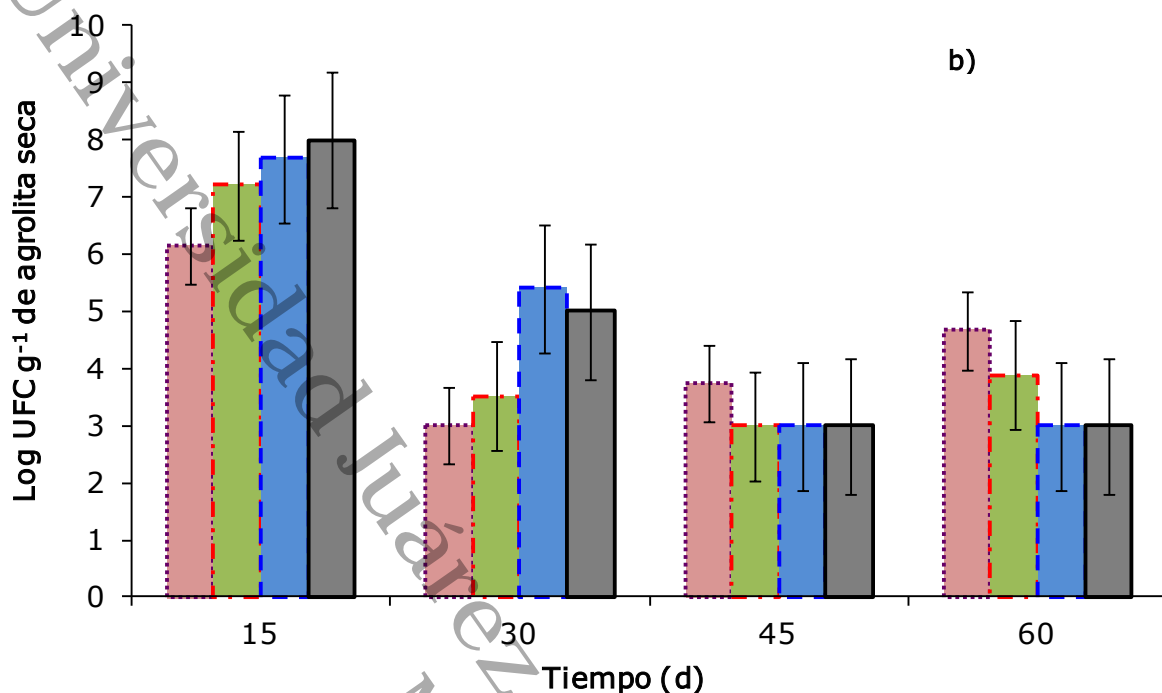


Figura 14. Cuentas totales de microorganismos (UFC g⁻¹ de agrolita seca): Bacterias (a) y hongos (b) en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (■ control; ■ control con inóculo; ■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).

El mayor número de hongos se obtuvo en las plantas inoculadas (10^8 UFC g⁻¹ de agrolita seca) a los 15 días. A partir de los 30 días la población de hongos disminuyó drásticamente en todos los tratamientos. Rivera-Cruz *et al.*, (2004b) mencionan que algunas especies de hongos llegan a ser abundantes inmediatamente después de agregar la fuente de carbono, pero disminuye poco tiempo después del incremento inicial; lo que es causado por la mayor disponibilidad de sustratos de carbono oxidado. Otros factores que podrían influir serían la ausencia de bacterias para establecer relaciones de parasitismo y depredación; o que probablemente la población se encontraba en la fase de muerte de su ciclo de crecimiento. El análisis factorial mostró diferencias altamente significativas ($p < 0.001$) con respecto al factor días. En el factor inóculo no hubo diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$) y en el factor planta se sugiere un efecto significativo ($p < 0.01$). Con respecto a las



interacciones (días-planta) se presentó un efecto altamente significativo ($p < 0.001$), mientras que en las otras interacciones no se presentaron efectos ($p > 0.05$) [**ver anexo**]. Otros estudios han encontrado resultados similares a esta investigación, Diab y Badry, (2011) indicaron que el suelo de la rizósfera con *Tamarix nilotica* presentó mayor número de bacterias heterótrofas totales y degradadores de petróleo. Mostraron que en el suelo rizósfera tuvo 30.6×10^6 UFC g^{-1} de bacterias, para hongos 4.02×10^2 UFC g^{-1} y bacterias degradadoras de hidrocarburos de 9.4×10^6 UFC g^{-1} , en contraste en un suelo no rizosférico (40.2×10^4 UFC g^{-1} bacterias, 2.4×10^2 UFC g^{-1} hongos y 18.3×10^3 UFC g^{-1} de bacterias degradadoras de hidrocarburos, respectivamente). El porcentaje de las bacterias degradadoras de hidrocarburos fue más alto en un suelo rizosférico (30.7%) comparado con un suelo no rizosférico (4.6%). Otros datos obtenidos por Diab y Sandouka, (2010) mostraron que el recuento de los números de actinomicetos (10^6 UFC g^{-1} suelo) y de hongos (10^4 UFC g^{-1} suelo) en el suelo de la rizósfera, al final de 180 días de cultivo de la planta *Cyperus conglomeratus* descendió de 4.7 y 28.4 UFC g^{-1} de suelo (tiempo 0) a 1.1 y 18.4 UFC g^{-1} de suelo, respectivamente. En el suelo no rizósfera se registró la misma tendencia en la cuenta de actinomicetos y hongos disminuyó. Rivera Cruz *et al.*, (2004b) evaluaron la limpieza de un suelo contaminado de petróleo usando el pasto alemán (*Echinochloa polystachya*) con tres concentraciones (98, 50, 100,000 mg kg^{-1} HTP, sin microorganismos, con bacterias (CT11, CT16, CT26 y AT4), con hongos (*Trichoderma* sp y *Paecilomyces* sp,) y con asociación bacterias-hongos. Encontraron que las poblaciones individuales de bacterias y hongos incrementaron en la concentraciones de 50,000 mg kg^{-1} HTP a los 60 días en el suelo de la rizósfera siendo de 12×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco y de 170×10^3 UFC g^{-1} suelo, respectivamente. La población de las bacterias en asociación con los hongos fue mayor a los 60 días de 80×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco en el suelo rizosférico contaminado con 100,000 mg kg^{-1} HTP, y a los 120 días las poblaciones más grandes fueron de 50×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco en la concentración de 50,000 mg kg^{-1} HTP. En las poblaciones de hongos asociadas con bacterias a los 120 días en la concentración de 50,000 mg kg^{-1} HTP fue de 5×10^6 UFC g^{-1} de suelo seco de suelo rizosférico, en comparación al suelo sin rizósfera.





Para demostrar que el inóculo mantiene su actividad degradadora, al final del cultivo se determinaron los microorganismos degradadores de hidrocarburos mediante el método del número más probable (NMP). Este método puede dar información muy importante del número de microorganismos que son capaces de crecer sobre un medio específico. Una limitación que presenta esta técnica es que sólo alrededor del 1 al 15% de los microorganismos pueden ser cultivados (Martínez-Gutiérrez, 2004). Los resultados obtenidos en esta prueba son referidos a tablas de probabilidad, obteniéndose el número más probable de microorganismos degradadores de hidrocarburos. En la Figura 15 se muestra el número de microorganismos degradadores durante la cinética de fitorremediación. El mayor número de degradadores se observó para plantas inoculadas a los 15 días (1.5×10^{10} degradadores g^{-1} de agrolita seca), a partir de los 30 días se observó una ligera disminución permaneciendo el valor constante hasta el final de la cinética. En los demás tratamientos el número de degradadores permaneció casi constante hasta los 90 días de la cinética. El análisis de varianza factorial de los tres factores evaluados indicó que existe un efecto altamente significativo en el factor días ($p < 0.001$), en tanto, que para el factor inóculo no hay un efecto significativo ($p > 0.05$), mientras que en el factor planta hay un efecto estadístico significativo ($p < 0.05$). En las interacciones (días-planta) presentó un efecto altamente significativo ($p < 0.001$), mientras que en las demás interacciones no se presentaron efectos ($p > 0.05$) [*ver anexo*]. Dichos resultados indican que en las plantas inoculadas, el número de microorganismos degradadores fue ligeramente mayor que en plantas no inoculadas. Debido a que los microorganismos fueron favorecidos por la presencia de la planta. Estos resultados muestran que el efecto rizósfera estimuló el incremento de la población de los microorganismos.



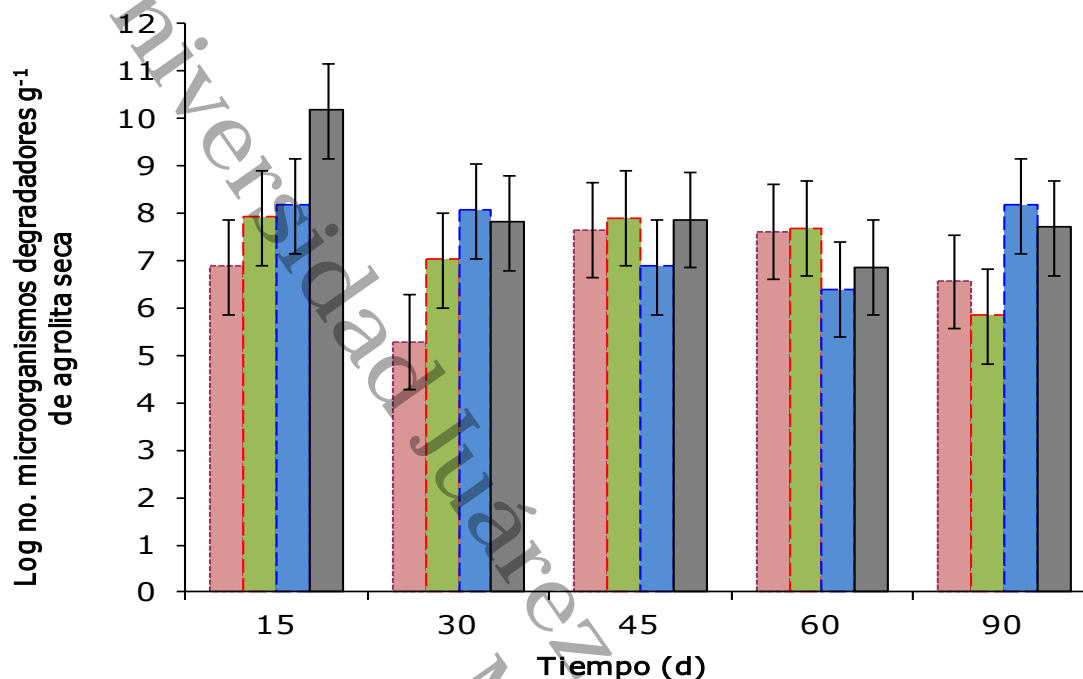


Figura 15. Microorganismos degradadores de hidrocarburos (degradadores g⁻¹ de agrolita seca) en cada tratamiento durante la cinética de fitorremediación (■ control; ■ control con inóculo; ■ plantas no inoculadas; ■ plantas inoculadas).

En concordancia con los resultados de este estudio, Teng *et al.*, (2011) reportaron que el número de microorganismos degradadores con alfalfa (*Medicago sativa* L) inoculadas y no inoculadas con *Rhizobium meliloti* en una concentración de 10, 124 µg kg⁻¹HAP durante 90 días de cultivo en plantas inoculadas fue $1.42 \pm 0.30 \times 10^3$ NMP g⁻¹ de suelo seco y para plantas no inoculadas $0.61 \pm 0.03 \times 10^3$ NMP g⁻¹ de suelo seco en comparación con las del control. Mathur *et al.*, (2010) utilizaron tres especies de plantas *Terminalia arjuna*, *Anogeniessus latifolia* y *Tecomella undulata* en un suelo del desierto contaminado con 2.5-2.6% de aceite de petróleo crudo. Determinaron que durante los 90 días del periodo de crecimiento el mayor número de microorganismos degradadores en presencia de *T. arjuna*, *A. latifolia* y *T. undulata* para un suelo contaminado fueron $196 \pm 8.9 \times 10^8$, $166.4 \pm 5.2 \times 10^8$ y $29.8 \pm 0.6 \times 10^7$ NMP g⁻¹ suelo, respectivamente, y para un suelo no contaminado





$32.3 \pm 2.5 \times 10^5$, $27.4 \pm 2.8 \times 10^5$ y $3.7 \pm 0.8 \times 10^5$ NMP g^{-1} suelo, respectivamente, en comparación de un suelo sin vegetación. Las plantas y microorganismos logran la degradación independientemente o a través de interacciones conjuntas, tales como el efecto rizósfera. La zona del suelo está estrechamente relacionada con la raíz de la planta, ésta tiene un mayor número de microorganismos metabólicamente activos que la mayor parte de los alrededores del suelo. La raíz de la planta libera compuestos incluyendo azúcares simples, aminoácidos, enzimas, alifáticos, y aromáticos que fomentan el crecimiento de las poblaciones microbianas específicas. La interacción planta-microorganismos es compleja y la responsable de la degradación en presencia de la planta (Macek *et al.*, 2000) y debe mejorar considerablemente la tasa global de remediación, especialmente en condiciones que promuevan el crecimiento de los microorganismos y de la planta.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

9. CONCLUSIONES





De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio se concluye que:



Durante el proceso de fitorremediación, de la adición del consorcio microbiano aislado de la rizósfera de *C. laxus* solo mejoró ligeramente el crecimiento radicular de *C. ligularis*.



El efecto rizósfera estimuló el aumento en los valores de la cuenta total y el número de microorganismos degradadores beneficiando el máximo valor de la tasa de remoción en presencia de las plantas.



La presencia de hidrocarburos sorbidos en las raíces fue mayor en las plantas inoculadas comparadas con las no inoculadas.



La presencia de la planta mejoró la eficiencia de remoción de las fracciones alifáticas y aromáticas.



El presente estudio demostró la capacidad de fitorremediación de hidrocarburos por *C. ligularis* en el sistema modelo llevándose a cabo principalmente por la adición del inóculo (microorganismos asociados a la rizósfera). Con base en lo anterior, la asociación planta-microorganismos inoculados pueden formar parte de una estrategia de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco
México.

10. ANEXOS

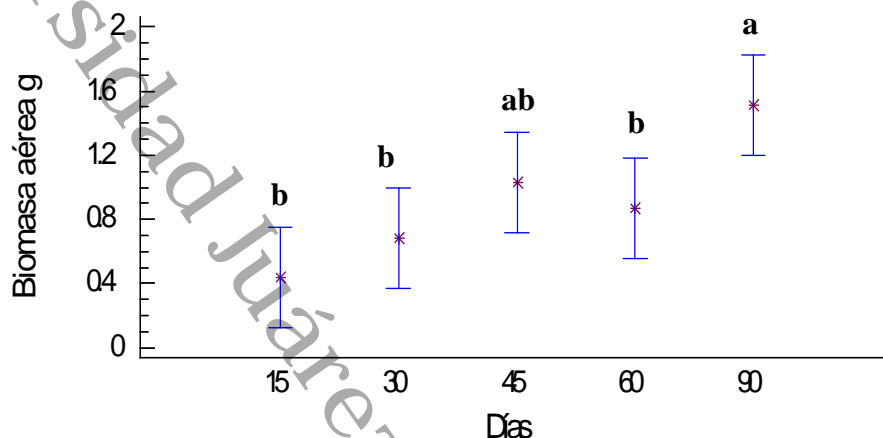




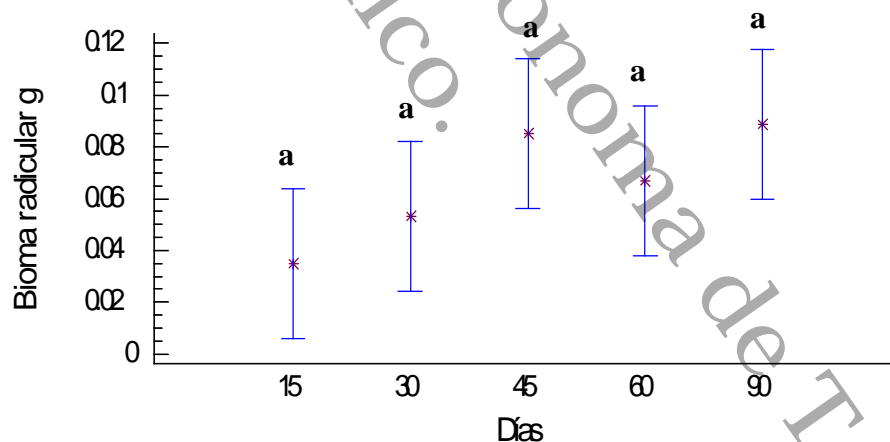
Características fenológicas de la planta durante la fitorremediación

Biomasa seca aérea y radicular: TIII

[ANOVA Simple]



Valores promedio de biomasa seca aérea (± 0.143) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



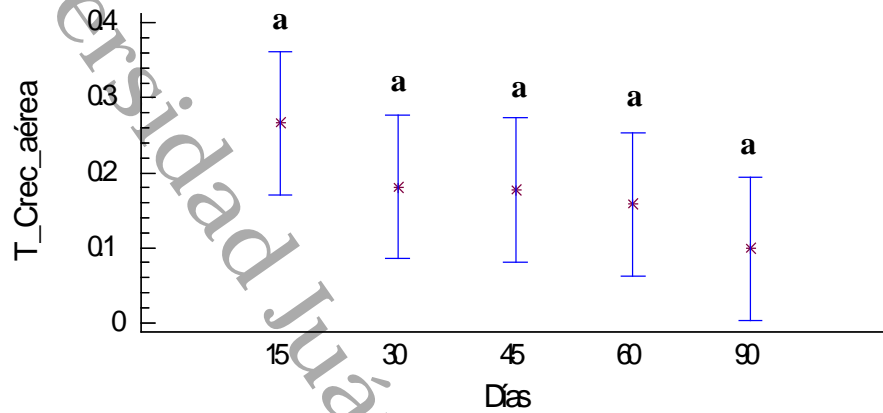
Valores promedio de biomasa seca radicular (± 0.013) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



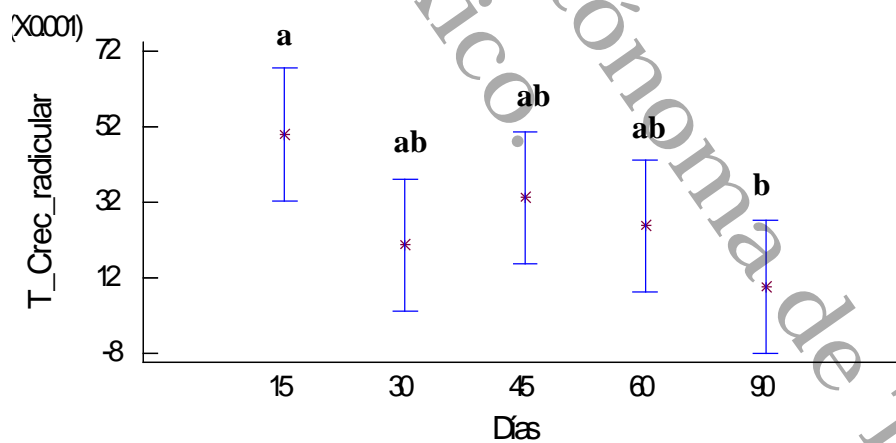


Tasa de crecimiento aérea y radicular: TIII

[ANOVA Simple]



Valores promedio de tasa de crecimiento aérea (± 0.043) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



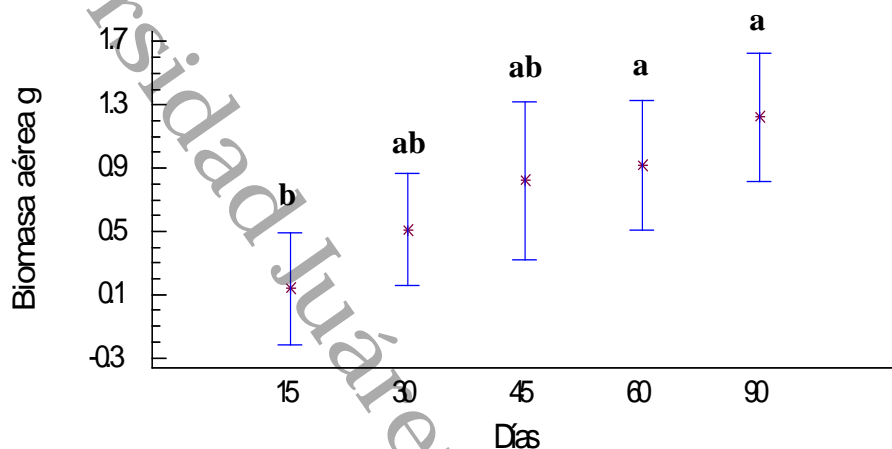
Valores promedio de tasa de crecimiento radicular (± 0.007) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



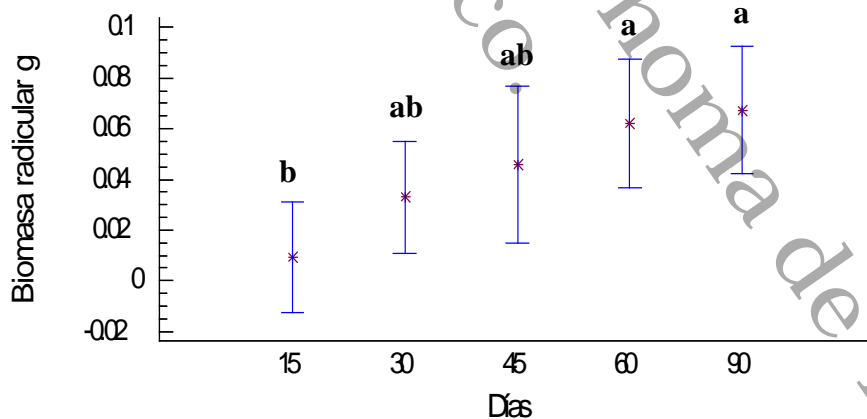


Biomasa seca aérea y radicular: TIV

[ANOVA Simple]



Valores promedio de biomasa seca aérea (± 0.154) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



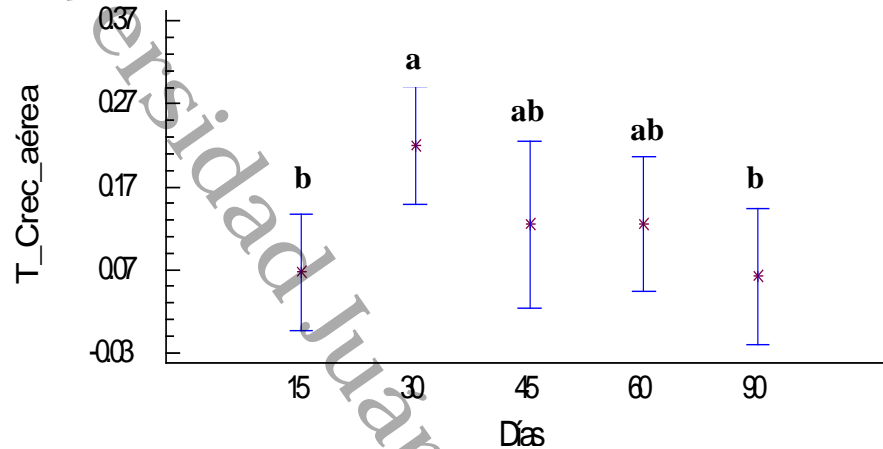
Valores promedio de biomasa seca radicular (± 0.009) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



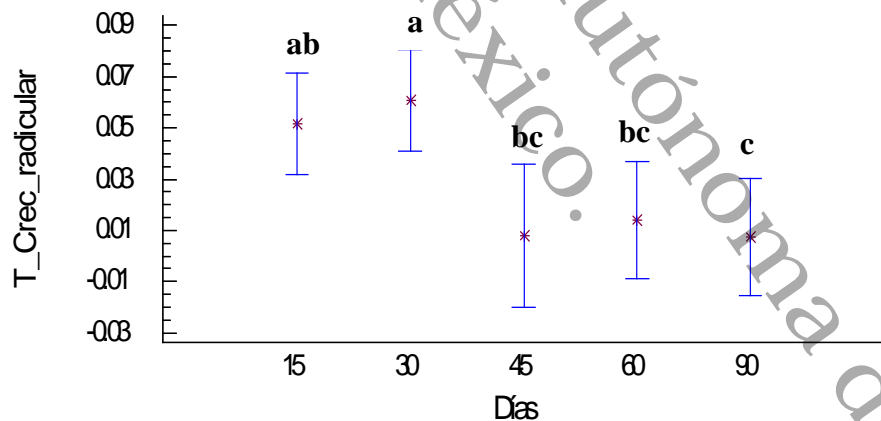


Tasa de crecimiento aérea y radicular: TIV

[ANOVA Simple]



Valores promedio de tasa de crecimiento aérea (± 0.031) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



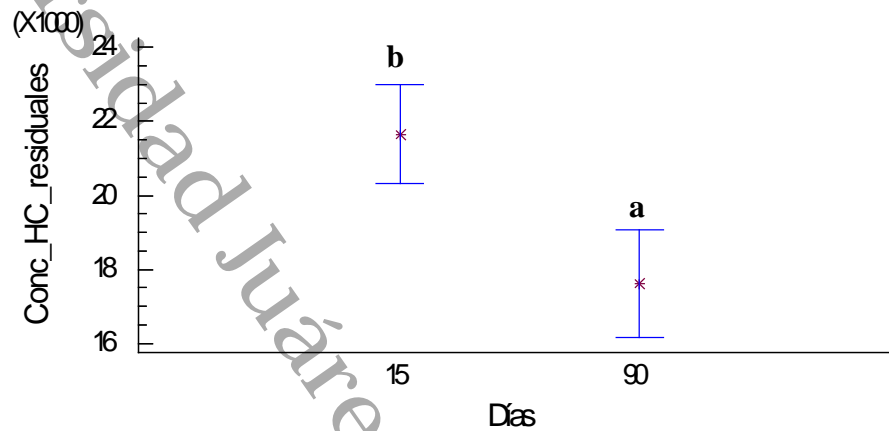
Valores promedio de tasa de crecimiento radicular (± 0.008) (Tukey) para los cinco tiempos. El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).





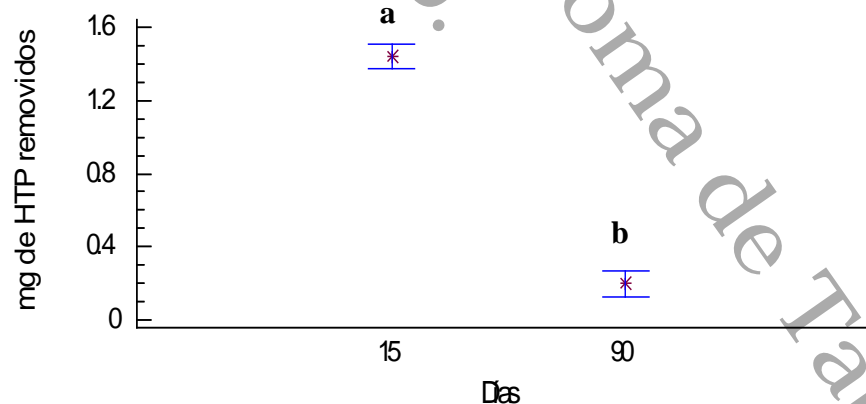
Remoción de hidrocarburos

Hidrocarburos residuales [ANOVA Simple]



Valores promedio de hidrocarburos residuales (± 918.94) (Tukey) para los dos tiempos (15 y 90 días). El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican efectos estadísticas significativas ($P < 0.05$).

Tasa de remoción [ANOVA Simple]

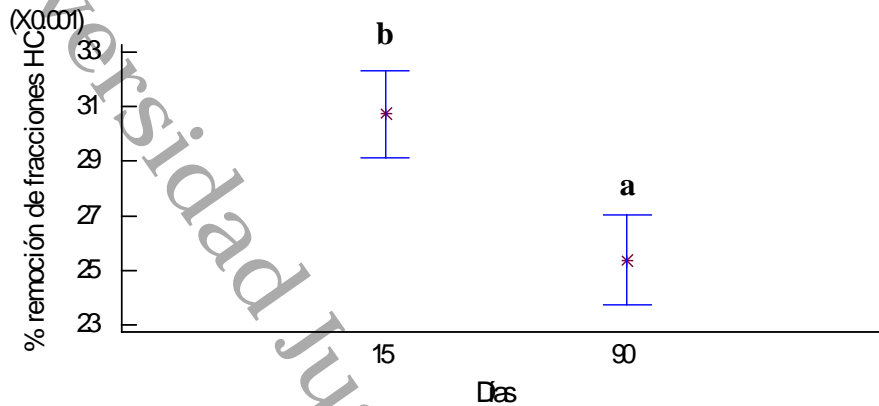


Valores promedio de tasa de remoción hidrocarburos residuales (± 0.043) (Tukey) para los dos tiempos (15 y 90 días). El número de observaciones por tiempo es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).



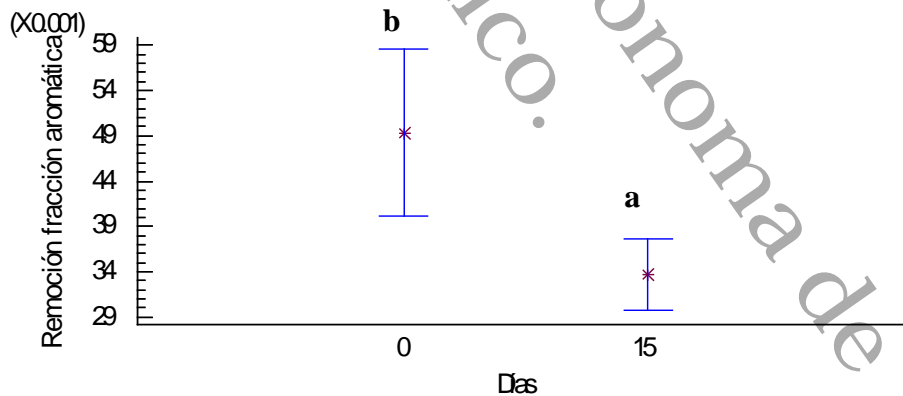


Remoción de las fracciones [ANOVA Factorial]



Valores promedio del % remoción de HC residuales para las 4 fracciones estudiadas (± 0.001) (Tukey) para los dos tiempos (15 y 90 días). El número de observaciones es 4. Letras diferentes indican efectos estadísticamente significativas ($P < 0.05$).

Remoción de la fracción aromática [ANOVA Simple]



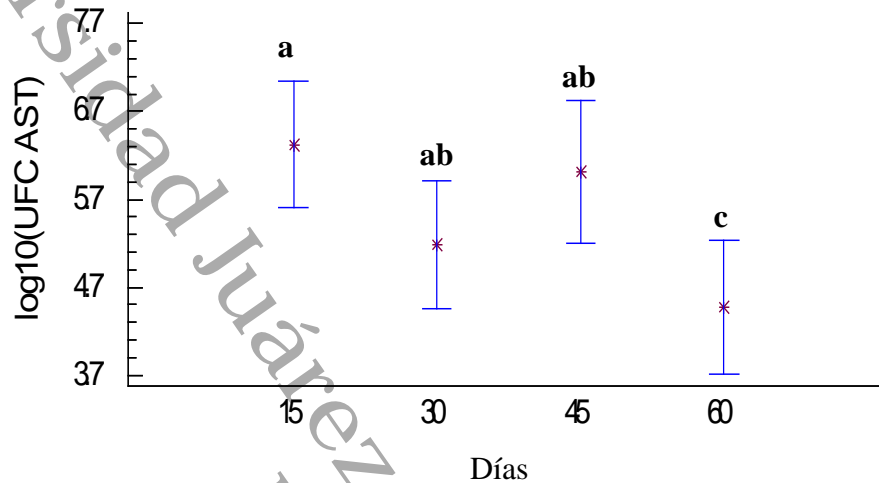
Valores promedios (± 0.006) de Tukey en la remoción de la fracción aromática. El número de observaciones es 4. Letras diferentes indican estadísticas significativas ($P < 0.05$).





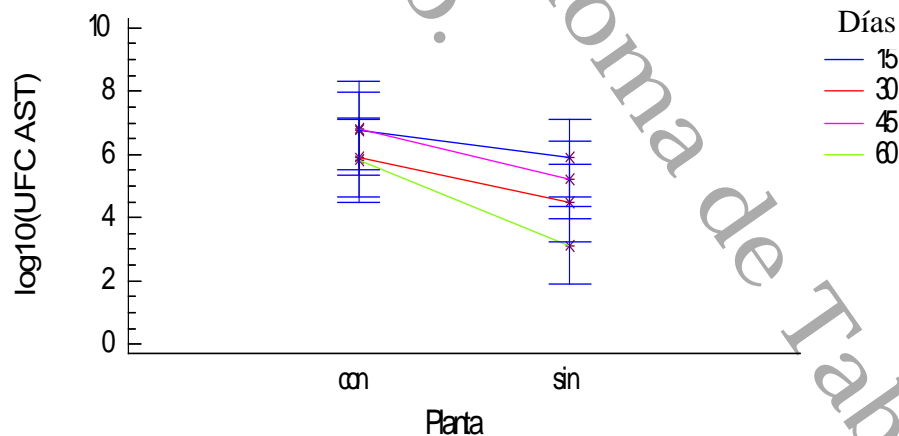
Microorganismos rizosféricos

Bacterias (UFC g⁻¹ de agrolita seca) [ANOVA Factorial]



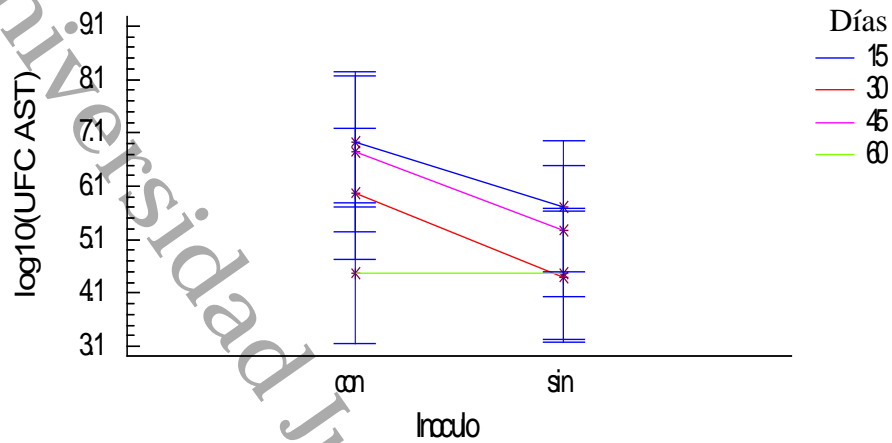
Valores promedio (± 2.32) (Tukey) del conteo total de bacterias en los cinco diferentes tiempos estudiados. Letras diferentes indican efectos estadísticamente significativos. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.

Gráfico de interacciones



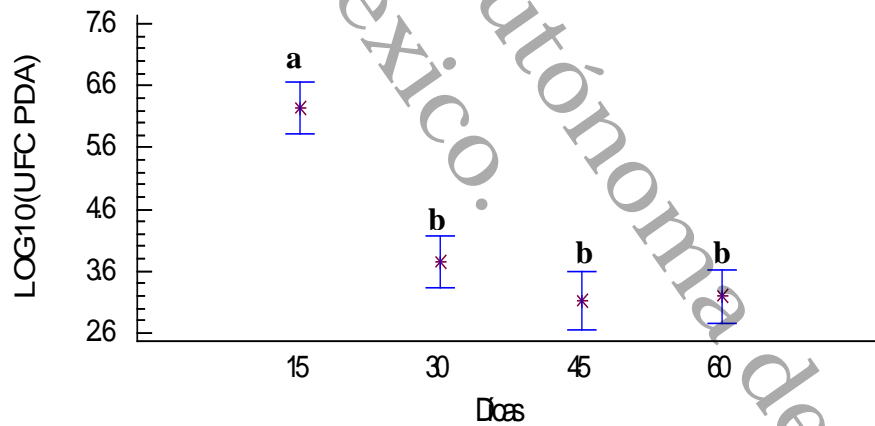
Valores promedio (± 3.28) (Tukey) del conteo total de bacterias en dos niveles de plantas. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.





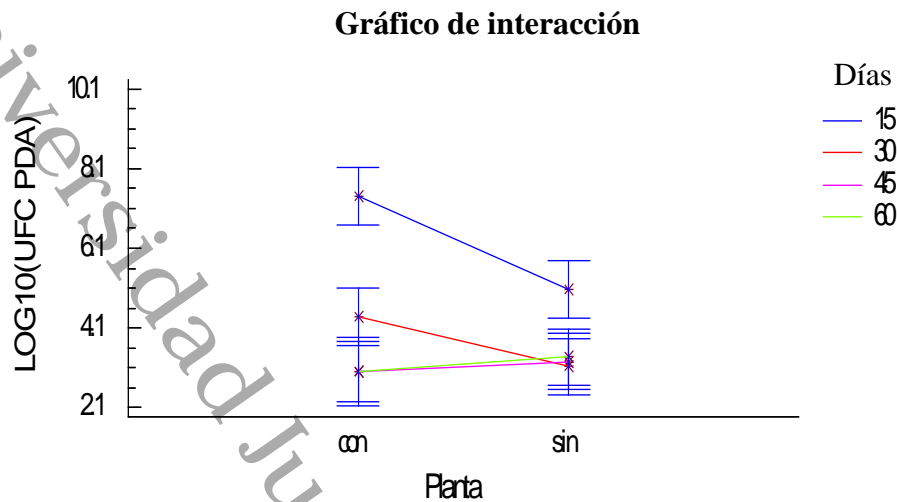
Valores promedio (± 3.28) (Tukey) del conteo total de bacterias sometidas a dos tipos de inóculos. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.

Hongos [ANOVA Factorial]



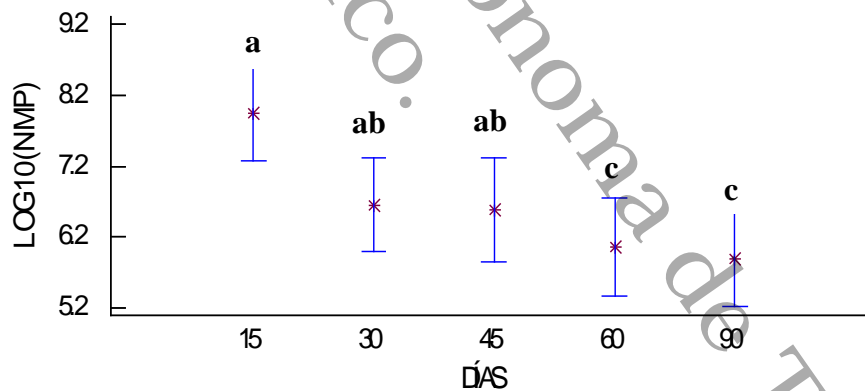
Valores promedio (± 6.04) (Tukey) del conteo total de hongos sometidos a los diferentes tiempos estudiados. Letras diferentes indican efectos estadísticamente significativos. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.





Valores promedio del conteo total de hongos (± 8.54) (Tukey) sometidos a dos niveles de planta. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.

Método del número más probable (NMP) [ANOVA Factorial]

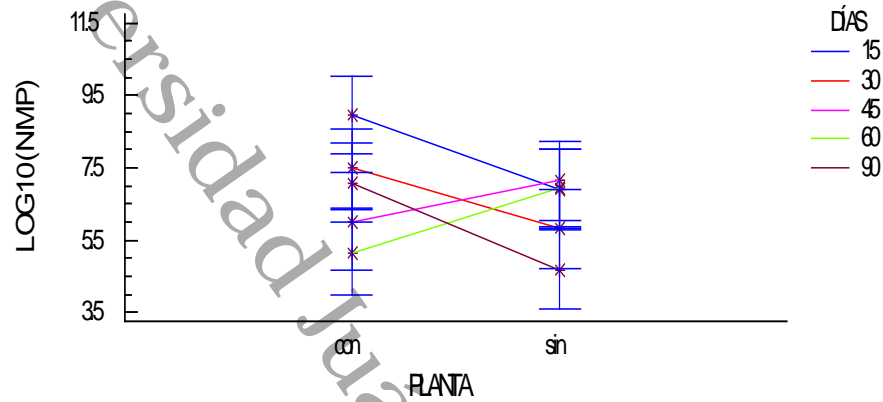


Valores promedio (± 1.56) (Tukey) de microorganismos degradadores en los tiempos estudiados. Letras diferentes indican efectos estadísticamente significativos. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.





Gráfico de interacción



Valores promedio de microorganismos degradadores (± 2.20) (Tukey) sometidos a dos niveles de planta. Cada tiempo consta de cuatro observaciones.





Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.
México.

11. LITERATURA CITADA





1. Abhilash, P. C. y Singh, N. 2010. *Withania somnifera* dunal-mediated dissipation of lindane from simulated soil: implications for rhizoremediation of contaminated soil. *Journal of Soils Sediments* 10:272-282
2. Acuña, A., Pucci, G., Morales, M. J. y Pucci, O. 2010. Biodegradación de petróleo y sus derivados por la comunidad bacteriana en un suelo de la Patagonia Argentina. *Revista de la sociedad Venezolana de microbiología*. 30:29-36
3. Adams-Schroeder, R. H., Domínguez-Rodríguez, V. I. y García-Hernández, L. 1999. Potencial de la biorremediación de suelo y agua impactados por petróleo en el trópico mexicano. *Terra*. 17(2):159-174
4. Adams-Schroeder, R. H., Olan-Castro, D., Guzmán-Osorio, F. J y Díaz-Ramírez, I. J. 2009. Relationship between geomorphology and contamination with weathered hydrocarbons in an old river levee/marsh association. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 6(4):527-538
5. Afzal, M. (2010). Plant-microbe interactions for the remediation of hydrocarbon contaminated soil. Tesis Doctorado. University of Natural Resources and Life Sciences, Vienna
6. Afzal, M., Yousaf, S., Reichenauer, T. G. y Sessitsch, A. (2012). The inoculation method affects colonization and performance of bacterial inoculant strains in the phytoremediation of soil contaminated with diesel oil, *International Journal of Phytoremediation*, 14:35-47
7. Alarcón, A. 2006. The physiology of micorrizhal *Lolium multiflorum* in the phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. Tesis Doctorado. Universidad Veracruzana, Xalapa, Veracruz, México
8. Alemán-Caporal, A. M. 2009. Determinación de hidrocarburos totales del petróleo en suelos y sedimentos de la cuenca del río Coatzacoalcos. Tesis de Licenciatura. Universidad Veracruzana. Coatzacoalcos, Veracruz.





9. Alkorta, I., y Garbisu, C. 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology* 79:273-276.
10. Al-Zalzaleh, H. A., Al-Zalzaleh, M. A. y Mathew, A. R. 2009. Van inoculation for selected ornamental plants in bioremediated and agricultural soils. *European Journal of Scientific Research*. 25(4):559-566
11. Annual Book of ASTM Standards. 1991. D2007-91. Standard test method for characteristic groups in rubber extender and processing oils and other petroleum-derived oils by the clay-absorption. Chromatographic method. 2168-2175 pp.
12. Arriaga, V., Cervantes, V., y Vargas-Mena, A. 1994. Manual de reforestación con especies nativas. (INE-UNAM-SEDESOL). 186 PP.
13. Arthur, E. L., Rice, P. J., Rice, P. J., Anderson, T. A., Baladi, S. M., Henderson, K. L. D. y Coats, J. R. 2005. Phytoremediation—An Overview. *Critical reviews in Plant Sciences*. 24:109-122
14. Atlas, R. M. 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbiological Reviews*. 45:180-209
15. Bashan, Y. 1998. Inoculants plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology Advances*, 16(4):729-770
16. Bashan, Y., Puente, M. E., de Bashan, L. E. y Hernández, J. P. 2008. Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. *Plant-Microbe Interactions*. 69-93
17. Basumatary, B., Bordoloi, S. y Sarma, H. P. 2012. Crude oil-contaminated soil phytoremediation by using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water air soil pollut.* 223:3373-3383
18. Berendsen, R. L., Pieterse, C. M. J. y Bakker, P. A. H. M. 2012. The rhizosphere microbiome and plant health. *Trends in plant science*. 17(8):478-486
19. Braibant-Wayens, C. 2004. Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por *Acinetobacter sp.* *Pseudomonas putida* para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados. Informe parcial grado de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, Costa Rica.





20. Cai, Z., Zhou, Q., Peng, S. y Li, K. 2010. Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *Journal of Hazardous Materials* 183:731-737
21. Castro-Carrillo, L. A., Delgadillo-Martínez, J., Ferrera-Cerrato, R., y Alarcón, A. 2008. Remoción de fenantreno por *Azolla caroliniana* utilizando bioaumentación con microorganismos hidrocarbonoclastas. *Interciencia* 33(8):591-597.
22. Chauhan, A., Fazlurrahman-Oakeshott, J. G. y Jain, R., K. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons: strategies for bioremediation. *Indian Journal of Microbiology*. 48:95-113
23. Cheineau, C. H., Yepremian, C., Vidalie, J. F., Ducreux, J. y Ballerini, D. 2003. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water, Air, and Soil Pollution*. 144:419-440
24. Contreras-Juárez, C. 2009. Biodegradación de hidrocarburos (diesel) por un co-cultivo mixto definido a escala laboratorio. Tesis Licenciatura. DACBiol-UJAT. México.
25. Corgié, S. C., Fons, F., Beguiristain, T. y Leyval, C. 2006. Biodegradation of phenanthrene, spatial distribution of bacterial populations and dioxygenase expression in the mycorrhizosphere of *Lolium perenne* inoculated with *Glomus mosseae*. *Mycorrhiza* 16:207-212
26. Corona-Ramírez, L. y Iturbe-Argüelles, R. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con Hidrocarburos. *Ingeniería Investigación y Tecnología* 6(2):119-126.
27. Delgado, J. G. 2006. Asfaltenos, composición, agregación, precipitación. Laboratorio de formación, interfases reología y procesos. Universidad de los Andes. Mérida-Venezuela.
28. Diab, E. A. 2008. Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the rhizosphere effects of some plants. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(6):604-610





29. Diab, E. y Brady, R. K. A. 2011. Biodegradation of PAH compounds in the rhizosphere of *Tamarix nilotica*: A salt tolerant wild plant. *Journal of American Science*; 7(6):115-124]. (ISSN: 1545-1003).
30. Diab, E. y Sandouka, M. 2010. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in the rhizosphere soil of *Cyperus conglomeratus*, an Egyptian wild desert plant. *Nature and Science*, 8(12):144-153
31. Díaz, G., Ortiz, R. y Bernal, C. 2010. Predicción de la disponibilidad de pireno y fenantreno a través de su extractabilidad en butanol en suelos contaminados con diesel. *Terra Latinoamericana*. 28(3):203-210
32. Díaz-Martínez, M. E. 2012. *Casuarina equisetifolia* en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. Tesis Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México.
33. Díaz-Ramírez, I. J. 2000. Biodegradación de hidrocarburos por un consorcio microbiano de la rizósfera de una planta nativa de pantano. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México. D. F.
34. Díaz-Ramírez, I. J., Ramírez-Saad, H., Gutiérrez-Rojas, M., y Favela-Torres, E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizosphere soil in a contaminated site. *Canadian Journal of Microbiology*. 49:755-761
35. Diego-Pérez, N. 1997. Flora de Guerrero. No. 5. Ciperáceas. Facultad de ciencias de la UNAM. 74-76 pp.
36. Escalante-Espinosa, E. 2005a. Estudio de la capacidad fitorremediadora de *Cyperus laxus Lam.* en suelo contaminado con hidrocarburos. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
37. Escalante-Espinosa, E. 2005b. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus Lam.* inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. 59:405-413
38. Fernet, J. L. 2008. Plant bacterial inoculants to remediate hydrocarbon polluted soil. Tesis Maestría. University of Saskatoon, Saskatchewan, Canada.





39. Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M. R., Sangabriel, W., Trejo-Aguilar, D., Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C. y Delgadillo-Martínez, J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826.
40. Ferrera-Cerrato, R., Rojas-Avelizapa, N. G., Poggi-Varaldo, H. M., Alarcón A. y Cañizares-Villanueva, R. O. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 48(2):179-187.
41. Fontúrbel-Rada, F. 2004. Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona del lago Titikaka (San Pedro de Tiquina, Bolivia). *Ecología Aplicada*, 3:1-2
42. Frick, C.M., Farrell, R.E. y Germida, J.J. 1999. Assessment of phytoremediation as an *in-situ* technique for cleaning oil-contaminated sites: Phase I final report, literature review and technology assessment. Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC), Calgary, AB.
43. García-Rivero, M. 2003. Transferencia de masa y biodegradación de hidrocarburos de un suelo intemperizado en un cultivo de suelo en suspensión. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
44. Gaskin, S. E. 2008. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. Tesis Doctorado. School of Medicine Faculty of Health Sciences Flinders University of South Australia
45. Giraldo-Ocaña, D. 2010. Distribución e invasión de gramíneas C₃ y C₄ (Poaceae) en un gradiente altitudinal de los Andes de Colombia. *Caldasía* 32:65-86
46. Godlewska-Żyłkiewicz, B. 2006. Microorganisms in inorganic chemical analysis. *Analytical Bioanalytical Chemistry*. 384:114-123





47. Gómez-Laurito, J. 2009. Las ciperáceas (Cyperaceae) de la Estación Biológica La Selva, Costa Rica. *International Journal Tropical and Biology*. 57:93-110
48. González-Chavéz, M. C. 2004. Recuperación de suelos contaminados con metales utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23:29-37
49. Guderson, J. 2006. The effect of hydrocarbon contamination and mycorrhizal inoculation on poplar fine root dynamics. Tesis Maestria. University of Saskatchewan Saskatoon, Canada.
50. Hernández-Acosta, E., Ferrera-Cerrato, R. y Rodríguez V, R. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *TERRA Latinoamericana* (2):81-89
51. Huang, XD., El-Alawi, Y., Gurska, J., Glick, BR. Y Greenberg, B. M. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total petroleum hydrocarbons (TPHs) from soils. *Microchemical Journal* 8:139-147
52. Ibrahim, M. L., Ijah, U. J. J., Manga, S. B. y Rabah, A. B. 2008. Occurrence of hydrocarbon utilizing bacteria in the rhizosphere of *Eucalyptus camaldulensis*, *Lablab purpureus* and *Moringa oleifera*. *International Journal of Pure Applied Sciences*. 2(3):21-26
53. Instituto de Biología. "*Cyperus ligularis* L., 1759-IBUNAM: MEXU: PA790572". UNIBIO: Colecciones Biológicas. 2008-10-13.
54. Jing, W., Zhongzhi, Z., Youming, S., Wei, H., Feng, H. y Hongguangm, S. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Petroleum Science*. 5:167-171
55. Jussila, M. M. 2006. Molecular biomonitoring during rhizoremediation of oil-contaminated soil. Department of applied chemistry and microbiology. Division of microbiology Viikki Biocenter, University of Helsinki Finland.
56. Karthikeyan, P. y Kulakow, P. A. 2003. Soil plant microbe interactions in phytoremediation. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, Vol. 78





57. Kloepper, J. W., Lifshitz, R. y Zablutowicz, R. M. 1989. Free-living bacterial inocula for enhancing crop productivity. Elsevier Science Publishers. 7(2):39-34
58. Kvesitadze, E., Khatisashvili, G. y Sadunishvili, T. 2006. Biochemical mechanisms of detoxification in higher plants. Basic of phytoremediation. Springer-Verlag Berlin Heidelberg Germany.
59. Kvesitadze, E., Sadunishvili, T. y Kvesitadze, G. 2009. Mechanisms of organic contaminants uptake and degradation in plants. World Academy of Science, Engineering and Technology 55:458-468
60. Kvesitadze, G., Khatisashvili, G. y Sadunishvili, T. 2004. Mechanisms to detoxify selected organic contaminants in higher plants and microbes, and their potential use in landscape management. Letter Report. Durmishidze institute of biochemistry and biotechnology Tbilisi, Georgia
61. Larenas-Pareda, G. y De Viana, M. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. Ecología Austral 15:177-181.
62. Liu, S.L., Luo, Y. M., Cao, Z. H., Wu, L. H., Ding, K. Q. y Christie, P. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. Environmental Geochemistry and Health 26:285-293
63. López de Mesa, J. B., Quintero, G., Guevara Vizcaíno, A. L., Jaimes, Cáceres, D. C., Gutiérrez, Riaño, S. M. y Miranda García, J. 2006. Biorremediación se suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova-Publicación Científica 4(5):1-116
64. López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M. E., Pérez Flores, I. J. y Gutiérrez-Rojas, M. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. Revista Internacional Contaminación Ambiental. 21(2):91-100.
65. López-Ortiz, C. 2011. Interacción simbiótica *Rhizobium*-leguminosas arbóreas en sistema contaminados con hidrocarburos policíclicos aromáticos. Tesis Maestría. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México.





66. Loredó-Ostí, C., López-Reyes, L. y Espinosa-Victoria, D. 2004. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas: Una revisión. *TERRA latinoamericana*. 22(2):225-239
67. Lu, M., Zhang, Z., Sun, S., Wei, X., Wang, Q. y Su, Y. 2010. The use of Goosegrass (*Eleusine indica*) to remediate soil contaminated with petroleum. *Water Air Soil Pollut.* 209:181-189
68. Macek, T., Mackova, M. y Kas, J. 2000. Exploitation of plants for the removal of organics in environmental remediation. *Biotechnology Advances*. 18:23-34
69. Madueño, E. B. M., Coppotelli, I. S., Morelli. 2009. Efecto de la inoculación de la cepa *Sphingomonas paucimobilis* 20006FA sobre la composición de un consorcio bacteriano degradador de fenantreno. *Revista Argentina de Microbiología* 41:65-72
70. Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M. C., Izquierdo-Reyes, F., Palma-López, D. J. 2010. Efecto de la rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo*. 26(2):121-136
71. Martínez, M. V. E. y López, S. F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra* 19:9-17.
72. Martínez-Gutiérrez, J. 2004. Estudio molecular de las poblaciones de un lodo anaerobio en condiciones desnitrificantes y metanogénicas. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F.
73. Martínez-Viveros, O., Jorquera, M. A., Crowley D. E., Gajarso G. y Mora L. A. 2010. Mechanisms and practical considerations involved in plant growth promotion by rhizobacteria. *Journal Soil Science and Plant Nutrition*. 10(3):293-319
74. Martín-Moreno, C., González-Becerra, A. y Blanco-Santos, M. J. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminados por hidrocarburos. Aplicación de hongos en tratamientos de recuperación. *Revista Iberoamericana Micología*. 21:103-120





75. Martins, S. y Alves, M. 2009. Anatomical features of species of Cyperaceae from northeastern Brazil. *Brittonia*, 61(2):189-200
76. Mathur, N., Singh, J., Bohra, S., Bohra, A., Mehboob., Vyas, M. y Vyas, A. 2010. Phytoremediation potential of some multipurpose tree species of Indian Thar Desert in oil contaminated soil. *Advances in Environmental Biology*. 4(2):131-137
77. Miranda-Martínez, M. R., Delgadillo-Martínez, J., Alarcón, A. y Ferrera-Cerrato, R. 2007. Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *Terra Latinoamericana* 25:25-33.
78. Montes de Oca-García, M. A. 2001. Evaluación de las cepas productoras de biosurfactantes y su aplicación en la biodegradación de la fracción aromática en un suelo intemperizado contaminado con petróleo. Tesis Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana, México, D. F
79. Muratova, A. Hübner, Th. Tischer, S. Turkovskaya, O., Möder, M. y Kusch, P. 2003. Plant-rizosphere-microflora association during phytoremediation of PAH-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation* (5)2:137-151
80. Narváez-Flórez, S., Gómez, M. L. y Martínez, M. M. 2008. Selección de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aislados a partir de sedimentos del Caribe colombiano. *Investigaciones Marinas y Costeras*. 37: 63-77
81. Ndimele, P. E. 2010. A Review of Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbon. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 13(15):715-722
82. Núñez-López, R. A., Meas-Vong, Y., Ortega-Borges, R. y Olguín, E. J. 2004. Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*. 69-82
83. Ocaña-Landero, C. G. 2010. Manual de prácticas de laboratorio de remediación biológica. Tesis Licenciatura. DACBiol-UJAT. México.
84. Olguín, E. J., Hernández, M. E., y Sánchez-Galván, G. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación.





- fitorremediación y restauración. Revista Internacional Contaminación Ambiental. 23(3):139-154
85. Otoniel-Rojas, J., Moreno, M. S. A. y Rendón-Rivas, M. C. 2005. Biodegradación de gasoil rango diesel por un cultivo mixto de bacterias. Ciencia. 13:23-33
86. Owuka, F., Nwachoko, N. y Anosike, E. 2012. Detrmination of total petroleum hydrocarbon (TPH) and some Cations (Na^+ , Ca^+ y Mg^{2+}) in a crude oil polluted soil ans posible phytoremediation by *Cynodon dactylon L* (Bermuda grass). Journal of environment and earth science. 2(6):13-17
87. Pardo-Castro, J. L., Perdomo-Rojas, M. C. y Benavides-López de Mesa, J. L. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Nova- Publicación Científica. 2(2):40-49
88. Pérez-Armendáriz, B., Martínez-Carrera, D., Calixto-Mosqueda, M., Alba, J. y Rodríguez-Vázquez, R. 2010. Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. Revista internacional contaminación ambiental. 26(3):193-199
89. Pérez-Montero, S. y Hernández-Morales, M. E. 2009. Efectos de los hidrocarburos en el crecimiento de *Cyperus laxus* y *Cyperus ligularis*. Tesis Licenciatura. DACBIOL-UJAT. México.
90. Pérez-Silva, R. M., Camacho-Pozo, M. I., Gómez-Monte de Oca, J. M., Abalos-Rodríguez, A., Viñas, M. y Canter-Moreno, D. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. Revista CENIC Ciencias Biológicas, 39
91. Pérez-Vargas, J., García-Esquivel, G. y Esparza-García, F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación, XXX Aniversario de Biotecnología y Bioingeniería, Avance y Perspectiva 21.





92. Petenello, M. C., Romagnoli, M. V. y González, M. P. 2002. Poblaciones de microorganismos rizosféricos de maíz (*Zea mays*). Revista FAVE-Ciencias Agrarias 1(1): 57-64
93. Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. Annual Review of Plant Biology. 56:15-39.
94. Pilon-Smits, E. y Freeman, J. L. 2006. Environmental cleanup using plants: biotechnological advances and ecological considerations. Frontiers in Ecology and Environment. 4(4): 203-210
95. Piña-Maldonado, O. 2012. Lavado *In situ* de un suelo contaminado con diesel, asistido con surfactantes. Tesis Maestría. Instituto Politécnico Nacional-Zacatecas, México.
96. Purwanti, I. F., Abduliah, S. R. S., Bsri, H., Mukhlisin, M., Idris, M. y Latif, M. T. 2012. Identification of diesel-tolerant rhizobacteria of *Scirpus mucronatus*. African journal of microbiology research. 6(10):2395-2402
97. Quiñones-Aguilar, E. E., Ferrera-Cerrato, R., Gavi-Reyes, F., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R. y Alarcón, A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. Agrocienca. 37(6):585-594.
98. Rabie, G. H. 2005. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Phytoremediation of Soil Rhizosphere Spiked with Poly Aromatic Hydrocarbons. Mycobiology 33:41-50
99. Raghavendra, S. A. y Sage, R. F. 2011. C₄ photosynthesis and related CO₂ concentrating mechanisms. Advances in photosynthesis and respiration. Volumen 32. Springer. 410 pp.
100. Ramírez-May, A. G. 2012. Estados fenológicos tempranos de frijol [*Vigna unguiculata* (J)Wallp], bacterias y actividad enzimática: indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado. Tesis Maestría. Colegio de Postgraduados. Tabasco, México.





101. Rivera-Cruz, M. C. y Trujillo-Narcía, A. 2004a. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29(7):369-376
102. Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Sánchez-García, P., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L. y Rodríguez-Vázquez, R. 2004b. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia* 38:1-12.
103. Rivera-Cruz, M. C., Ferrera-Cerrato, R., Volke-Haller, V., Fernández-Linares, L. y Rodríguez-Vázquez, R. 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco, México. *Agrociencia*. 36(2):149-160.
104. Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., Ferrera-Cerrato, R., Rodríguez-Vázquez, R., Volke-Haller, V., Sánchez-García, P. y Fernández-Linares, L. 2006. Fitorremediación de suelos contaminados con Benzo(α)pireno mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán *Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc. *Universidad y Ciencia. Trópico Húmedo*. 22(1):1-12.
105. Rodrigues, A. C. y Maranhão-Estelita, M. E. 2003. Origin and structure of the Kranz tissue in bracts of *Cyperus giganteus* Vahl (Cyperaceae). *Revista Brasil, Botanica*. 26(4):445-452.
106. Ruberto, L. A. M., Vázquez, S. C. y Mac Cormack, W. P. 2008. Bacteriology of Extremely Cold Soils Exposed to Hydrocarbon Pollution. Chapter 12. P. Dion and C.S. Nautiyal (eds.), *Microbiology of Extreme Soils. Soil Biology* 13. Verlag Berlin Heidelberg.
107. Salgado-Brito, R., Pineda-Flores, G., Mesta-Howard, A. M., Díaz-Cedillo, F. y Wang-Hu, E. T. 2008. Degradación de *n*-alcanos por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Ciencia y Tecnología. Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. 7(7):123-132
108. Sangabriel, W., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Mendoza-López, M. R., Trejo-Aguilar, D., Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C. y Delgadillo-Martínez, J. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por





- seis especies vegetales. Revista. Internacional Contaminación Ambiental. 22(2):63-73.
- 109.** Santos, F. H., Carmo, L. F., Paes, E. S. J., Rosado, S. A. y Peixoto, S. R. 2011. Bioremediation of Mangroves Impacted by Petroleum.. Water, Air & Soil Pollut. 216:329-350.
- 110.** Shirdam, R.; Zand, A. D; Nabi bidhendi, Gholamreza; Mehrdadi, N. 2010. Removal of Total Petroleum Hydrocarbons (TPHs) from Oil-Polluted Soil in Iran. Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering. 28(4):105-113
- 111.** Sing, O. V. y Jain, R. K. 2003. Phytoremediation of toxic aromatic pollutants from soil. Applied Microbiology Biotechnology. 63:128-135
- 112.** Springgs, T., Banks, M. K. y Schwab, P. 2005. Phytoremediation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Manufactured Gas Plant-Impacted Soil. Journal Environment. Quality. 34:1755-1762
- 113.** Su, Y. H. y Zhu, Y. G. 2007. Transport mechanisms for the uptake of organic compounds by rice (*Oriza sativa*) roots. Environmental 148:94-100
- 114.** Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z., Christie, P. 2011. Influence of Rhizobium meliloti on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. Journal of Hazardous Materials 186:1271-1276
- 115.** Toledo-Ramos, D., Teresinha-Marrano, L., Flávia-Godoy, A. L., da Silva-Carvalho Filho, M. A., Lacerda, L. G. y Carvalho de Vasconcelos, E. 2009. Petroleum Hydrocarbons Rhizodegradation by *Sebastiania commersoniana* (Baill.) L. B. SM. & Downs. Water, Air & Soil Pollut; Focus. DOI 10.1007/s11267-009-9208-z
- 116.** Torres-Delgado, K. y Zuluaga-Montoya, T. 2009. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. Tesis Licenciatura. Universidad Ingeniería Química. Colombia, Medellín.





117. U. S. EPA, 2001. Brownfields technology primer: Selecting and using phytoremediation for Site cleanup. EPA 542-R-01-006. Environmental Protection Agency. Washington, D. C.
118. Valenzuela, F. E., Solís, M. L., Martínez, V. O. y Pinochet, T. D., 2006. Hongos aislados desde suelos contaminados con petróleo. Boletín Micológico. 21:35-41
119. Vidal-Fernández, J. E. 2012. Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium-leguminosa-micorriza* arbuscular ante vanadio y níquel. Tesis Maestría. Colegio de postgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México.
120. Villegas-Velázquez, I. 2011. Respuesta de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillo, Texcoco. Edo. de México.
121. Volke-Sepúlveda, T. L. y Velasco-Trejo, J. A. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. SEMARNAT-INE-CENICA.
122. Zand, A. D., Bidhendi, G. N. y Mehrdadi, N. 2010. Phytoremediation of total petroleum hydrocarbons (TPHs) using plant species in Iran. Turkish Journal of Agriculture and Forestry. 34: 429-438
123. Zavala-Cruz, J., Gavi-Reyes, F., Adams-Schroeder, R. H., Ferrera-Cerrato, R., Palma-López, D. J., Vaquera-Huerta, H. y Domínguez-Ezquivel, J. M. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. Terra Latinoamericana 23: 293-302.
124. Zurita-Cruz, M. G. 2012. Sorción de hidrocarburos en raíces de *Cyperus laxus* Lam. Tesis Maestría. DACBiol-UJAT. México.

