



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
INSTITUTO DE CIENCIAS
CENTRO DE AGROECOLOGÍA
MAESTRÍA EN MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

**BIORREMEDIACIÓN COMO TECNOLOGÍA AGROECOLÓGICA
PARA LA UTILIZACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS Y LA PRODUCCIÓN DE *Gypsophila paniculata*
EN INVERNADERO**

Tesis que para obtener el grado de
Maestra en Ciencias en Manejo Sostenible de Agroecosistemas

PRESENTA

IBT. Gloria Anaí Valencia Luna

COMITÉ TUTORAL

DIRECTORA

Dra. Beatriz Pérez Armendáriz

REVISORA

Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez

ASESORES

Dr. Dionicio Juárez Ramón

Dr. Omar Romero Arenas

Puebla, Pue., Enero 2020



La presente tesis, titulada: "Biorremediación como tecnología agroecológica para la utilización de suelos contaminados con hidrocarburos y la producción de *Gypsophila paniculata* en invernadero.", realizada por la alumna IBT. Gloria Anaí Valencia Luna, bajo la dirección del Comité Tutorial indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS EN
MANEJO SOSTENIBLE DE AGROECOSISTEMAS

COMITÉ TUTORAL:

DIRECTOR: _____

Dra. Beatriz Pérez-Armendáriz

CO-DIRECTOR: _____

Dr. Dionicio Juárez Ramón

ASESOR: _____

Dr. Omar Romero Arenas

REVISOR EXTERNO: _____

Dra. Amparo Mauricio Gutiérrez

Puebla, Pue., Enero de 2020.

DEDICATORIA

A mis padres

Por ser siempre mi más grande ejemplo de perseverancia y amor.

*“La ciencia no es sólo una disciplina de razón,
sino también de romance y pasión”
-Stephen Hawking.*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres

A mi Madre, por creer siempre en mí, por enseñarme y demostrarme que una mujer decidida puede llegar hasta donde se lo proponga y más lejos.

A mi Padre, por el apoyo incondicional, por ser un gran ejemplo de que con esfuerzo y sacrificio podemos cumplir todos nuestros sueños.

A mis hermanas

A Sara, Andy y Vero, por ser las mejores amigas y compañeras que la vida pudo darme, por su comprensión y amor a manos llenas.

A mis «hermanos», por convertirse en mis mejores amigos.

A mis compañeros y amigos

A mis compañeros de clase y de laboratorio, por la fraternidad creada en el trabajo arduo que nunca dejó de ser divertido.

A Cuquis y Carla por enseñame a ver la vida desde otras perspectivas, por llenar de recuerdos fastuosos estos dos años.

A mi Directora de tesis

A la Dra. Bety Pérez Armendáriz, por impulsarme a seguir en el camino de la investigación, por la confianza depositada en mí, por el total apoyo en este y tantos proyectos. Por ser implacable como investigadora, e invaluable como amiga.

A mis asesores y profesores

A la Dra. Amparo Mauricio Guitiérrez, por el conocimiento que con la mejor actitud me compartió durante las clases impartidas y el proceso de revisión de este trabajo de investigación.

Al Dr. Dionicio Juárez Ramón, Dr. Omar Romero Arenas y al Dr. Jorge García Dávila; por seguir mi proyecto y complementarlo desde sus áreas, haciendo de éste un trabajo integral.

Al Dr. Isaac Reyes Vera, por desinteresadamente ser parte de mi formación profesional y brindarme siempre el apoyo requerido desde hace más de 4 años.

A los Doctores con los que tuve la fortuna de compartir aula, que, desde su pericia, me colmaron de aprendizaje e inquietud por la ciencia y la investigación.

Al Centro de Agroecología BUAP y a la UPAEP

Por poner a mi disposición la infraestructura, equipos, materiales y reactivos necesarios para llevar a cabo este trabajo de investigación.

A CONACyT

Por el apoyo económico (CVU 858507) que, por dos años, me permitió un crecimiento profesional incalculable.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE CONTENIDO.....	II
ÍNDICE DE TABLAS.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VII

ÍNDICE DE CONTENIDO

1. Capítulo 1 Organización del trabajo.....	1
1.1 Introducción.....	2
1.2 Planteamiento del problema.....	6
1.3 Justificación.....	8
1.4 Objetivos.....	9
1.4.1 <i>Objetivo general.....</i>	<i>9</i>
1.4.2 <i>Objetivos específicos.....</i>	<i>9</i>
1.5 Hipótesis.....	10
2. Capítulo 2 Marco teórico.....	11
2.1 Manejo sostenible de agroecosistemas.....	12
2.1.1 <i>Contaminación de agroecosistemas.....</i>	<i>15</i>
2.2 Química de hidrocarburos.....	17
2.3 Técnicas de recuperación de suelos.....	22
2.4 Biorremediación.....	25
2.4.1 <i>Bioestimulación.....</i>	<i>26</i>
2.4.2 <i>Bioaumentación.....</i>	<i>26</i>
2.4.2.1 <i>Micorremediación.....</i>	<i>27</i>
2.4.2.2 <i>Mecanismos de micorremediación de hidrocarburos.....</i>	<i>27</i>
2.4.3 <i>Fitorremediación.....</i>	<i>32</i>
2.4.3.1 <i>Mecanismos de fitorremediación de hidrocarburos.....</i>	<i>35</i>
3. Capítulo 3 Materiales y métodos.....	38
3.1 Etapa 1 Suelo.....	41
3.1.1 <i>Muestreo.....</i>	<i>41</i>
3.1.2 <i>Preparación de muestra.....</i>	<i>41</i>
3.1.3 <i>Caracterización física y química del suelo (contaminado).....</i>	<i>41</i>

3.2 Etapa 2 Propagación de Plántulas y hongos.....	42
3.2.1 Germinación.....	42
3.2.2 Evaluación de la calidad de la plántula.....	42
3.2.2.1 Medición de Índice de calidad de Dickson.....	42
3.2.2.2 Cuantificación de clorofila.....	43
3.2.3 Cultivo de hongos.....	44
3.2.4 Conteo de esporas.....	44
3.2.5 Inoculación.....	44
3.2.6 Diseño experimental.....	45
3.2.7 Transplante.....	45
3.3 Etapa 3 Biorremediación.....	46
3.3.1 Ensayo de biorremediación.....	46
3.3.2 Parámetros fisiológicos de la planta.....	46
3.3.2.1 Medición de índice de calidad de Dickson.....	46
3.3.2.2 Cuantificación de clorofila.....	46
3.3.3 Remoción de diésel.....	46
3.3.3.1 Cuantificación de diésel por HPLC.....	47
3.3.3.2 Cuantificación de mg kg^{-1} de Diésel residual por gravimetría.....	48
3.3.4 Caracterización física y química del suelo (biorremediado).....	49
3.3.5 Análisis estadístico de resultados.....	49
 4. Capítulo 4 Resultados y discusión.....	 50
4.1 Resultados.....	51
4.1.1 Suelo inicial.....	51
4.1.1.1 Muestreo.....	51
4.1.1.2 Características físicas y químicas del suelo (contaminado).....	51

4.1.2	Proceso de Biorremediación.....	52
4.1.2.1	<i>Germinación.....</i>	53
4.1.2.2	<i>Evaluación de la calidad de la plántula al momento del trasplante</i>	52
4.1.2.3	<i>Hongos.....</i>	53
4.1.2.4	<i>Parámetros fisiológicos de la planta.....</i>	54
4.1.2.5	<i>Remoción de diésel.....</i>	54
	<i>Cuantificación de Hidrocarburos Totales del petróleo con HPLC.....</i>	57
	<i>Cuantificación de mg kg^{-q} de Diésel residual por gravimetría.....</i>	61
4.1.3	<i>Características físicas y químicas del suelo (biorremediado).....</i>	63
4.2	Discusión.....	65
4.2.1	<i>Parámetros fisiológicos de la planta.....</i>	65
4.2.2	<i>Remoción de diésel.....</i>	67
4.2.3.	<i>Características físicas y químicas del suelo biorremediado.....</i>	69
	Capítulo 5 Conclusiones	77
	REFERENCIAS.....	79
	ANEXOS.....	81

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Grupos de hidrocarburos alifáticos.....	18
Tabla 2.2 Principales Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP).....	19
Tabla 2.3 Técnicas físicas y químicas de recuperación de suelo.....	22
Tabla 2.4 Técnicas biológicas de recuperación de suelo.....	24
Tabla 3.1 Parámetros físicos y químicos del suelo.....	42
Tabla 3.2 Diseño experimental.....	45
Tabla 3.3 Muestras para obtener Remoción de diésel.....	47
Tabla 4.1 Análisis físico-químicos del suelo inicial.....	51
Tabla 4.2 Condiciones iniciales de la especie vegetal.....	53
Tabla 4.3 Resultados de Análisis de varianza y comparaciones Variables Biológicas.....	55
Tabla 4.4 T-Student Pareada para HTPs iniciales y finales.....	57
Tabla 4.5 ANOVA y Tukey de HTPs iniciales y finales.....	58
Tabla 4.6 T-Student Pareada para mg kg^{-1} de diésel residual iniciales y finales.....	61
Tabla 4.7 ANOVA y Tukey de mg kg^{-1} de Diésel Residual.....	62
Tabla 4.8 Caracterización física y química del suelo contaminado y biorremediado.....	63
Tabla 4.9 Límites máximos permisibles de Hidrocarburos por uso de suelo.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1 Diferencias entre la Agricultura convencional y la Agroecología.....	13
Figura 2.2 Diferencias entre el enfoque productivista y el agroecológico.....	13
Figura 2.3 Tomas clandestinas a nivel Nacional por años (PEMEX).....	16
Figura 2.4 Efectos a la salud por exposición a HAP.....	21
Figura 2.5 Proceso general de biodegradación de contaminantes orgánicos.....	28
Figura 2.6 Etapas iniciales de la ruta de microrremediación de HAP.....	29
Figura 2.7 Principales métodos de microrremediación de contaminantes orgánicos.....	30
Figura 2.8 Mecanismos de fitorremediación.....	32
Figura 2.9 Etapas en la fitorremediación.....	35
Figura 2.10 Reacciones microsómicas en la fitorremediación de hidrocarburos.....	37
Figura 2.11 Reacciones citosólicas en la fitorremediación de hidrocarburos.....	37
Figura 3.1 Estrategia general del trabajo.....	40
Figura 4.1 Imágenes satelitales y coordenadas del lugar de muestreo.....	51
Figura 4.2 Germinación y crecimiento de <i>Gypsophila paniculata</i>	52
Figura 4.3 Cultivo de hongos en PDA 5 días después de su siembra.....	53
Figura 4.4 Cultivo de hongos en PDA 5 días después de su siembra.....	53
Figura 4.5 Fotografías plantas después del Ensayo de fitorremediación (húmedas).....	54
Figura 4.6 Fotografías plantas después del Ensayo de fitorremediación (secas).....	54
Figura 4.7 Ensayo de Biorremediación día 1.....	56
Figura 4.8 Ensayo de Biorremediación día 50.....	56
Figura 4.9 Gráfica de T-Student Pareada para HTPs iniciales y finales.....	57
Figura 4.10 Remoción de diésel T0 y T2.....	59
Figura 4.11 Remoción de diésel T1, T3 y T4.....	60
Figura 4.12 Gráfica de T-Student Pareada para Diésel residual (mg kg ⁻¹).....	62
Figura 4.13 Gráfica pH antes y después del Ensayo de Biorremediación.....	
Figura 4.14 Gráfica Materia orgánica antes y después del Ensayo de Biorremediación.....	

Figura 4.15	<i>Gráfica Nitrógeno total antes y después del Ensayo de Biorremediación.....</i>
Figura 4.16	<i>Gráfica Relación Carbono/Nitrógeno antes y después del Ensayo de Biorremediación.....</i>
Figura 4.17	<i>Gráfica Conductividad eléctrica antes y después del Ensayo de Biorremediación.....</i>

ÍNDICE DE ANEXOS

<i>Anexo 1 Preparación de agar Papa Dextrosa BD Bioxon®</i>	
<i>Anexo 2 Preparación de caldo extracto de malta DIBICO®</i>	
<i>Anexo 3 Resultados de análisis físicos y químicos del suelo inicial</i>	
<i>Anexo 4 Especificaciones HPLC</i>	
<i>Anexo 5 Condiciones iniciales de la especie vegetal</i>	
<i>Anexo 6 Conteo de esporas</i>	
<i>Anexo 7 ANOVA y Tukey Variables biológicas</i>	
<i>Anexo 8 HPLC</i>	
<i>Anexo 9 T-Student Pareada para HTPs iniciales y finales</i>	
<i>Anexo 10 ANOVA y Tukey HTPs</i>	
<i>Anexo 11 mg kg⁻¹ de Diésel Residual</i>	
<i>Anexo 12 T-Student Pareada mg kg⁻¹ de Diésel residual iniciales y finales</i>	
<i>Anexo 13 ANOVA y Tukey mg kg⁻¹ de Diésel residual</i>	
<i>Anexo 14 Análisis físicos y químicos del suelo antes y después del ensayo de biorremediación</i>	

CAPÍTULO 1

Organización del trabajo

1. Organización del trabajo

1.1 Introducción

En México, el mal uso, la falta de mantenimiento y el creciente número de tomas clandestinas en los oleoductos, ha causado una problemática grave de suelos contaminados con hidrocarburos, teniendo impacto negativo con implicaciones en la salud humana y la economía de la región (Castro *et al.*, 2013). Estos siniestros dañan principalmente zonas rurales, teniendo mayor efecto en comunidades dedicadas a la agricultura (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014). En los últimos 5 años, el Estado de Puebla ha destacado dentro de los 5 Estados con mayor número de tomas clandestinas (PEMEX, 2019) y robo de combustible, el denominado Triángulo Rojo se ha convertido en un problema no sólo económico y social, sino también ambiental (Montero-Vieria, 2018).

La presencia de hidrocarburos en el suelo tiene consecuencias graves, modifica propiedades físicas y químicas, así como procesos biológicos en la rizósfera. Las características recalcitrantes de los hidrocarburos se deben a la complejidad de su estructura molecular, por lo que suelen ser difíciles de biodegradar y propensos a bioacumularse volviéndose compuestos mutagénicos y carcinogénicos (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2011).

Bajo esta problemática, nace la necesidad de buscar alternativas de manejo sustentable, que permitan contribuir con la recuperación de suelos agrícolas afectados (Rodríguez-Arrizabal, 2017). Se busca una solución sustentable que asegure condiciones del suelo favorables para el crecimiento de las plantas, particularmente a través del manejo de la materia orgánica, el aumento de la actividad biótica del suelo y la creación de sinergismos entre los componentes de la agrobiodiversidad (Altieri y Nicholls, 2013), que al mismo tiempo el suelo esté en proceso de descontaminación y produzca alimentos inocuos.

En este sentido, las enmiendas orgánicas aseguran el manejo asusto de la materia orgánica en el suelo, adicionando materiales orgánicos de distinta composición y procedencia, como los residuos y subproductos agroindustriales. La agroindustria origina grandes cantidades de residuos orgánicos, causando una problemática global que contribuye de manera activa a la contaminación ambiental (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018), sin embargo, estos subproductos pueden ser aprovechados para generar beneficios para la economía y el medioambiente (Ros *et al.*, 2012).

En la última década, los residuos agroindustriales han sido un foco de investigación a nivel mundial, debido a que pueden ser materia prima para generar productos de interés (Saval, 2012). Estos residuos presentan una alta posibilidad de ser aprovechados generando beneficios para el ambiente y la sociedad, al reciclarse y utilizarse para prevenir la contaminación o recuperar ecosistemas alterados, se perfilan como una alternativa innovadora, eficiente y de bajo costo a la solución a problemáticas ambientales como la contaminación del suelo por el vertimiento de hidrocarburos (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018). García-Torres *et al.*, (2011) determinó la eficiencia para la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) y de hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) de un suelo contaminado con petróleo crudo, utilizando dos tipos de residuos agroindustriales como enmiendas orgánicas y texturizante, dando mejora de aireación, porosidad y humedad en los suelos contaminados, por otro lado, se aumentó las concentraciones de nitrógeno y fósforo, mejorando las interacciones biológicas de la microbiota autóctona del suelo así como el aumento de actividad enzimática y por consiguiente, altos porcentajes de remoción del contaminante.

En México, las especies más cultivadas y comercializadas son los champiñones (*Agaricus*), las setas (*Pleurotus*) y el hongo shiitake (*Lentinula*) (Mayett *et al.*, 2010). Los volúmenes producidos de hongos en México ascienden a más de 62, 374 ton/año y la importancia ecológica de esta actividad radica en la utilización y reciclaje de más de 500,000 ton anuales de subproductos agrícolas y forestales derivados del cultivo de hongos comestibles (Martínez-Carrera *et al.*, 2007). Los sustratos post-cultivo o sustratos agotados (SA) de hongos comestibles son un residuo agrícola que se genera en grandes cantidades, es tratado como residuo y eliminado en vertederos generando graves problemas medioambientales en sus zonas de cultivo. Sin embargo, el SA presenta un alto contenido en materia orgánica y una compleja microbiota con la capacidad de excretar enzimas lignolíticas al medio, proteínas muy importantes en los procesos de biorremediación de suelo (Barragán-Huerta *et al.*, 2008; Pardo-Giménez *et al.*, 2010; Luna-Fontalvo *et al.*, 2013; García-Delgado, 2015).

El SAP (sustrato agotado de *Pleurotus spp.*) contiene suficientes nutrientes que pueden adicionarse al suelo o como sustrato alternativo para la producción de plantas de interés agrícola (Luna-Fontalvo *et al.*, 2013), proviendo beneficios a las propiedades físicas y químicas del suelo. Los residuos post-cultivo de hongos comestibles utilizados para la

biorremediación (bioestimulación) ya han sido estudiados en la purificación de aire, agua, suelos y sustratos contaminados con plaguicidas, así como su utilización en cultivos de flores y hortalizas en invernadero, y como enmienda general de suelos (Pardo-Giménez, 2008).

Gran variedad de hongos filamentosos tienen la capacidad para biotransformar xenobióticos como HPAs ya han sido experimentados, como lo son; *Talaromyces helicus* y *Trichoderma harzianum*. Algunas cepas de *Talaromyces spp.* han sido estudiadas concluyendo que son tolerantes para crecer y reproducirse de manera normal en ambientes contaminados, así como biodegradar HPAs y algunos metales pesados (Reyes-César *et al.*, 2014). Para el caso de *Trichoderma spp.*, se conocen diversas aplicaciones biotecnológicas como usos de biocontrol de fitopatógenos y la producción comercial de enzimas líticas, pero su uso en la biodegradación de xenobióticos es limitado (Zafra *et al.*, 2005). *Trichoderma harzianum* está asociado con la capacidad de metabolizar HAPs de alto y bajo peso molecular y cuenta con diversas características de importancia agrícola e industrial, sin embargo, también se ha descrito como tolerante a contaminantes recalcitrantes que incluyen metales pesados, pesticidas e hidrocarburos (Pernía *et al.* 2012).

Por lo que la biorremediación y la fitorremediación en asociación con microbios son tecnologías innovadoras que tienen el potencial de aliviar numerosos problemas de contaminación ambiental (Tripathi *et al.*, 2013). El éxito de la fitorremediación radica en la correcta identificación de especies, éstas deben contar con valores ecológicos y económicos deseables en los que se puedan aprovechar sus recursos sin que sean peligrosos para la salud y que a su vez produzcan cantidades aceptables de biomasa (Nungaray-Arteaga, 2014).

En las últimas décadas, gran biodiversidad de especies vegetales se han estudiado para la fitorremediación tanto en campo como en laboratorio, ya se han identificado 163 taxones de plantas, pertenecientes a 45 familias, tolerantes a xenobióticos orgánicos e inorgánicos (Nungaray-Arteaga, 2014). Entre las familias dominantes se encuentran: Asterácea, Brassicaceae, Caryophyllaceae (Cai *et al.*, 2010; Ajuru y Nmomo, 2017, Nguemte *et al.*, 2018), esta última, familia a la que pertenece *Gypsophila paniculata*, especie vegetal utilizada en esta investigación. *Gypsophila paniculata*, comúnmente llamada Nube, Velo de novia o Lluvia, es una planta herbácea de duración anual cultivada como ornamental

(Casierra-Posada *et al.*, 2010), ampliamente demandada en Puebla, principalmente en Día de muertos o como relleno de arreglos florales (Tlahuextl-Tlaxcalteca *et al.*, 2005).

Las plantas ornamentales no solo pueden embellecer nuestro medio ambiente, sino también remediar los suelos contaminados con petróleo, debido a que algunas de ellas pueden evitar la introducción del contaminante o sus metabolitos en su cadena alimenticia (Sharma *et al.*, 2018).

En este sentido, el objetivo de este trabajo de investigación fue desarrollar una tecnología agroecológica empleando técnicas de biorremediación (fitorremediación, bioaumentación y bioestimulación); para la utilización de suelos afectados con hidrocarburos en la producción de flor de ciclo corto en invernadero.

1.2 Planteamiento del problema

La contaminación de los suelos con hidrocarburos ha ido en aumento, especialmente en países en desarrollo (Ajuru y Nmom, 2017). En México existen suelos contaminados con hidrocarburos como consecuencia de fugas y derrames debido a la explotación, producción, refinación y transporte de petróleo causando deterioros al ambiente, especies vegetales, animales y en la salud humana (García-Torres *et al.*, 2011; Pernía *et al.*, 2012). Este tipo de siniestros ocurren principalmente en las zonas rurales, teniendo mayor efecto en las poblaciones dedicadas a la agricultura, provocando perjuicios socioeconómicos, pobreza alimentaria y marginación (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014). La contaminación de estos agroecosistemas también ocasiona afectaciones sobre los consumidores de alimentos que se siguen produciendo en dichos suelos. Aunque en el Estado de Puebla no hay datos fidedignos sobre número de derrames de combustible o áreas agrícolas afectadas por dicho fenómeno, es bien sabido que esta actividad delictiva ha ocasionado un problema no sólo económico-social, sino una grave catástrofe ambiental y de salud.

En Puebla, la problemática de robo y derrames de hidrocarburos ha sido aumentando de manera exponencial en los últimos años ya que existen gasoductos que atraviesan más de 25 de sus municipios (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014). El denominado Triángulo Rojo, se refiere a una región de robo de combustible en el Estado de Puebla; compuesta por los municipios de Acajete, Tepeaca, Acatzingo, Huixcolotla, Quécholac, Tecamachalco y Palmar de Bravo. Actualmente, esta actividad ilícita se ha convertido en uno de los principales ingresos económicos de los grupos del crimen organizado (Montero-Vieria, 2018). Puebla se encuentra en el primer lugar de número de tomas clandestinas entre enero del 2017 y diciembre 2018, con más de 1800 tomas reportadas (PEMEX, 2019).

Los hidrocarburos como gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea, lo que impide el correcto flujo del líquido vital y nutrientes en el suelo (Ortíz-Brito *et al.*, 2003). Se sabe que las propiedades físicas del suelo que son afectadas por la presencia de hidrocarburos son; la estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados, así como el aumento de la retención del agua en la capa superficial y el potencial hídrico. La difícil degradación de hidrocarburos se debe a su alto peso molecular y a que pueden ser adsorbidos por los ácidos húmicos del suelo (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2011).

La presencia de hidrocarburos modifica las propiedades físicas y químicas de los suelos (Vargas-Corredor y Pérez-Pérez, 2018), causando procesos de fitotoxicidad y alterando las comunidades microbianas. Medioambientalmente existe una gran preocupación debido a su resistencia a la biodegradación y su potencial de bioacumulación (Mata *et al.*, 2017), esto se debe a sus características recalcitrantes, tales como su compleja estructura molecular, baja solubilidad e hidrofobicidad (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2011). Lo preocupante de la contaminación por HPAs se debe a su potencial de acumulación, así como los casos ya estudiados de moléculas de hidrocarburos aromáticos con consecuencias mutagénicas y carginogénicas (Reyes-César *et al.*, 2014).

1.3 Justificación

Los impactos socio ambientales de los derrames de hidrocarburos en los agroecosistemas, obligan a buscar estrategias sustentables de saneamiento.

Las técnicas de remediación fisicoquímica conllevan a la destrucción del suelo, evitan la reutilización de los sitios produciendo pérdida de las funciones del mismo, así como la retención y filtración de agua o las necesidades básicas de las especies vegetales (Fayeulle *et al.*, 2019); sin embargo, las tecnologías de biorremediación; como la fitorremediación, la bioaumentación y la bioestimulación son considerados buenos sistemas de manejo agroecológico para la transformación de los compuestos xenobióticos, de forma segura y económica tanto en químicos y energía como en tiempo (Reyes-César *et al.*, 2014; Pastor-Mogollón, 2014).

La atenuación natural por la intemperie lleva décadas debido a la falta de oxígeno y nutrientes en el agua para los organismos microbianos (Chibueze *et al.*, 2016), en este sentido, la biorremediación ha brindado una oportunidad favorable debido a que es un proceso ecológico y rentable. Algunas de las especies microbianas utilizadas pueden digerir los hidrocarburos y utilizar el carbono compuesto resultante como fuente de carbono y energía para el crecimiento y la reproducción. Simultáneamente, los hidrocarburos se hidrolizan a partir de compuestos orgánicos tóxicos y complicados en compuestos inorgánicos no tóxicos y simples, como el CO₂ y el H₂O (Wang *et al.*, 2011). Por otro lado, la biorremediación también puede emplearse en áreas a las que no se puede llegar fácilmente sin excavación, usando tecnologías tanto *in situ* como *ex situ* (Kulshreshtha *et al.*, 2014).

El impacto de este trabajo de investigación radica obtener una ganancia económica con la producción de ornamentales, mientras su suelo contaminado es tratado (fitorremediación, bioaumentación), sin poner en riesgo al consumidor produciendo un alimento contaminado, y al mismo tiempo revalorizando los residuos agroindustriales como fuente de nutrición para el sistema agrícola (bioestimulación).

1.4 Objetivos

1.4.1 *Objetivo general*

Evaluar una tecnología agroecológica empleando técnicas de biorremediación (fitorremediación, bioaumentación y bioestimulación); para la utilización de suelos afectados con diésel y la producción de *Gypsophila paniculata* en invernadero.

1.4.2 *Objetivos específicos*

- Evaluar las características físicas y químicas del suelo impactado con diésel de la región de San Martín Texmelucan, Puebla, México, de acuerdo con la NOM-021-SEMARNAT-2000.
- Desarrollar las pruebas de biorremediación utilizando *Gypsophila paniculata*, SAP y hongos filamentosos.
- Evaluar los parámetros fisiológicos de *Gypsophila paniculata* (Índice de Calidad de Dikson, número de hojas, flores y botones; y contenido de clorofila).
- Evaluar las características físicas, químicas y la remoción de diésel en suelo biorremediado.

1.5 Hipótesis

Las tecnologías agroecológicas como la biorremediación permiten utilizar suelos contaminados con hidrocarburos en la producción de *Gypsophila paniculata* bajo condiciones de invernadero.

CAPÍTULO 2

Marco teórico

2. Marco Teórico

2.1 Manejo sostenible de agroecosistemas

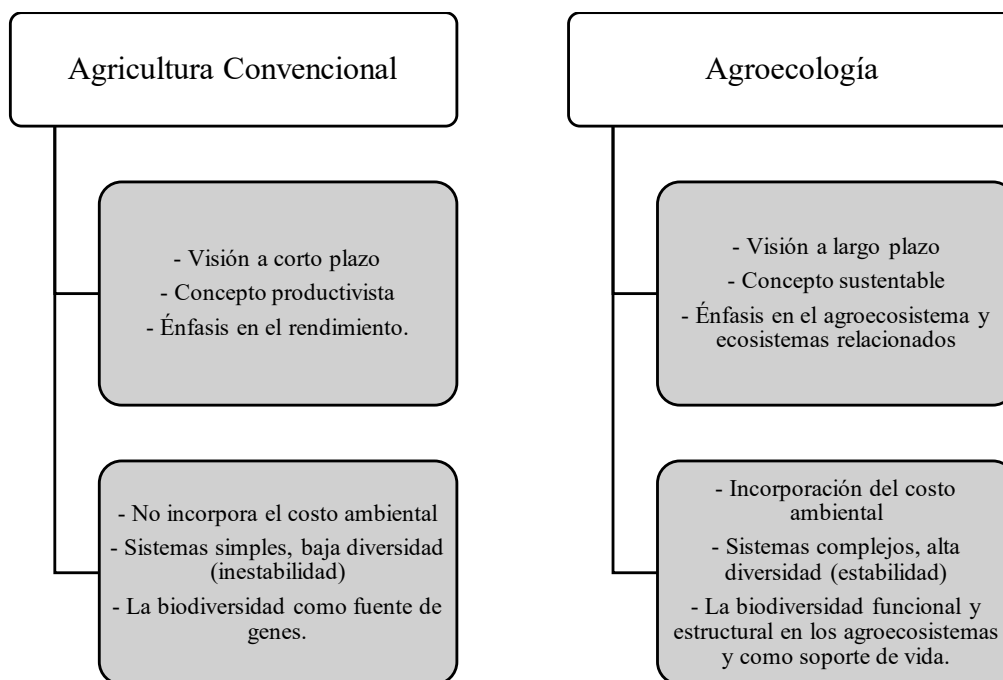
El manejo inadecuado de los materiales y residuos peligrosos ha provocado un grave problema de contaminación de los suelos y los cuerpos de agua a nivel global (Ortínez-Brito *et al.*, 2003). En México, el mal uso y el creciente número de tomas clandestinas en los oleoductos, ha causado una problemática grave de suelos contaminados con hidrocarburos, teniendo un impacto negativo en la salud humana y la economía de la región (Castro *et al.*, 2013). Estos siniestros dañan principalmente zonas rurales, teniendo mayor efecto en suelos agrícolas o agroecosistemas (Cavazos-Arroyo *et al.*, 2014).

Un agroecosistema se refiere al área que se ha transformado para favorecer el cultivo agrícola, en el cual intervienen, además de los factores naturales, las acciones humanas, culturales y de *praxis*, así como diversas tecnologías (Machado y Campos, 2008). Es decir, un ecosistema artificial ocasionado por la intervención humana (García-Céspedes *et al.*, 2016).

Los agroecosistemas contaminados presentan afectaciones en la salud ecosistémica, pérdidas en la integridad ecológica, manejo ineficiente de los recursos agua y suelo, así como dependencia a insumos externos (García-Álvarez, 2008; García-Céspedes *et al.*, 2014).

Los agroecosistemas altamente tecnificados utilizan la energía de forma ineficiente proveniente de fuentes no renovables como combustibles fósiles, hacen uso de prácticas intensivas del suelo que causan deterioro de sus propiedades productivas, así como agotamiento de agua, y afectaciones a la salud humana; por lo que la agricultura convencional no puede considerarse sustentable (García-Álvarez, 2008; Sarandón y Flores, 2014).

Las diferencias más importantes entre la agricultura convencional y la agroecología se muestran en la Figura 2.1., mientras que la Figura 2.2 resume las diferencias entre el enfoque productivista y la agroecología en la producción de alimentos.



*Figura 2.1. Diferencias entre la Agricultura convencional y la Agroecología**

**Adaptado de Sarandón y Flores, 2014.*

Enfoque Productivista	Enfoque Agroecológico
• Agrocultura Intensiva • Reduccionista • Falta de una óptica sistémica • Importancia de los componentes. • Reducción o mala definición de los límites del sistema. • Sólo reconoce al conocimiento científico. • Lo local es poco importante. • Uso exclusivo del territorio. • Minimiza aspectos socioculturales. • Principalmente basada en tecnologías de insumos. • Los científicos “generan” la tecnología.	• Agrocultura sustentable • Holístico • Existen varios modos de hacer agricultura • La ética como valor fundamental. • Empleo de una óptica sistémica • Importancia de las interrelaciones • Ampliación y redefinición de los límites del sistema. • Reconoce el conocimiento científico y otros. • Concepto pluriépistemológico • Lo local es importante: potencial endógeno • Uso múltiple del territorio: alimentos, turismo, paisaje, servicios ecológicos • Revaloriza aspectos socioculturales. • Principalmente basada en tecnologías de procesos. • Participación del agricultor en la generación de tecnología.

*Figura 2.2. Diferencias entre el enfoque productivista y el agroecológico**

**Adaptado de Sarandón y Flores, 2014.*

Durante años, se consideró que los intereses de la agricultura y la protección del medio ambiente eran contrapuestos, en la actualidad se corrobora que es posible conciliar ambas situaciones, auxiliándose de la gestión ambiental, para alcanzar el desarrollo sustentable (Altieri y Nicholls, 2007; García-Céspedes *et al.*, 2014).

En este sentido, es necesario crear un nuevo paradigma que proporcione soluciones partiendo de las interacciones del conocimiento científico y regional para una producción sustentable (Sarandón y Flores, 2014), emplear enfoques holísticos e integradores que encuentren los problemas ambientales en el contexto agrícola actual y logren el desarrollo de la actividad agrícola (García-Céspedes *et al.*, 2014).

El manejo agroecológico ha demostrado ser la única posibilidad para superar las limitaciones físicas, químicas y biológicas que se presentan como consecuencia de la agricultura convencional (Núñez, 2000). Este tipo de manejo de agroecosistemas requiere abordar estas interacciones de espacio como un tipo especial de ecosistema, donde existen interacciones de componentes físicos, biológicos y socioeconómicos, así como el impacto ambiental que éstos producen (Sarandón y Flores, 2014).

Según Sarandón y Flores (2014), para que la agricultura sea sustentable, debe cumplir los siguientes puntos:

- 1) Suficientemente productiva.
- 2) Económicamente viable a largo plazo y contabilizando todos los costos.
- 3) Ecológicamente adecuada, que conserve la base de recursos naturales y que preserve la integridad del ambiente en el ámbito local, regional y global.
- 4) Cultural y socialmente aceptable.

En los últimos años, la agroecología ha sido utilizada como una alternativa de manejo que permite una producción sostenible y de calidad, preservando los recursos naturales y el desarrollo rural, se fundamenta tanto en el conocimiento tradicional y local, así como por la disciplina científica (Labrador, 2008). Se trata de un nuevo campo de conocimientos, que se define como el enfoque o disciplina científica que reúne, sintetiza y aplica conocimientos de la agronomía, la ecología, la sociología, la etnobotánica y otras ciencias afines, teniendo una visión holística, sistémica y ética, para generar conocimientos adecuados para diseñar, manejar y evaluar agroecosistemas sustentables (Sarandón, 2002).

Puntualmente, la agroecología se refiere al uso de la ecología en los sistemas agrarios y tiene como objetivo el conocimiento de elementos y procesos claves que regulan el funcionamiento de los agroecosistemas, con el fin de establecer las bases científicas para una gestión eficaz de los sistemas agrarios en armonía con el ambiente (Sarandón y Flores, 2014; García-Céspedes *et al.*, 2016). La Agroecología incorpora también, la relación entre la agricultura, el ambiente global y las dimensiones sociales, económicas, políticas, éticas y culturales (Caporal y Costabeber, 2004).

Según Guzmán y colaboradores (2000), a Agroecología tiene los siguientes principios:

- Enfoque holístico y sistémico.
- Enfoque multidisciplinario
- Investigación-acción participativa
- Los actores del campo agricultores son sujetos y no sólo objetos del proceso de investigación.

Sarandón y Flores (2014), puntualizan que la agroecología tiene las siguientes características:

- Producción eficiente que toma en cuenta el costo ecológico y que promueva la conservación de los recursos naturales y la biodiversidad.
- Disminución de riesgo por fluctuaciones ambientales o de mercado.
- Mayor estabilidad y resiliencia en el tiempo.
- Degradación de los recursos naturales renovables a un ritmo menor o igual a su tasa de reposición o del desarrollo de tecnologías alternativas (cultural y socialmente aceptables).
- Aumento en la biodiversidad.
- Menor dependencia del uso de insumos externos.
- Uso eficiente de la energía.
- Eliminación de daño al ambiente, a otras especies, y/o a la salud de agricultores y consumidores.

2.1.1 Contaminación de agroecosistemas

El mal manejo de materiales peligrosos ha generado una problemática de contaminación de suelos, entre estos fenómenos, se destacan los producidos por la extracción y el manejo del petróleo y sus derivados en todos los países productores de hidrocarburos (Benavides *et al.*, 2006; García-López, 2006). Los derrames de hidrocarburos son considerados como

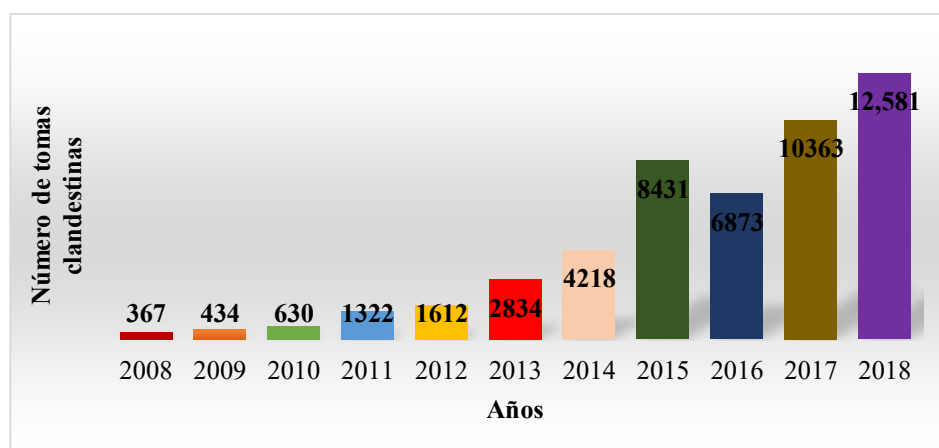
emergencias ambientales debido al riesgo para la salud humana y los recursos naturales (Flores-Puente *et al.*, 2004).

Los suelos agrícolas se han visto recientemente afectados por actividades antropogénicas y de delincuencia, explotación y robo de combustible (Chenaut, 2017). Los derrames de hidrocarburos suelen dañar suelos agrícolas ya que los oleoductos regularmente atraviesan comunidades rurales dedicadas en gran medida a esta actividad primaria, estos siniestros ocasionan pérdidas económicas y conflictos sociales, así como la inutilización de los suelos para la producción agrícola (Cavazos *et al.*, 2014).

México es un país petrolero y sus suelos se han visto contaminados por actividades de explotación y manipulación de esta industria, así como de robo de combustible. El robo de hidrocarburos es una conducta tipificada que consiste en la sustracción de combustible de las compañías encargadas de su transporte, almacenamiento y comercialización (Ángulo-Soto, 2019).

Los Estados con mayor número de reportes de tomas clandestinas y accidentes son: Puebla, Hidalgo, Guanajuato, Veracruz, Jalisco, Estado de México y Tamaulipas (PEMEX, 2019).

En el último reporte de PEMEX, del 2012 al 2018 se registraron más de 215 mil 215 derrames de combustible en el territorio mexicano, siendo la mayoría provocados por perforaciones y conexiones (tomas clandestinas) realizadas por delincuentes (González, 2019). En la Figura 2.3, se puede observar cómo el número de tomas clandestinas ha ido en aumento con cifras alarmantes.



*Figura 2.3 Tomas clandestinas a nivel Nacional por año (PEMEX, 2019)**

**Tomas clandestinas por denuncia anónima, PEMEX (2013)*

La presencia de hidrocarburos en los suelos cambia sus propiedades físicas, químicas, y las interacciones biológicas que por su naturaleza química son altamente tóxicos.

2.2 Química de hidrocarburos

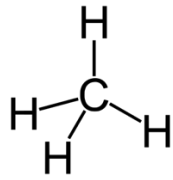
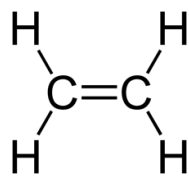
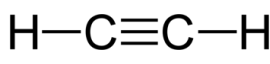
Los hidrocarburos contienen solo carbono e hidrógeno y se originan principalmente de fuentes antropogénicas (Suman *et al.*, 2015). Por su parte, los combustibles derivados de éstos son una mezcla compleja compuesta de una variedad de materiales, principalmente hidrocarburos saturados, compuestos aromáticos, asfaltenos y resinas (Tang *et al.*, 2012).

Según Ortíz-Brito (2003), los hidrocarburos se clasifican en:

- Hidrocarburos Biogénicos, son los que sintetizan plantas, animales, microbiota, plancton marino, diatomeas, y algas.
- Hidrocarburos Antrópicos, son los introducidos por la actividad humana, como los procesos de combustión industrial, combustibles fósiles y petróleo refinado.
- Hidrocarburos Alifáticos, compuestos de carbono e hidrógeno que forman solamente cadenas abiertas.
- Hidrocarburos Aromáticos policíclicos (HAP), se refieren a los producidos por las actividades humanas que están formados por dos o más anillos de benceno.

Los hidrocarburos alifáticos o de cadena abierta (Tabla 2.1), se dividen en función del enlace entre dos átomos de carbono; los alcanos son los conformados por un enlace simple, los alquenos por un enlace doble y alquinos de enlace triple (Buendía 2012).

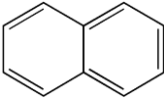
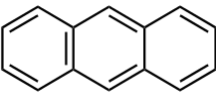
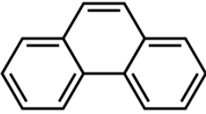
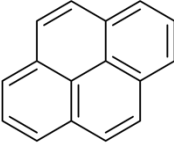
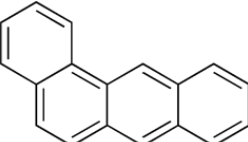
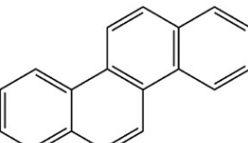
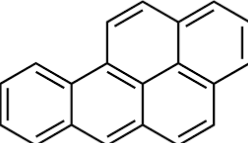
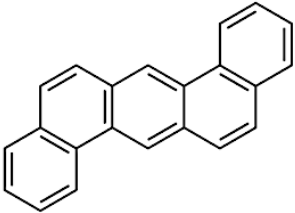
Tabla 2.1 Grupos de hidrocarburos alifáticos

NOMBRE	FÓRMULA	ESTRUCTURA
Alcano	C_nH_{2n+2}	
Alqueno	C_nH_{2n}	
Alquino	C_nH_{2n-2}	

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un gran grupo de productos químicos contaminantes persistentes en el medio ambiente conformados por 2 a 7 anillos aromáticos fusionados; éstos pueden dividirse en compuestos de bajo peso molecular, que consisten en menos de cuatro anillos, y compuestos de alto peso molecular con cuatro o más anillos (Vácha *et al.*, 2010; Ki-Hyun *et al.*, 2013; Yakovleva *et al.*, 2013; Mezzanotte *et al.*, 2015; Suman *et al.*, 2015; Rengarajan *et al.*, 2015).

Las propiedades físicas de los HAP varían con su peso molecular y estructura (Ki-Hyun *et al.*, 2013). La importancia de los HAP se relaciona con la movilidad que tienen debido a su peso molecular: los HAP de alto peso molecular son relativamente inmóviles y, por ende, de baja volatilidad y solubilidad (Ortínez-Brito, 2003). Los principales HAPs pueden observarse en la Tabla 2.2.

Tabla 2.2 Principales HAP*

NOMBRE	FÓRMULA	PESO	ESCRUTUCTURA
		MOLECULAR (g/mol)	
Naftaleno	C ₁₀ H ₈	128	
Antraceno	C ₁₄ H ₁₀	178	
Fenantreno	C ₁₄ H ₁₀	178	
Pireno	C ₁₆ H ₁₀	202	
Benzo[a]antraceno	C ₁₈ H ₁₂	228	
Criseno	C ₁₈ H ₁₂	228	
Benzo[a]pireno	C ₂₀ H ₁₂	252	
Dibenzo[a,h]antraceno	C ₂₂ H ₁₄	278	

*Tabla modificada de Ki-Hyun y colaboradores (2013).

Los HAP se consideran un grupo de compuestos peligrosos y tóxicos, clasificados como contaminantes prioritarios debido a que muchos de ellos han sido identificados como potentes carcinógenos y mutagénicos, capaces de bioacumularse en las cadenas alimentarias (Jianwang *et al.*, 2010; Yakovleva *et al.*, 2013; Mezzanotte *et al.*, 2015; Suman *et al.*, 2015). Debido a su alta toxicidad y su amplia distribución en el medio ambiente, incluidos el aire, el agua, los suelos y los sedimentos, la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos ha incluido algunos HAP como contaminantes prioritarios (Jianwang *et al.*, 2010; Yakovleva *et al.*, 2013). Y por su importancia ambiental, los HAP se enumeran como contaminantes prioritarios para su remediación (Sardar *et al.*, 2010).

Los hidrocarburos tienen una gran influencia en las propiedades físicas del suelo, tales como la permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica (Ortínez-Brito, 2003). Los HAP son contaminantes orgánicos persistentes que se distribuyen ampliamente en los suelos (Teng *et al.*, 2010). Las propiedades fisicoquímicas, la composición y la microbiota del suelo cambian con la presencia de hidrocarburos, la hidrofobicidad de estos compuestos los vuelve difícilmente extraíbles y biodisponibles para los microorganismos y otros receptores ecológicos (Tang *et al.*, 2012). Las características recalcitrantes de los hidrocarburos en el ambiente se deben a su densidad, presión de vapor, coeficiente de partición de suelo, polaridad, electronegatividad, hidrofobicidad y estabilidad química (Ortínez-Brito, 2003).

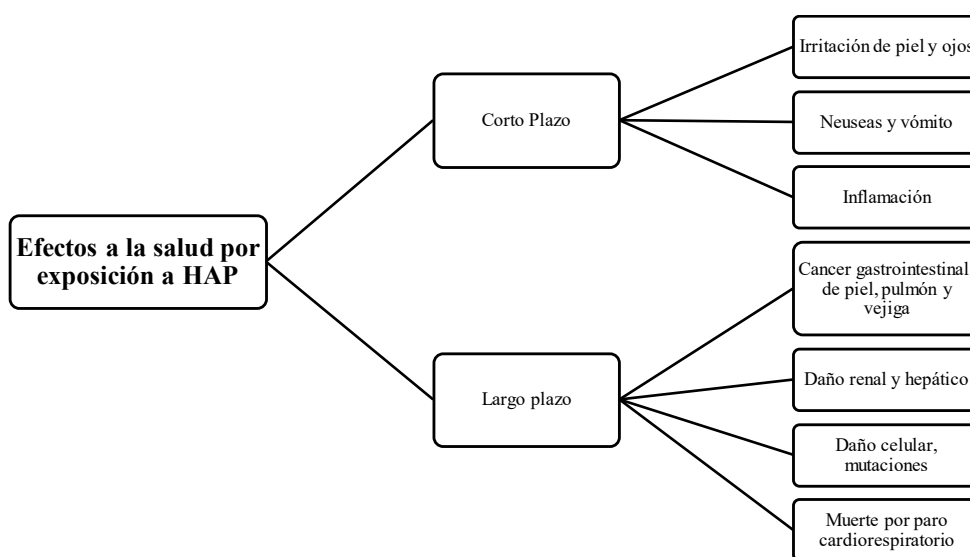
Los efectos tóxicos de los hidrocarburos en el ambiente dependen de la cantidad y composición del combustible derramado, así como el tiempo de exposición, la temperatura, humedad y oxígeno del suelo (Ki-Hyun *et al.*, 2013; Velásquez *et al.*, 2015). Los compuestos orgánicos ligeros como gasolinas, aceites y petróleo crudo tienden a formar una capa en forma de nata en el nivel freático y se mueven horizontalmente en dirección al flujo del agua subterránea. Los compuestos orgánicos densos, migran hacia la base del acuífero creando una columna a partir de la cual pueden moverse en dirección del flujo del agua subterránea, contaminando así el acuífero en toda su profundidad (Sardar *et al.*, 2010).

La determinación y monitoreo de los HAP en muestras ambientales es necesaria e importante para la salud humana (Jianwang *et al.*, 2010) ya que los HAP afectan a los organismos a través de diversas acciones tóxicas, haciendo interferencia con la función normal de las membranas celulares, así como con los sistemas enzimáticos asociados con la membrana

(Rengarajan *et al.*, 2015). Además, se ha demostrado que algunos HAP tienen efectos cancerígenos y mutagénicos y son inmunosupresores potentes (Rengarajan *et al.*, 2015).

La exposición a altos niveles de mezclas contaminantes que contienen HAP, también produce síntomas como irritación ocular, náuseas, vómitos, diarrea y confusión, inflamación y alergia tóxica (Teng *et al.*, 2010), mientras que los HAP más pesados son los más tóxicos y carcinogénicos; entre ellos se encuentran el benzo[a]pireno y dibenzo[a,h]antraceno (Ki-Hyun *et al.*, 2013).

En la Figura 2.3 Se muestran los efectos que la exposición a HAP provoca en la salud humana.



*Figura 2.4 Efectos a la salud por exposición a HAP**

**Diagrama modificado de Ki-Hyun y colaboradores (2013).*

Por las características recalcitrantes y peligrosas que presentan los HAP, se han estudiado y desarrollado una serie de procesos físicos, químicos y biológicos que permiten limpiar los suelos de éstos compuestos orgánicos xenobióticos. Algunas de ellas se describen en el siguiente apartado.

2.3 Técnicas de recuperación de suelos

Las tecnologías de recuperación de suelos comprenden cualquier operación unitaria que altere la composición de un contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2001).

Cualquier técnica de remediación de suelos se clasifica de acuerdo su modo de empleo en *in situ* y *ex situ*. Las técnicas *in situ* se refieren a las realizadas en el sitio contaminado, son de menor costo y de bajo impacto ambiental. Por otro lado, las técnicas *ex situ* comprenden las tecnologías que retiran el suelo contaminado del ecosistema y lo tratan en otro espacio, destacan por su efectividad, dado que el suelo contaminado es físicamente eliminado y el suelo nuevo que se incorpora se homogeniza, aunque tienen un costo elevado (Boupojp *et al.*, 2017).

En la Tabla 2.3 Se presentan los tratamientos físicos y químicos clasificados por *in situ* y *ex situ* más empleados para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos. La Tabla 2.4 muestra los tratamientos biológicos de remediación de suelos con la misma clasificación.

Tabla 2.3 Técnicas físicas y químicas de recuperación de suelo

CLASIFICACIÓN	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>In situ</i>	Lavado de suelo	Uso de detergentes y/o agua para lavar el suelo y separarlo del hidrocarburo, sin embargo, el costo es muy elevado.	Ortínez-Brito <i>et al.</i> , 2003
	Extracción de vapores	Los compuestos volátiles se remueven del suelo en fase mediante la obtención de un gradiente de presión y concentraciones. Los gases extraídos requieren tratamiento y disposición final.	Coria, 2007
	Surfactantes	Debido a su alta solubilidad, movilizan los hidrocarburos adsorbidos o no absorbidos al suelo, sin embargo, inhiben la actividad microbiológica.	Riojas-González <i>et al.</i> , 2010

Continuación Tabla 2.3 Técnicas físicas y químicas de recuperación de suelo

CLASIFICACIÓN	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>In situ</i>	Estabilización	Imoviliza los contaminantes mediante la microencapsulación, los componentes quedan atrapados en el interior de la estructura cristalina de la matriz solidificada a nivel microscópico. Los materiales se degradan a partículas más pequeñas y la mayor parte del residuo peligroso permanece atrapado.	Méndez-López, 2008
	Separación electrocinética	Esta técnica también es llamada electrorremediación, se basa en la generación de un campo eléctrico a partir de una corriente directa. Un electrodo y un electrolito son colocados en el suelo, posteriormente, el contaminante se transporta hacia los pozos donde será extraído.	De la Rosa-Pérez <i>et al.</i> , 2007
<i>Ex situ</i>	Incineración	El suelo contaminado es sometido a temperaturas de 1200 °C para que los contaminantes se evaporen y se quemen bajo condiciones controladas. La disposición final puede hacerse en hornos de cemento por valorización que permite una eliminación segura de pasivos ambientales.	Coria, 2007
	Desorción térmica	El suelo es llevado a temperaturas altas para volatilizar los contaminantes contenidos en su matriz sólida.	Mendoza <i>et al.</i> , 2005
	Oxido-reducción	Son reacciones reversibles que transforman xenobióticos en variantes menos tóxicos por medio de la transferencia de electrones. Los contaminantes reducidos ganan electrones, y el dador de electrones se oxida.	Martín-Moreno <i>et al.</i> , 2004
	Deshalogenación química	Los contaminantes con cloro y flúor son convertidos en sustancias menos tóxicas mediante reacciones de deshalogenación que eliminan o sustituyen dichos halógenos volviendo la molécula menos tóxica.	López-Martínez <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2.4 Técnicas biológicas de recuperación de suelo

CLASIFICACIÓN	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>In situ</i>	Fitorremediación	Consiste en el uso de plantas para la descontaminación, haciendo uso de los sistemas radiculares y tejidos aéreos	Boupojp <i>et al.</i> , 2017
	Bioestimulación	Proceso que añade nutrientes y oxígeno para estimular la microbiota existente involucrada en la biorremediación. Es un proceso de optimización de la condición del entorno del sitio de remediación.	Thapa <i>et al.</i> , 2012
	Bioaumentación	Se refiere a la adición de una cepa o consorcio microbiano pre adaptado, así como microorganismos genéticamente modificados que favorezcan el proceso de biorremediación.	Tyagi <i>et al.</i> , 2010
	Bioventeo	Se basa en la extracción de vapores del suelo mediante una diferencia de presión generada por el bombeo de aire desde el exterior, se aplica en suelos con baja concentración de contaminantes. Es una técnica de bajo costo y mínimo impacto.	Megharaj <i>et al.</i> , 2010

Continuación Tabla 2.4 Técnicas biológicas de recuperación de suelo

CLASIFICACIÓN	TÉCNICA	DESCRIPCIÓN	REFERENCIA
<i>Ex situ</i>	Landfarming	Es la construcción de “unidades de tratamiento” o “celdas de tratamiento”, que evitan el transporte de los hidrocarburos hacia otras áreas por infiltración.	Mmom & Deekor, 2010
	Biopilas	Son sistemas cerrados que mantienen la temperatura para evitar la saturación de agua de lluvias, disminuir la evaporación de la misma y de los contaminantes volátiles.	Anza-Cruz <i>et al.</i> , 2016
	Compostaje	El compost es utilizado debido a que tiene facultad de sostener poblaciones microbianas que degradan los hidrocarburos mineralizándolos hasta CO ₂ o fijándolos en dicha matriz sólida.	Visitación-Figueroa <i>et al.</i> , 2016
	Biodegradación en reactor	Los biorreactores son sistemas que involucran la interacción entre una fase gaseosa, una sólida (suelo o sedimento) y una fase acuosa donde se encuentran microorganismos degradadores en suspensión.	Medina-Moreno, <i>et al.</i> , 2015

2.4 Biorremediación

Debido a que las tecnologías correctivas basadas en ingeniería son costosas y perjudiciales, existe un creciente interés en desarrollar nuevas tecnologías de remediación que sean sustentables (Sardar *et al.*, 2010). La biorremediación es método alternativo económico y eficiente a procesos químicos o físicos de remediación (Xiaojun *et al.*, 2007; Thapa *et al.*, 2012).

Por definición, la biorremediación es el uso de organismos como bacterias y hongos o plantas, para degradar los contaminantes ambientales en formas menos tóxicas para la salud y el medio ambiente (Megharaj *et al.*, 2010; Medina-Moreno, *et al.*, 2015; Anza-Cruz *et al.*, 2016; Boupojp *et al.*, 2017).

Dentro de las tecnologías de biorremediación encontramos la bioestimulación, la bioaumentación y la fitorremediación, que se describen a continuación.

2.4.1 Bioestimulación

La biodegradación de hidrocarburos en el suelo puede estar limitada por muchos factores, incluidos nutrientes, pH, temperatura, humedad, oxígeno, propiedades del suelo y presencia de contaminantes (Tyagi *et al.*, 2010). En el ecosistema natural, diferentes especies de organismos atacan a los diferentes sustratos que están presentes, y la tasa de degradación se vuelve máxima cuando hay un buen suministro de nutrientes en el suelo (Rhodes, 2014).

La bioestimulación implica la modificación del medio ambiente para estimular la microbiota autóctona implicada en el proceso de biorremediación (Mancera-López *et al.*, 2007; Dias *et al.*, 2010; Zawierucha & Malina, 2011; Nápoles *et al.*, 2015). Esto se puede hacer mediante la adición de varias formas de nutrientes limitantes y aceptores de electrones, como fósforo, nitrógeno, oxígeno o carbono (Thapa *et al.*, 2012).

2.4.2 Bioaumentación

Debido a su biodiversidad y su potencial catabólico, los microorganismos se han aprovechado a gran medida para la biodegradación de compuestos tóxicos (Boupojp *et al.*, 2017).

La bioaumentación se refiere a la inoculación de microorganismos que tengan la capacidad de degradar el contaminante y mejorar el proceso de biodegradación (Okparanma *et al.*, 2011; Azizi *et al.*, 2013). La microbiota utilizada en la bioaumentación, puede ser autóctona del sitio contaminado o puede aislarse de otro lugar (Kumar *et al.*, 2011).

Esta técnica es utilizada en sitios que no cuentan con suficiente población microbiana y/o la población nativa no posee las rutas metabólicas necesarias para degradar los compuestos en cuestión (Tyagi *et al.*, 2010).

La bioaumentación ha sido ampliamente estudiada para la degradación de contaminantes tanto orgánicos como inorgánicos, y se ha utilizado una gran variedad de bacterias y hongos; el uso de estos últimos para la limpieza de sitios contaminados es un proceso denominado microrremediación.

2.4.2.1 Microrremediación

Los hongos solos o en sinergia con bacterias y plantas muestran diversas características y componentes importantes para las biotecnologías de remediación de suelo, agua y aire contaminados (Harms *et al.*, 2011). Estos microorganismos son importantes en el entorno

natural debido a la descomposición, transformación y ciclado de nutrientes (Pérez-Álvarez *et al.*, 2017). Los hongos han demostrado potencial para la eliminación de metales, degradación y mineralización de fenoles, hidrocarburos aromáticos policíclicos, insecticidas, pesticidas, colorantes, biopolímeros y otras sustancias (Rhodes, 2014; Yussuf *et al.*, 2016; Varjani & Patel, 2017).

La micoremediación es una tecnología nueva que utiliza cepas fúngicas para la limpieza de ambientes contaminados (Okparanma *et al.*, 2011; Bhandari, 2017). Es una técnica rentable, que no produce subproductos tóxicos y por acción de la mineralización completa de los contaminantes, otorga una solución permanente a la problemática de contaminación (Hamba & Tamiru, 2016; Rhodes, 2014).

2.4.2.2 Mecanismos de micorremediación de hidrocarburos

Los microorganismos poseen estrategias de adaptación como la capacidad de modificar su membrana celular para mantener las funciones biológicas necesarias, la producción de compuestos tensoactivos como biosurfactantes y del uso de bombas de flujo para disminuir la concentración de compuestos tóxicos dentro de las células (Tyagi *et al.*, 2010). La capacidad microbiana de degradar compuestos orgánicos se ha estudiado en los últimos años, existen microorganismos capaces de degradar pesticidas e hidrocarburos; desde alcanos hasta compuestos poliaromáticos, y se ha concluido que algunas de ellas usan estos contaminantes como su única fuente de carbono y energía (Kumar *et al.*, 2011).

Los hongos tienen una ventaja sobre los organismos unicelulares ya que son capaces de solubilizar los sustratos insolubles mediante la producción de enzimas extracelulares (Figura 2.4 y 2.5) (Hamba & Tamiru, 2016). Los hongos de podredumbre blanca son utilizados en la biotecnología como agentes de biorremediación debido a su capacidad para degradar una amplia gama de xenobióticos recalcitrantes que tienen estructura similar a la lignina, como los hidrocarburos. Los también llamados hongos lignocelulósicos, secretan enzimas como lignina peroxidasas, manganeso peroxidas y las lacasas que oxidan compuestos recalcitrantes como los HAP y producen H_2O_2 (Harms *et al.*, 2011; Yussuf *et al.*, 2016; Prakash, 2017; Varjani & Patel, 2017). El micelio fúngico exuda enzimas extracelulares y ácidos que pueden descomponer la lignina y la celulosa, a medida que el hongo descompone la madera y las

hojas, se forma un material rico llamado humus, descomponiendo los metabolitos hasta CO_2 (Rhodes, 2014; Enshasy *et al.*, 2017).

Los hongos tienen dos tipos de sistemas enzimáticos extracelulares; el sistema hidrolítico, que produce hidrolasas responsables de la degradación de los polisacáridos y un sistema ligninolítico oxidativo y extracelular único, que degrada la lignina y rompe los anillos de fenilo (Prakash, 2017).

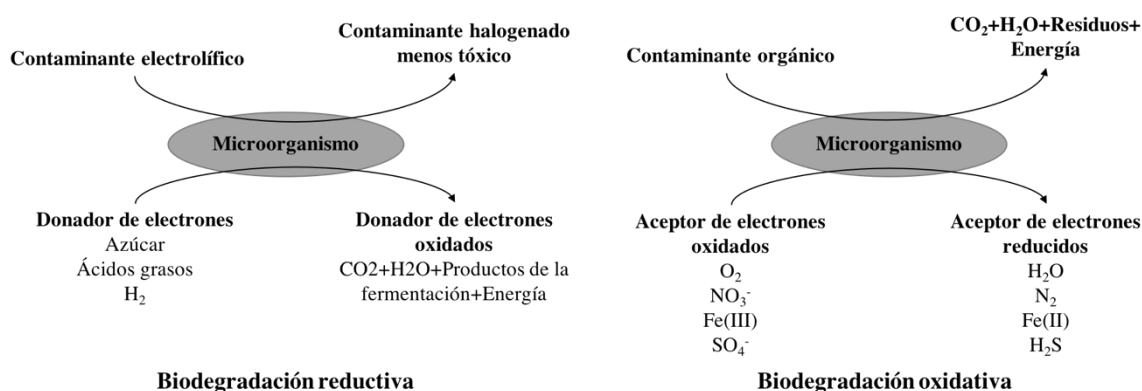


Figura 2.5 Proceso general de biodegradación de contaminantes orgánicos*

*Adaptado de Tyagi *et al.*, (2010)

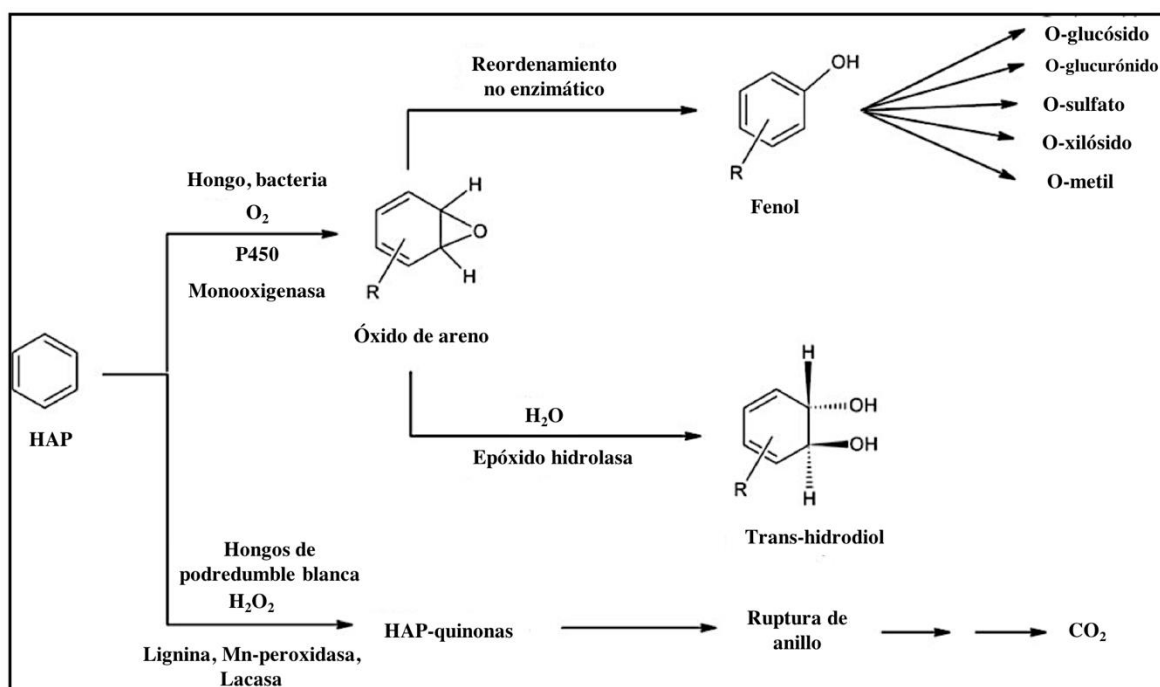


Figura 2.6 Etapas iniciales de la ruta de microrremediación de HAP*

*Adaptado de Prakash (2017)

En la Figura 2.6 se observa que el ataque inicial de contaminantes puede ocurrir extracelular o intracelularmente, los metabolitos generados durante la oxidación de contaminantes extracelulares pueden estar sujetos a catabolismo intracelular o pueden formar residuos unidos de los constituyentes del suelo. Por otro lado, los metabolitos que surgen del ataque inicial intracelular pueden excretarse y luego pueden sufrir reacciones enzimáticas extracelulares adicionales o formar residuos unidos a través del acoplamiento oxidativo abiótico. También pueden secretarse en forma de conjugados o pueden sufrir más catabolismo intracelular. Esto puede resultar en mineralización o, nuevamente, en excreción de metabolitos en varias etapas de oxidación si se impide la oxidación posterior (Harms *et al.*, 2011).

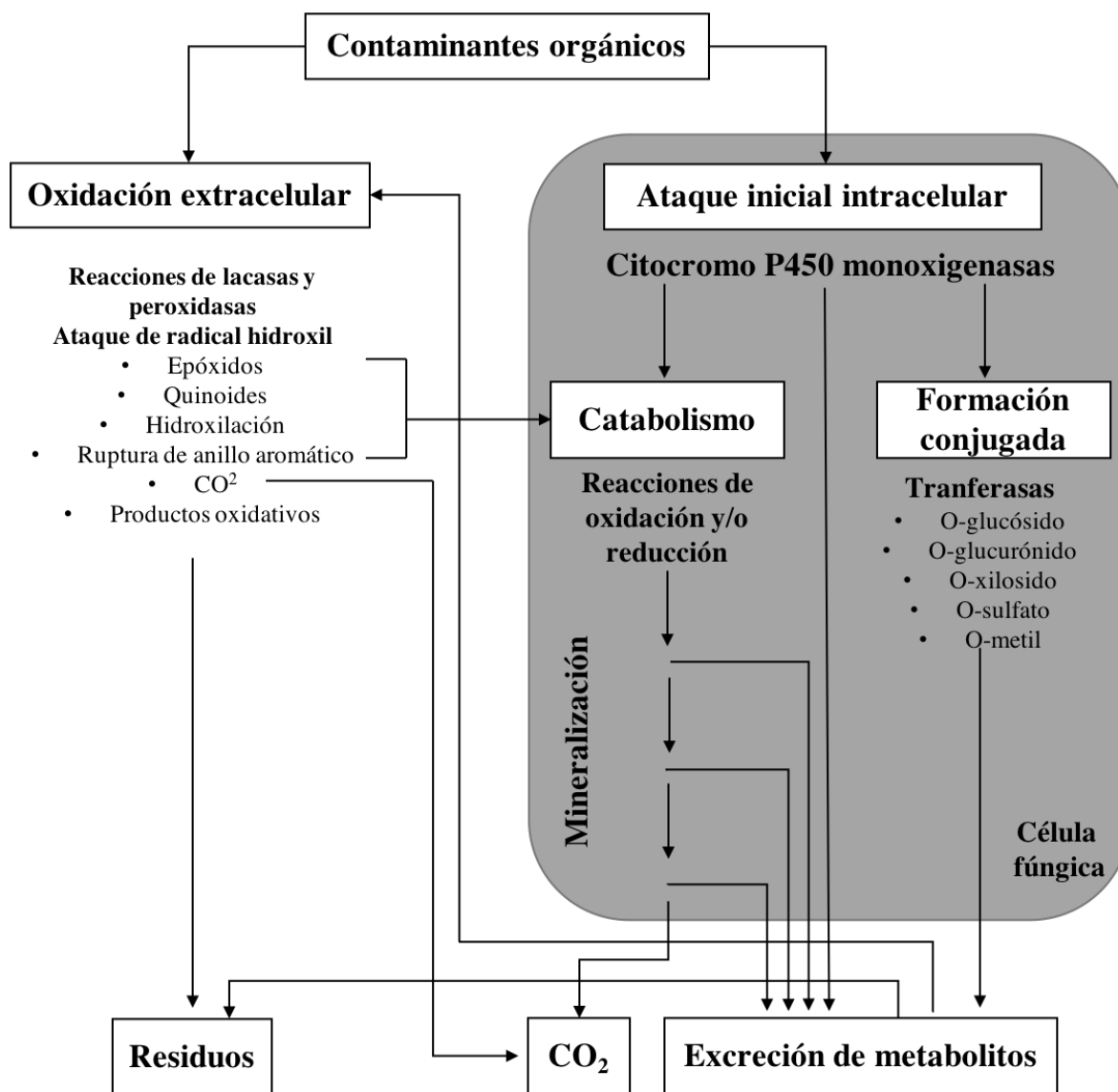


Figura 2.7 Principales métodos de micorremediación de contaminantes orgánicos*

*Adaptado de Harms et al., (2011)

Lacasas

Las lacasas son enzimas producidas por basidiomicetos y ascomicetos, son parte de la familia de las oxidasas azules de cobre múltiple que catalizan el electrón de cuatro moléculas de sustrato reductor durante la oxidación de una serie de sustratos aromáticos con la reducción de oxígeno molecular en agua (Harms et al., 2011). Estas enzimas son capaces de degradar la lignina en ausencia de peroxidasas (Enshasy et al., 2017).

Debido a su amplia especificidad de sustrato y al hecho de que usan oxígeno molecular como aceptor final de electrones en lugar de peróxido de hidrógeno como lo usan las peroxidases, las lacasas son enzimas muy utilizadas en la biorremediación (Prakash, 2017).

La ingeniería genética es otra estrategia que se puede utilizar para mejorar las características catalíticas de las lacasas y permitir la producción rentable de las lacasas en hospedadores homólogos o heterólogos; los ascomicetos son más susceptibles a la manipulación genética que los basidiomicetos (Harms *et al.*, 2011).

Las lacasas difieren de la lignina peroxidasa y la manganeso peroxidasa en su capacidad para continuar su actividad oxidativa en ausencia de H₂O₂ (Enshasy *et al.*, 2017).

Peroxidasas y oxidoreductasas

Los hongos presentan enzimas catabólicas intracelulares y oxidoreductasas extracelulares que permiten la degradación de compuestos recalcitrantes (Figura 2.5), las ligninas peroxidases son capaces de mineralizar una variedad de compuestos aromáticos recalcitrantes (Prakash, 2017). Las oxidoreductasas extracelulares son enzimas que apoyan el crecimiento de hongos en sustratos recalcitrantes de estructura aleatoria como la lignocelulosa a través de la despolimerización y eliminación de la lignina y sus derivados de sustancias húmicas (Harms *et al.*, 2011).

Citocromo P450

Las oxidasas del citocromo P450 de función mixta catalizan las epoxidaciones e hidroxilaciones de numerosos contaminantes, la presencia de múltiples genes que codifican el citocromo P450 contribuye a la enorme versatilidad catabólica de los hongos ligninolíticos (Harms *et al.*, 2011).

El citocromo P450 puede iniciar el metabolismo de dioxinas, nonilfenol y HAP en estos organismos, sin embargo, el hecho de que las oxidoreductasas extracelulares también pueden oxidar tales contaminantes plantea la cuestión de si un ataque primario intracelular o extracelular sobre contaminantes predomina en una situación ambiental particular, ya que esto podría influir en la expresión de enzimas degradantes (Kulshreshtha *et al.*, 2014; Bautista-García *et al.*, 2017).

2.4.3 Fitorremediación

La fitorremediación se define como el uso de plantas y sus microorganismos asociados para la limpieza ambiental de contaminantes orgánicos o inorgánicos (Afzal *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2012; Shahsavari *et al.*, 2015). Ésta técnica de remediación de suelos, es una herramienta rentable y ecológicamente compatible para la limpieza ambiental de una amplia gama de contaminantes como hidrocarburos de petróleo, solventes clorados, pesticidas y metales (Srujana & Khan, 2011).

Las plantas y la microflora de la rizosfera se ocupan de los contaminantes a través de una gama de mecanismos que incluyen fitodegradación, fitovolatilización, fitoextracción, fitoextracción, fitoestabilización y rizodegradación (Figura 2.7).

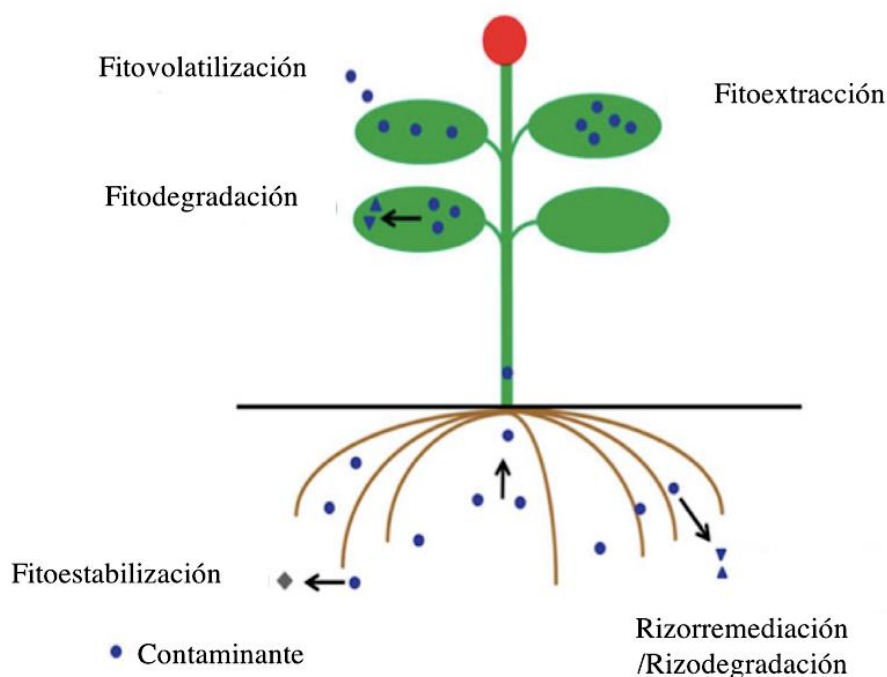


Figura 2.8 Mecanismos de fitorremediación*

*Adaptado de Shahsavari *et al* (2015)

Fitovolatilización

En la fitovolatilización, el tejido vegetal absorbe ciertos contaminantes y luego los libera en forma volátil al aire, puede usarse para la eliminación del suelo de compuestos orgánicos volátiles (Shahsavari *et al.*, 2015). Algunos hidrocarburos bajo peso molecular pueden liberarse a la atmósfera a través de procesos de transpiración por fitovolatilización (Yavari *et al.*, 2015).

Para la eliminación de compuestos de bajo peso molecular del suelo, se utiliza la fitovolatilización, una técnica en la que las plantas volatilizan contaminantes que se convierten biológicamente en gases y las liberan a través de las hojas en un proceso de evapotranspiración (Oliveira, *et al.*, 2014).

Los compuestos no volátiles pueden ser secuestrados en los tejidos de la raíz mediante modificación enzimática o almacenados en la vacuola o en las paredes celulares, este proceso es llamado fitoacumulación (Yavari *et al.*, 2015).

Fitoextracción

La fitoextracción implica la introducción de plantas hiperacumuladores en sitios contaminados, este proceso involucra el cultivo repetido de plantas en suelo contaminado hasta que la concentración de contaminante disminuya a niveles aceptables (Oliveira, *et al.*, 2014). En éste proceso, después de la cosecha, la biomasa contaminada es tratada antes de su eliminación en vertederos, incineración o procesos de conversión termoquímica (Srujana & Khan, 2011).

Fitodegradación

La fitodegradación se refiere al uso de enzimas degradativas producidas por el tejido vegetal que permite transformar los contaminantes orgánicos en compuestos no tóxicos que pueden moverse dentro de las plantas (Shahsavari *et al.*, 2015). Algunos compuestos orgánicos pueden ser directamente degradados y completamente mineralizados por enzimas vegetales a través de la fitodegradación (Glick, 2010).

Fitoestabilización

La fitoestabilización es la capacidad de las plantas para producir enzimas que transformen los contaminantes orgánicos y reduzcan su biodisponibilidad (Yavari *et al.*, 2015). Este proceso reduce la movilidad y el potencial de migración de contaminantes en el suelo (Srujana & Khan, 2011).

Se trata de la capacidad de las plantas para reducir la biodisponibilidad de los contaminantes inmovilizándolos en el suelo y reduciendo y evitando la migración al agua o al aire (Oliveira, *et al.*, 2014).

Rizodegradación/Rizorremediación

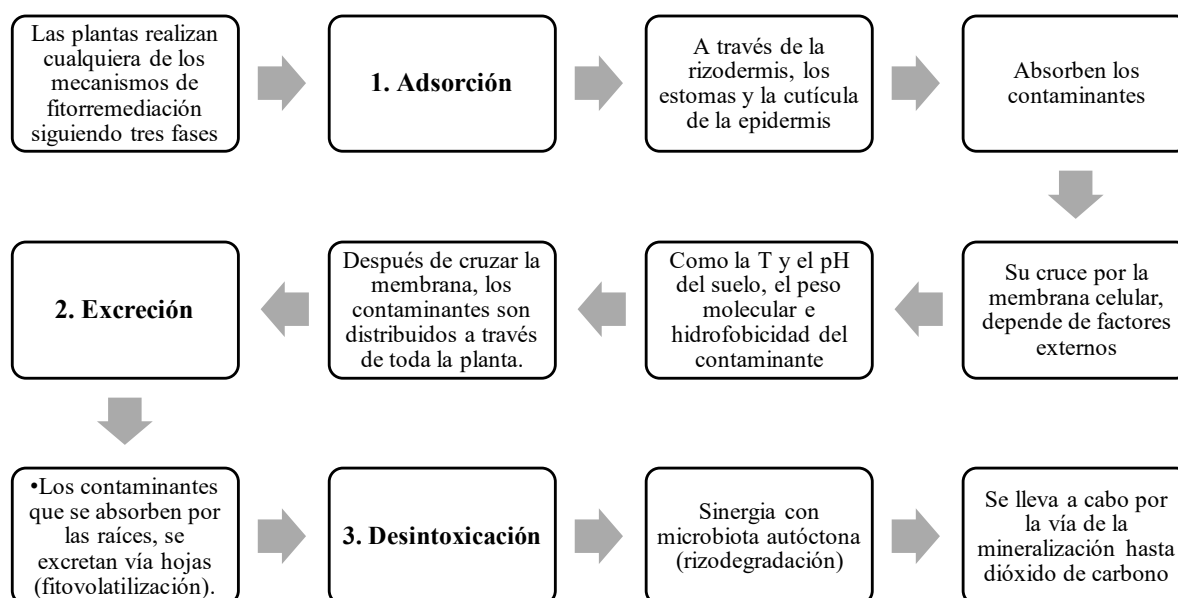
La rizofiltración es una técnica de remediación que implica la absorción de contaminantes por las raíces de las plantas (Srujana & Khan, 2011; Bramley *et al.*, 2014), puede ocurrir naturalmente, o puede lograrse deliberadamente mediante la introducción de microbios específicos, estos microbios pueden ser degradantes de contaminantes y/o pueden promover el crecimiento de las plantas en condiciones de estrés (Maqbool *et al.*, 2012).

El uso de plantas y la microbiota de su rizosfera para la eliminación de contaminantes del medio ambiente se basa en el aumento del número de población microbiana en la rizosfera y la estimulación de su actividad metabólica (Oliveira, *et al.*, 2014). Las plantas proporcionan exudados radicales ricos en fuentes de carbono, nutrientes, enzimas y oxígeno, creando un ambiente favorable en el que se estimula la actividad microbiana, estas interacciones no se limitan a la rizosfera; más bien, se extienden al interior de la planta (Bramley *et al.*, 2014). Los exudados de las raíces de las plantas son azúcares, ácidos orgánicos y compuestos aromáticos, ricos en carbono y energía para el crecimiento de microorganismos, estos exudados pueden iniciar la respuesta quimiotáctica de los microbios para la colonización de la raíz, lo que estimula la degradación de los contaminantes orgánicos (Yavari *et al.*, 2015). Son pocos los procesos de degradación que ocurren directamente en los tejidos vegetales, la mayoría son el resultado de la asociación de raíces, exudados de raíces, rizosfera y microbiota, este proceso es denominado como rizorremediación (Megharaj *et al.*, 2010). La fisiología específica y la bioquímica de las raíces de las plantas junto con la actividad de los microorganismos de la rizosfera hacen que los sistemas metabólicos de las plantas sean capaces de remediar los xenobióticos como los hidrocarburos (Bramley *et al.*, 2014).

Los contaminantes orgánicos como los hidrocarburos son degradados mediante el mecanismo de fitodegradación o rizodegradación, actualmente, la técnica de rizoremediación es más frecuente y afecta tanto a las plantas como a sus microbios rizosféricos asociados (Maqbool *et al.*, 2012).

2.4.3.1 Mecanismos de fitorremediación de hidrocarburos

Las plantas tienen diferentes mecanismos para la eliminación o degradación de los hidrocarburos (Yavari *et al.*, 2015), y realizan cualquiera de los mecanismos de fitorremediación descritos anteriormente, siguiendo tres etapas (Figura 2.8).



*Figura 2.9 Etapas en la fitorremediación**

*Adaptado de Srujana & Khan (2011)

Después de la absorción de la raíz, los hidrocarburos pueden experimentar diferentes destinos (Glick, 2010). Los compuestos no volátiles pueden ser secuestrados en los tejidos de la raíz mediante la modificación enzimática, también se almacenan en la vacuola o en las paredes celulares de la planta (Yavari *et al.*, 2015). Antes de que el contaminante sea translocado por la corriente de transpiración en el xilema a otros tejidos de la planta, éste ingresa al sistema simple para superar las barreras de las tiras casparianas suberizadas en la endodermis de la raíz donde se produce la desintoxicación y el metabolismo (Srujana & Khan, 2011).

Las plantas liberan enzimas de raíces como la deshalogenasa, nitroreductasa, peroxidasa y lacasa, que juegan un papel importante en la reducción de contaminantes orgánicos (Maqbool *et al.*, 2012). Los productos finales de la degradación de hidrocarburos incluyen alcohol, ácidos, dióxido de carbono y agua primarios (Glick, 2010).

Según Srujana & Khan (2011), el proceso de fitorremediación consta de principalmente cuatro etapas. La primera etapa, la absorción de compuestos orgánicos del suelo y el agua. La segunda etapa de trata de la acumulación o procesamiento de estos productos químicos mediante lignificación, volatilización, metabolización, mineralización. La tercera etapa, el uso de enzimas para descomponer moléculas orgánicas complejas en moléculas más simples hasta llegar a dióxido de carbono y agua. La cuarta etapa consta en aumentar el contenido de carbono y oxígeno del suelo alrededor de las raíces para promover la actividad microbótica y la descomposición de los tejidos de la raíz.

Bramley y colaboradores (2014), describieron la descomposición de los hidrocarburos a través de la rizodegradación como un proceso de dos partes. En primer lugar, la planta proporciona exudados de las raíces como enzimas, azúcares simples, aminoácidos, alifáticos y aromáticos que estimulan el crecimiento de microorganismos asociados a las raíces, mientras que el crecimiento de la raíz también puede extenderse a un suelo más profundo, permitiendo el acceso al aire y al agua, cambiando así la concentración de dióxido de carbono, el pH, el potencial redox, el potencial osmótico, el contenido de humedad y la concentración de oxígeno del suelo, lo que conduce a un entorno mejor capacitado para soportar alta biomasa microbiana.

López-Martínez *et al.* (2005), detallaron el proceso de fitorremediación en las siguientes etapas:

- *Etapa I Mecanismos.* Ocurren reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis, donde los contaminantes orgánicos pierden parte de su estructura dando lugar a metabolitos polares e hidrosolubles. Estos procesos son posibles gracias a que las células vegetales poseen sistemas enzimáticos localizados en el retículo endoplásmico que; 1) introducen en la molécula xenobiótica un átomo de oxígeno por acción de oxigenasas, y 2) Los citocromos P450 (CYTP450) que catalizan reacciones de hidroxilación, desaminación, desulfuración, epoxidación, peroxigenación y reducción (Figura 2.9).

- *Etapa 2 Fases que participan en la fitorremediación.* Carbohidratos, aminoácidos, péptidos y proteínas son unidos al contaminante por reacciones catalizadas por transferasas, los contaminantes conjugados son acumulados en las vacuolas de la célula vegetal donde son fácilmente sometidos a oxidaciones posteriores.
- *Etapa 3 Interacciones planta-microorganismo.* Los xenobióticos orgánicos atrapados en las vacuolas son atacados por enzimas como alcohol deshidrogenasas, aldehído deshidrogenasas, carbonil reductasas, quinona reductasa, fenoloxidasas, preroxidasas, lacasas, monoxigenasas dependiente de CYTP450 amino Nmetiltransferasa, alcohol sulfotransferasa, entre otras, convierten los contaminantes en aldehídos y por último en ácidos (Figura 2.10).

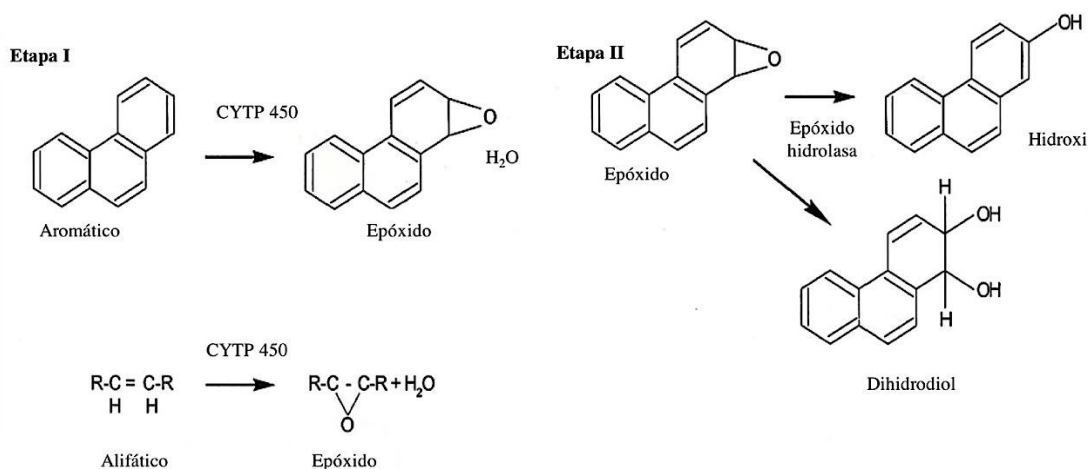


Figura 2.10 Reacciones microsómicas en la fitorremediación de hidrocarburos*

*Adaptado de López-Martínez et al. (2015)

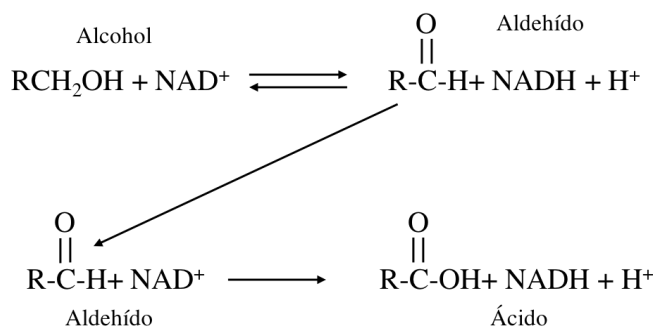


Figura 2.11 Reacciones citosólicas en la fitorremediación de hidrocarburos*

*Adaptado de López-Martínez et al. (2015).

CAPÍTULO 3

Materiales y Métodos

3. Metodología

Este trabajo de investigación fue realizado en los laboratorios de Manejo de suelo y agua y Hongos y Patología vegetal del Centro de Agroecología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (CENAGRO BUAP), ubicado en el Edificio VAL 1 del Ecocampus Valsequillo BUAP, así como en el invernadero de Investigación del Centro de Innovación Tecnológica en Agricultura Protegida de la Universidad Popular Autónoma del Estado de Puebla (CITAP UPAEP) . La estrategia general del trabajo se llevó a cabo en 3 etapas que se describen en la Figura 3.1.

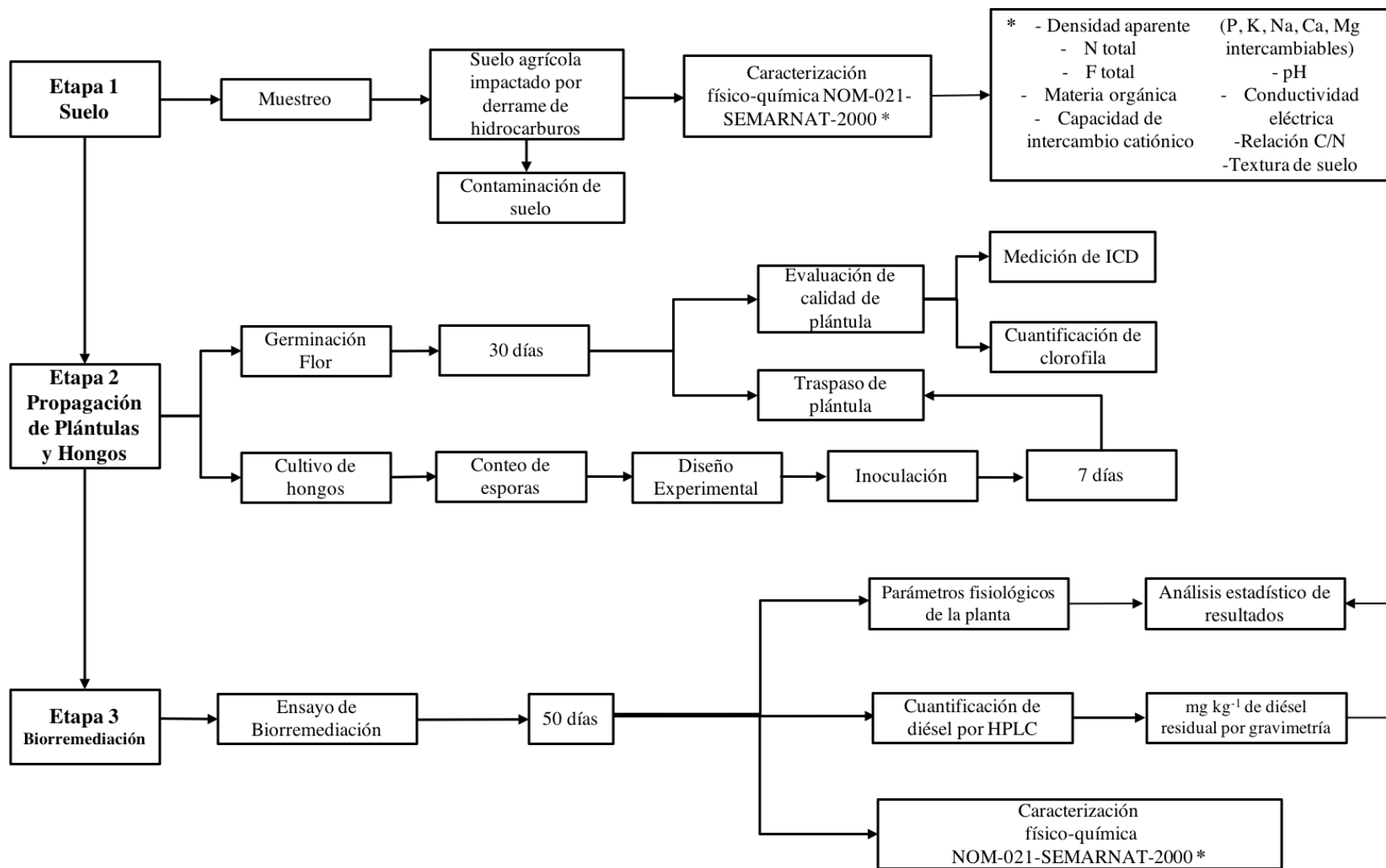


Figura 3.1 Estrategia general del trabajo

3.1 Etapa 1 Suelo

3.1.1 Muestreo

Aproximadamente 100 kg de suelo no contaminado (blanco) fueron recolectados en el municipio de San Martín Texmelucan perteneciente al Estado de Puebla, México.

3.1.2 Preparación de muestra

La contaminación del suelo se llevó a cabo conforme a lo citado por Días Martínez y colaboradores (2013); el suelo se dejó secar a temperatura ambiente durante 7 días, posteriormente se contaminó a 30 000 ppm de diésel, utilizando 30 ml de diésel disueltos en 10 ml de acetona por cada kilogramo de suelo. Dicho suelo fue dejado a proceso de impregnación e intemperización por 3 meses para su posterior uso.

3.1.3 Caracterización física y química del suelo inicial

Tanto el suelo blanco como el contaminado fueron analizados en el Laboratorio de Suelos del Departamento de Investigaciones de Ciencias Agrícolas (DICA) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. La caracterización fue basada en la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000) y las variables que se tomaron en cuenta se muestran en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Parámetros físico-químicos del suelo*

PARÁMETRO	MÉTODO
pH	AS-02*
Materia orgánica	AS-07*
Nitrógeno Total	AS-25*
Textura	AS-09*
Calcio	AS-12*
Magnesio	AS-12*
Sodio	AS-12*
Potasio	AS-12*
Capacidad de intercambio catiónico	AS-12*
Fósforo	Bray-1
Densidad aparente	Probeta
Conductividad eléctrica	AS-18*

* NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2000)

3.2 Etapa 2 Propagación de Plántulas y hongos

3.2.1 Germinación

Las semillas de *Gypsophila paniculata* fueron donadas por el Jardín Botánico Universitario BUAP.

La germinación de las semillas se llevó a cabo en el Invernadero de Investigación del CITAP UPAEP; se utilizaron 2 charolas de germinación de 200 cavidades con turba como sustrato. Con el fin de apresurar la germinación, las charolas fueron cubiertas con un plástico negro durante los primeros 7 días. Inmediatamente después de la germinación el plástico fue retirado y el riego de las charolas fue cada tercer día por 3 semanas más, hasta el trasplante.

3.2.2 Evaluación de la calidad de la plántula

3.2.2.1 Medición de Índice de calidad de Dickson (ICD)

Para tener información sobre la calidad de la especie vegetal al momento del trasplante (30 días después de la siembra), se eligieron 10 individuos al azar a los que se les realizaron mediciones de largo aéreo, largo de raíz, número de hojas verdaderas, peso húmedo y peso seco para posteriormente obtener el índice de calidad de Dickson.

El ICD se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Índice de calidad de Dickson (IDC)} = \frac{PST}{\frac{A}{D} + \frac{PSA}{PSR}}$$

Donde:

PST: peso seco total de la planta (g)

PSA: peso seco de la parte aérea de la planta (g)

PSR: peso seco de la parte radical de la planta (g)

A: altura de la planta (cm)

D: diámetro de la planta (mm)

3.2.2.2 Cuantificación de clorofila

La determinación de clorofila fue a partir de una modificación del protocolo de Hipkins y Baker (1986); 50 mg de tejido vegetal fue puesto en un mortero de porcelana, colocando 10 ml de etanol al 80% la muestra fue triturada y puesta en un frasco para centrifuga de 15 ml, se inició la centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos. Esta metodología se siguió para cada una de las 10 muestras. Posteriormente, en un espectrofotómetro se terminó la absorbancia a 650 y 665 nm, realizando los siguientes cálculos:

$$\text{Clorofila Total} = 25.8 * A_{650} + 84.0 * A_{665}$$

Donde:

A₆₅₀= absorbancia a 650 nm

A₆₆₅= absorbancia a 665 nm

3.2.3 Cultivo de hongos

La cepa de *Talaromyces helicus* (GenBank MF286531) fue otorgada por el cepario de hongos del Laboratorio de Investigación Biotecnoambiental de la Universidad Popular Autónoma de Puebla, mientras que la cepa de *Trichoderma harzianum*. fue conferida por el laboratorio de Hongos y Patología vegetal del CENAGRO BUAP.

Ambos hongos fueron crecidos en cajas Petri de 60x15 mm con agar Papa Dextrosa BD Bioxon® (Anexo 2). Se utilizó el método de picadura en la siembra de los hongos y las cajas Petri fueron puestas en incubadora 7 días a 28°C para lograr un crecimiento óptimo.

A partir de dichos cultivos, se realizaron caldos en 250 ml de Extracto de malta DIBICO® (Anexo 3) y con ayuda de un sacabocados, se colocó una rodaja del cultivo en caja, se agitó por 15 minutos y se puso a crecer en la incubadora a 28°C por 7 días.

3.2.4 Conteo de esporas

A partir de los caldos de cultivo (solución madre), se realizaron 10 diluciones decimales, posteriormente, las diluciones de homogenizaron con ayuda de un vórtex y se tomó una muestra que se colocó en una cámara de Neubauer. Por último, se hizo el conteo de esporas en el microscopio a 40x y se obtuvo el promedio de conidios por campo (Ibarra *et al.*, 2005). Esta metodología se llevo a cabo únicamente con las diluciones 1, 5 y 10.

3.2.5 Inoculación

A partir del conteo de esporas, se determinó la alícuota de la solución madre que permitiera añadir 1×10^6 de esporas/ml de ambas especies fúngicas a cada unidad experimental. Las unidades experimentales fueron preparadas conforme al diseño experimental (Tabla 3.2); el suelo de cada maceta se inoculó con ambos hongos y se dejó interactuar por 7 días antes de hacer el trasplante.

3.2.6 Diseño experimental

Para observar los efectos de las diferentes tecnologías de biorremediación empleadas en este trabajo, así como los resultados de sus interacciones, se realizó un diseño de experimentos completamente aleatorizado con 4 tratamientos y sus respectivos blancos (suelo sin contaminar), así como un tratamiento para identificar efectos de la microbiota autóctona como control negativo (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Diseño experimental

Tratamiento*	Suelo-SAP	Inoculación fúngica	<i>Gypsophila paniculata</i>	Repeticiones
T0	100-0			3
T1	90-10	X	X	5
TB1	90-10	X	X	5
T2	100-0	X	X	5
TB2	100-0	X	X	5
T3	90-10		X	5
TB3	90-10		X	5
T4	90-10	X		5
TB4	90-10	X		5

* T0= Microbiota autóctona
T1=suelo contaminado + SAP+ complejo fúngico + flor
TB1=suelo sin contaminar +SAP + complejo fúngico+ flor
T2=suelo contaminado + complejo fúngico + flor
TB2= suelo sin contaminar + complejo fúngico + flor
T3=suelo contaminado + SAP + flor
TB3=suelo sin contaminar + SAP + flor
T4= suelo contaminado + SAP + complejo fúngico
TB4= suelo sin contaminar + SAP + complejo fúngico

Los efectos de la bioestimulación en el sistema se observan en los tratamientos con SAP, utilizando una proporción de 10%. Los tratamientos a los que se les aplicó el complejo fúngico, conformado por *Talaromyces helicus* y *Trichoderma sp.* (1x10⁶ conidias/ml de cada especie) permitieron analizar los efectos de la bioaumentación, mientras que el producto del proceso de fitorremediación fue observado en los tratamientos donde se empleó una plántula de *Gypsophila paniculata*.

Los tratamientos con *Gypsophila paniculata* permitieron, a su vez, evaluar la posibilidad de producir flores de ornato en suelo afectado por hidrocarburos utilizando las tecnologías de biorremediación y sus interacciones como enmiendas agroecológicas.

Las unidades experimentales fueron macetas de plástico de 1 kg de capacidad, se realizaron 5 repeticiones por tratamiento más las repeticiones con suelo blanco y 3 repeticiones del control negativo para observar efectos de la microbiota autóctona en la remoción de hidrocarburos; teniendo un total de 43 unidades experimentales.

Para obtener porcentajes de remoción al final de la Etapa 3 del proceso experimental, muestras de 100 g de suelo de cada tratamiento, fueron guardadas en bolsas plásticas de cierre hermético y refrigeradas a 4°C para frenar la actividad microbiana y posteriormente realizar la extracción de diésel con base al inciso 3.3.2.

3.2.7 Trasplante

El trasplante de la plántula de *Gypsophila paniculata* a las unidades experimentales, se realizó 30 días después de la siembra, en cuanto la plántula mostró una raíz resistente que permitiera extraerla de la cavidad de la charola de germinación sin romperla. Se seleccionaron 40 plántulas homogéneas; 10 para la evaluación de calidad descrita en el punto 3.2.2, y 30 para los tratamientos puntualizados en la Tabla 3.2.

3.3 Etapa 3 Biorremediación

3.3.1 Ensayo de biorremediación

Este experimento se llevó a cabo en el Invernadero de investigación del CITAP UPAEP, las 43 unidades experimentales fueron colocadas en mesas de madera, donde el riego se efectuó cada tercer día y con ayuda de un termohigrómetro digital se monitoreó diariamente la temperatura (°C) y la humedad relativa del ambiente.

3.3.2 Parámetros fisiológicos de la planta

3.3.2.1 Medición de índice de calidad de Dickson

Para evaluar la calidad de las plántulas después del ensayo de biorremediación y las diferencias que pudieran existir entre las crecidas en un ambiente contaminado y las desarrolladas en suelo blanco; se realizó una estimación del Índice de Calidad de Dickson (ICD) como se explica en el inciso 3.2.2.1.

3.3.2.2 Cuantificación de clorofila

Para observar daños y diferencias en el proceso fotosintético de las plántulas crecidas en ambientes contaminados y las que no; se cuantificó la clorofila Total de cada plántula, esto, con base en el protocolo de Hipkins y Baker (1986), tal y como se describe en el inciso 3.2.2.2.

3.3.3 Remoción de diésel

Con la finalidad de obtener las concentraciones de diésel al inicio del Ensayo de biorremediación, se utilizaron las muestras de suelo inicial, puntualizadas en el último párrafo del inciso 3.2.6.

De igual forma, transcurridos los 50 días del Ensayo de biorremediación, se realizó una muestra compuesta de cada tratamiento, las cuales fueron guardadas en bolsas plásticas con cierre hermético y refrigeradas 4°C hasta su utilización en los incisos 3.3.3.1 y 3.3.3.2.

Se obtuvieron 7 muestras como se ejemplifica en la Tabla 3.3.

Tabla 3.3 Muestras para obtener Remoción de diésel

MUESTRA*	DESCRIPCIÓN
T0 y T2 Inicial	100% suelo contaminado al iniciar el Ensayo de biorremediación
T1, T3 y T4 Inicial	90% suelo contaminado al iniciar el Ensayo de biorremediación +10% SAP
T0 Final	Muestra compuesta del T0 al finalizar el Ensayo de biorremediación
T1 Final	Muestra compuesta del T1 al finalizar el Ensayo de biorremediación
T2 Final	Muestra compuesta del T2 al finalizar el Ensayo de biorremediación
T3 Final	Muestra compuesta del T3 al finalizar el Ensayo de biorremediación
T4 Final	Muestra compuesta del T4 al finalizar el Ensayo de biorremediación

* T0= Microbiota autóctona
T1= SAP+ complejo fúngico + flor
T2= complejo fúngico + flor
T3= SAP + flor
T4= SAP + complejo fúngico

3.3.3.1 Cuantificación de Hidrocarburos Totales del petróleo con HPLC

Por triplicado, se procedió a la extracción del hidrocarburo de cada muestra, se realizó por baño ultrasónico, con una metodología adaptada de los procedimientos utilizados por Buddhadasa, *et al.* (2001), Bolotnik *et al.* (2018) y Ahmed *et al.* (2018). Se pesó y mezcló 2 g de suelo con sulfato de sodio anhidro hasta secar la muestra, a esto se le adicionó 10 ml de una solución diclorometano-acetona 1:1 (v/v) y se sometió a baño ultrasónico por 45 min con intervalos de 10 min de ultrasonificación y 5 min de reposo. Transcurrido este tiempo, las muestras se transfirieron a tubos falcón de 15 ml para centrifugarse por 10 min a 2000 rpm. Por último, se recuperó el sobrenadante en tubos Eppendorf de microcentrífuga, filtrándolo con ayuda de un embudo de cristal y papel filtro. Se obtuvieron 3 tubos por muestra (por tratamiento), dando lugar a un total de 15 muestras.

Las muestras fueron inyectadas en el Cromatógrafo de Gases Agilen Technologies® modelo 7890A acoplado a espectroscopía de masas 5975C. Se utilizó el método de Hidrocarburos de alta temperatura con la columna Agilent 19091S-413HP-5MS®, siguiendo las especificaciones descritas en el Anexo 4.

Se inyectaron 3µL al equipo, dentro de él, estos µL se vaporizaron y divieron en 10 partes, 9 se desecharon y 1 se inyectó a la columna. La columna trabajó 25 minutos para disociar los compuestos de la mezcla por medio de cambios de temperatura, separando dichos compuestos de bajo hacia alto peso molecular. Una vez separados, los compuestos puros se mandaron al detector de masas, rompiendo los enlaces moleculares y formando aniones y cationes. Estos iones se clasificaron con base a su carga y peso meolecular para después ser comparados con la base de datos NIST 2.0®, arrojando los nombres de los compuestos más probables a los iones recolectados.

Se utilizaron los resultados del Carbono 1 hasta el Carbono 40 (C1 al C20), organizándolos nuevamente por tiempo de retención y verificando su aparición en las 3 muestras. Por último, se realizó una sumatoria y de obtuvieron los datos HTPs iniciales y finales de cada tratamiento.

El porcentaje de remoción de HTPs fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ remoción HTPs} = \frac{HTPs \text{ Inicial} - HTPs \text{ Final}}{HTPs \text{ Inicial}} \times 100$$

Donde:

HTPs Inicial= Sumatoria de HTPs al inicio del Ensayo de biorremediación

HTPs Final= Sumatoria de HTPs al final del Ensayo de biorremediación

3.3.3.2 Cuantificación de mg kg^{-1} de Diésel residual por gravimetría

La extracción del diésel contenido en las muestras se realizó de acuerdo al método de Linares (2006). Antes de iniciar el protocolo, tubos de ensayo de 15ml y Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4) necesarios fueron puestos a peso constante, colocándolos en la estufa a 105°C por 24 horas.

Se pesaron aproximadamente 3 gramos de suelo y 3 gramos Na_2SO_4 mezclándolos en tubos para centrífuga de 15 ml con ayuda de un vórtex por 60 segundos. Después, se adicionaron 5 ml de diclorometano, agitando nuevamente en vórtex durante 60 segundos logrando homogenizar la muestra. Posteriormente, cada tubo fue puesto en la centrífuga a 5000 revoluciones por minuto durante 10 minutos, retirando el sobrenadante de solvente que fue puesto en los tubos previamente tarados. Estos lavados se realizaron 3 veces en cada muestra, hasta obtener un aproximado de 15ml de diclorometano que se dejó evaporar durante 7 días en la campana de extracción. Este proceso se realizó por triplicado a cada muestra.

El diésel residual quedó contenido en los tubos de ensayo, estos fueron utilizados para los análisis gravimétricos en la determinación de partes por millón (ppm) de diésel residual, tomando en cuenta los siguientes cálculos:

$$\text{mg/kg de Diésel residual} = \frac{RB - RA}{P}$$

Donde:

RA= peso (mg) del tubo vacío a peso constante

RB= peso (mg) del tubo con el extracto de hidrocarburos

P = cantidad de suelo utilizado (g)

Por último, el porcentaje de remoción de ppm de diésel residual fue calculado con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ remoción Diésel residual} = \frac{\text{mg/kg diésel Inicial} - \text{mg/kg diésel Final}}{\text{mg/kg diésel Inicial}} \times 100$$

Donde:

ppm diésel Inicial= partes por millón de diésel al inicio del Ensayo de biorremediación

ppm diésel Final= partes por millón de diésel al final del Ensayo de biorremediación

3.3.4 Caracterización física y química de suelo biorremediado

Con el propósito de analizar los cambios de la calidad física y química del suelo después del ensayo de biorremediación, se realizaron muestras compuestas de cada tratamiento y se repitieron todos los análisis del inciso 3.1.3.

3.3.5 Análisis estadístico de resultados

Para obtener las diferencias significativas entre los tratamientos, los resultados obtenidos en el inciso 3.3.2, 3.3.3 y 3.3.4 fueron analizados estadísticamente a partir de una prueba de T-Pareada. Y posteriormente, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un factor y prueba de Tukey con un nivel de confianza del 95%. Se utilizó el programa estadístico Minitab 18.1® con licencia para UPAEP.

CAPÍTULO 4

Resultados y Discusión

4.1 Resultados

4.1.1 Suelo inicial

4.1.1.1 Muestreo

Las coordenadas e imágenes satelitales de los sitios de muestreo pueden observarse en la Figura 4.1.



Figura 4.1 Imágenes satelitales y coordenadas del lugar de muestreo
a) Suelo contaminado 19.290600, -98.425064, b) Suelo Blanco 19.300044, -98.4221877

4.1.1.2 Características físicas y químicas del suelo (contaminado).

Las muestras iniciales se enviaron a análisis de suelo al Departamento de Investigación de Ciencias Agrícolas (DICA) BUAP. Los resultados obtenidos correspondientes a los análisis físicos y químicos sobre la fertilidad del suelo tanto contaminado como blanco y sus proporciones con SAP, antes del Ensayo de biorremediación se muestran en la Tabla 4.1 (Anexo 3).

Tabla 4.1 Análisis físicos y químicos del suelo inicial

Parámetro/Muestra	Blanco	Contaminado	Blanco	Contaminado	Método
			+ SAP	+ SAP	
pH	7.51	7.76	7.2	7.67	AS-02*
Materia orgánica (%)	2.37	2.90	7.21	9.50	AS-07*
N total (%)	0.14	0.084	0.223	0.189	AS-25*
C/N	9.819	20.025	18.753	27.928	
Textura	Franco	Franco	Franco	Franco	Franco
	arenosa	arenosa	arenosa	arenosa	arenosa
Ca (cmolc/Kg)	3.55	6.62	6.2	21.94	AS-12*
Mg (cmolc/Kg)	0.5	1.233	4.9	1.966	AS-12*
Na (cmolc/Kg)	0.313	0.582	0.6	0.379	AS-12*
K (cmolc/Kg)	0.6	0.8	0.9	0.9	AS-12*
P (mg/kg)	10.36	11.41	8.26	23.45	Bray-1
DA (g/mL)	1.337	1.325	1.22	1.183	Probeta
CE (dS/m)	166	131	470	141	AS-18*

*NOM-021-SEMARNAT-2000

De acuerdo con Casierra-Posada y colaboradores (2010) los valores de todas las variables anteriores se encuentran dentro de los rangos para un crecimiento óptimo de *Gypsophila paniculata*, por lo que no fue necesario usar alguna herramienta agroecológica. De este modo, se concluyó utilizar el suelo sin modificaciones en las siguientes etapas de la investigación.

4.1.2 Proceso de biorremediación

4.1.2.1 Germinación

Como se observa en la Figura 4.2, las semillas de *Gypsophila paniculata* comenzaron su germinación 7 días después de su siembra. A los 25 días, pudieron observarse brotes de 2 a 4 ramificaciones, lo que indicó crecimiento uniforme y a tiempo para el trasplante (Ávila y Pereyra, 2015).

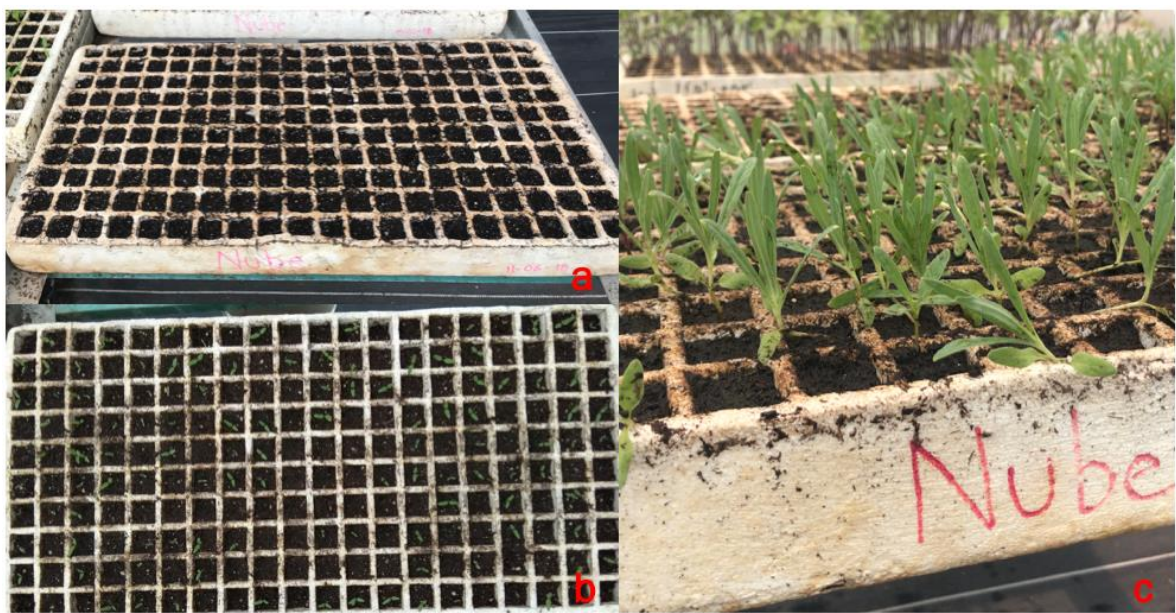


Figura 4.2 Germinación y crecimiento de *Gypsophila paniculata*
a) Día 0, b) Día 7, c) Día 25 después de la siembra.

4.1.2.2 Evaluación de la calidad de la plántula al momento del trasplante

Los resultados de las mediciones de distintas variables de crecimiento y desarrollo de las plántulas antes del trasplante de *Gypshophila paniculata* a las unidades experimentales, se muestran en la Tabla 4.2 (Anexo 5).

Tabla 4.2 Condiciones iniciales de la especie vegetal

VARIABLE	MEDIA
Peso húmedo (g)	4.8545±1.8435
Peso seco (g)	0.3513±0.1725
Largo aéreo (cm)	3.3666±0.5577
Largo de raíz (cm)	3.8555±1.1262
Diámetro (mm)	0.9333±0.1316
ICD*	0.0957±0.0389
Clorofila total (µg)	5.0117±0.6873

IDC= Índice de Calidad de Dickson

4.1.2.3 Hongos

Los cultivos en placa de *Talaromyces helicus* crecieron de forma radial llenando la placa en 10 días, mientras que los de *Trichoderma harzianum* tardaron 7 días (Figura 4.3).

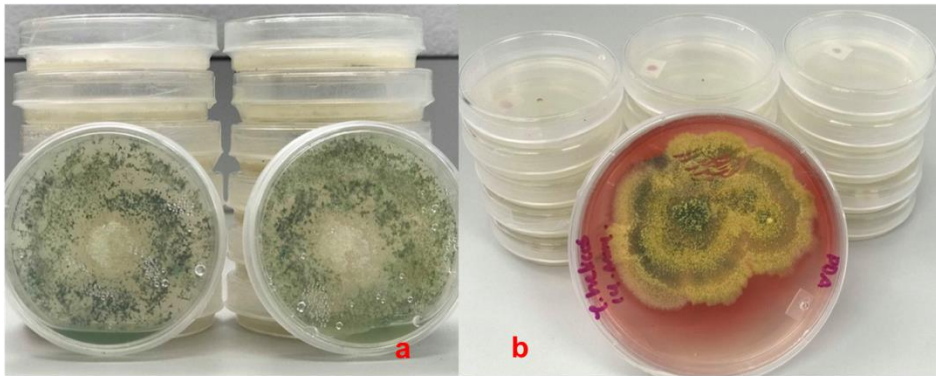


Figura 4.3 Cultivo de hongos en PDA 5 días después de su siembra
a) *Trichoderma harzianum*, b) *Talaromyces helicus*

El caldo de cultivo hecho en extracto de malta, a partir de los cultivos en placa, se muestran en la Figura 4.4. La esporulación completa en ambas especies ocurrió 10 días después de la siembra por rodaja.



Figura 4.4 Cultivo de hongos en PDA 5 días después de su siembra
a) *Trichoderma harzianum*, b) *Talaromyces helicus*

Los resultados del conteo de esporas pueden observarse en el Anexo 6. Se realizaron inoculos de 1×10^6 esporas/ml.

4.1.2.4 *Parámetros fisiológicos de la planta*

En las Figuras 4.5 y 4.6 pueden observarse fotografías de las plantas de cada tratamiento después del ensayo de biorremediación.



Figura 4.5 Fotografías plantas después del Ensayo de fitorremediación. Húmedas

a) T1, b) TB1, c) T2, d) TB2, e) T3, f) TB3

T1=SAP+Complejo fúngico+Flor, T2= Complejo fúngico+Flor, T3= SAP+Flor, TB1= suelo son contaminar+ SAP+Complejo fúngico+Flor , TB2= suelo sin contaminar+ Complejo fúngico+Flor , TB3=suelo sin contaminar+= SAP+Flor



Figura 4.6 Fotografías plantas después del Ensayo de fitorremediación. Secas

a) T1, b) TB1, c) T2, d) TB2, e) T3, f) TB3

T1=SAP+Complejo fúngico+Flor, T2= Complejo fúngico+Flor, T3= SAP+Flor, TB1= suelo son contaminar+ SAP+Complejo fúngico+Flor, TB2= suelo sin contaminar+ Complejo fúngico+Flor, TB3=suelo sin contaminar+= SAP+Flor

Los resultados fueron analizados en el programa Minitab 18.1® correspondientes a las variables de crecimiento y desarrollo de las plantas después del tratamiento de biorremediación (Anexo 7), se pueden observar en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3 Resultados de Análisis de varianza y comparaciones Variables Biológicas

	PH (g)	PS (g)	PSR (g)	PSA (g)	ICD	Clorofila Total (µg/ml)	A (cm)	D (mm)	Hojas	Flores	Botones
T1	2.01±1.02 b	0.37±0.22 b	0.12±0.061 b	0.25±0.18 b	0.021±0.015 b	1.23±0.72 b	21.18±2.55 b	1.24±0.26 b	13.60±2.61 b	0.00±0.00 a	1.20±1.30 a
T2	3.22±0.96 ab	0.65±0.20 b	0.37±0.21 ab	0.27±0.02 b	0.036±0.016 b	2.82±1.03 b	24.70±1.68 ab	1.38±0.26 b	15.20±1.78 b	0.60±0.89 a	1.40±1.34 a
T3	1.60±1.56 b	0.25±.22 b	0.08±0.08 b	0.17±0.20 b	0.0147±0.0141 b	1.89±1.74 b	12.52±9.78 b	0.92±0.55 b	13.20±7.75 b	0.600±1.34 a	0.80±1.095 a
TB1	2.48±1.45 b	0.53±0.34 b	0.06±0.01 b	0.46±0.33 ab	0.0199±0.0096 b	10.80±6.01 ab	27.16±7.57 ab	1.48±0.33 b	22.00±8.0 ab	3.40±3.85 a	1.40±2.61 a
TB2	6.86±2.84 a	1.83±0.77 a	0.49±0.31 a	1.34±0.99 a	0.0920±0.0255 a	20.19±4.81 a	37.46±12.46 a	2.52±0.63 a	28.80±6.57 a	0.40±0.89 a	6.20±9.34 a
TB3	2.60±2.85 b	0.50±0.41 b	0.11±0.13 b	0.39±0.28 b	0.0287±0.0328 b	9.08± 1.56 ab	22.06±5.48 b	1.36±0.80 b	19.20±9.86 ab	2.20±3.49 a	1.80±2.68 a
P- value	<i>0.004</i>	<i>0.000</i>	<i>0.000</i>	<i>0.010</i>	<i>0.035</i>	<i>0.000</i>	<i>0.001</i>	<i>0.002</i>	<i>0.010</i>	<i>0.172</i>	<i>0.360</i>

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB1=Suelo sin contaminar+ SAP+Complejo fúngico+Flor

TB2= Suelo sin contaminar+ Complejo fúngico+Flor

TB3= Suelo sin contaminar + SAP + Flor

PH= Peso húmedo, PS=Peso seco, PSR= Peso seco radical,

PSA= Peso seco parte aérea, ICD= Índice de calidad de Dickson, A= Altura, D= Diámetro

*Los valores acompañados por letras iguales no presentaron diferencia significativa por columna ($\alpha= 0.05$).

4.1.2.5 Remoción de diésel

En las figuras 4.7 y 4.8 se ilustran las unidades experimentales de todos los tratamientos antes y después del Ensayo de Biorremediación, respectivamente.

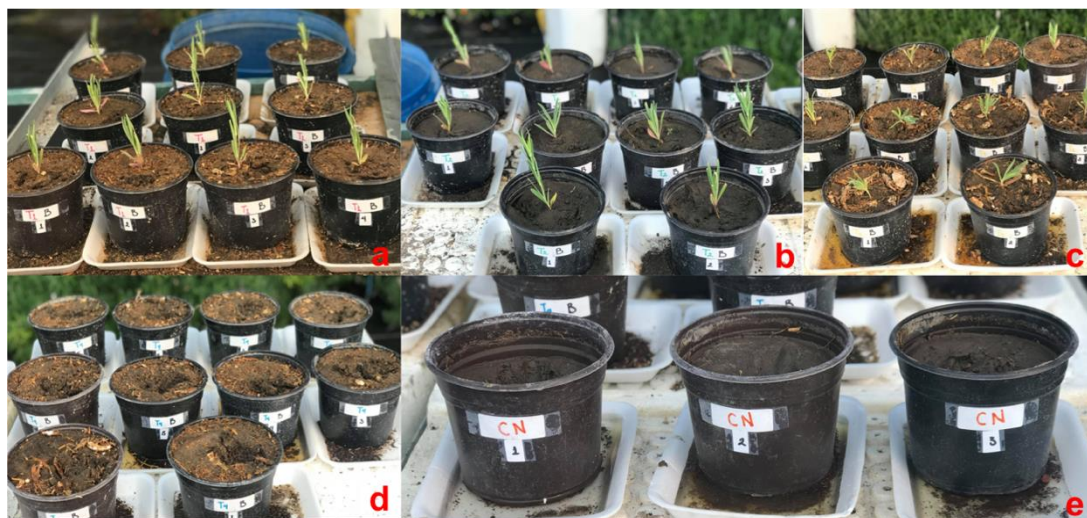


Figura 4.7 Ensayo de Biorremediación día 1

- a) T1=SAP+Complejo Fúngico+Flor, b) T2=Complejo Fúngico+Flor c) T3=SAP+Flor
d) T4=SAP+Complejo Fúngico e) T0=Microbiota autóctona

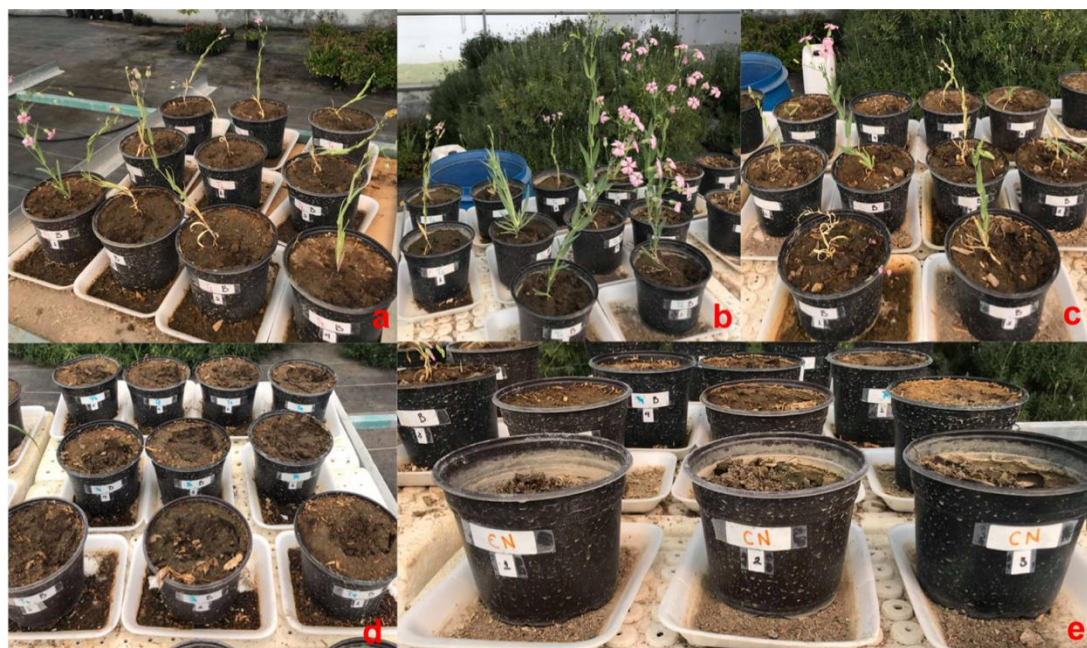


Figura 4.8 Ensayo de Biorremediación día 50

- a) T1=SAP+Complejo Fúngico+Flor, b) T2=Complejo Fúngico+Flor c) T3=SAP+Flor
d) T4=SAP+Complejo Fúngico e) T0= Microbiota autóctona

Cuantificación de Hidrocarburos Totales del petróleo con HPLC

Los resultados del HPLC (Anexo 8), así como sus diferencias significativas en la Prueba T-Pareada (Anexo 9) se muestran en la Tabla 4.4 y la Figura 4.9. Los estadísticos resultantes del ANOVA y los porcentajes de remoción (Anexo 10) se pueden observar en la Tabla 4.5.

Tabla 4.4 T-Student Pareada para HTPs iniciales y finales

TRATAMIENTO	HTPs	P-value
T0 Inicial	766298470±19157462	0.000
T0 Final	380611981±12727654	
T1 Inicial	766298470±19157462	0.002
T1 Final	148740190±30260356	
T2 Inicial	766298470±19157462	0.000
T2 Final	300729460±12570363	
T3 Inicial	766298470±19157462	0.002
T3 Final	117476621±29196983	
T4 Inicial	766298470±19157462	0.000
T4 Final	285034441±17806769	

T0= Microbiota autóctona
T1= SAP+Complejo fúngico+Flor
T2=Complejo fúngico+Flor
T3= SAP+Flor
T4=SAP+Complejo fúngico

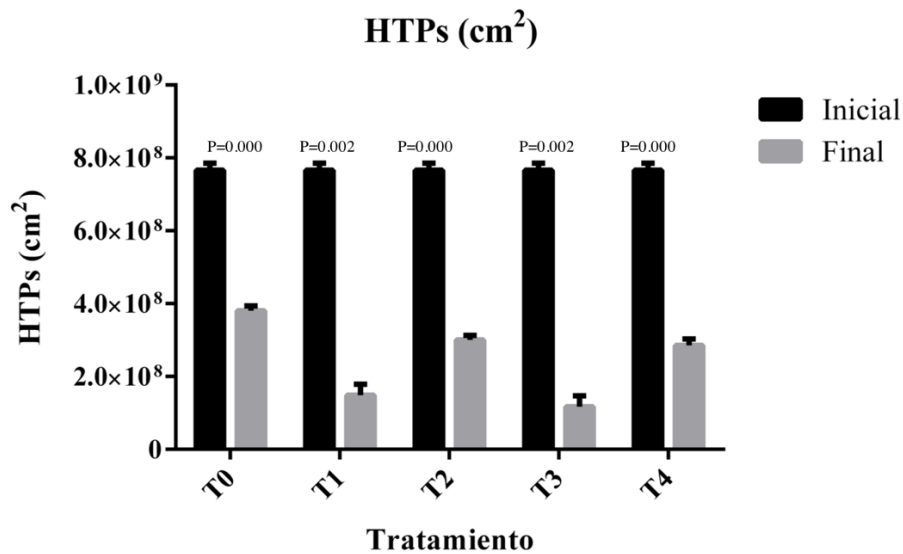


Figura 4.9 Gráfica de T-Student Pareada para HTPs iniciales y finales

Tabla 4.5 ANOVA y Tukey de HTPs iniciales y finales

Tratamiento	HTPs Finales (cm ²)	% de Remoción
T0	380611981±12727654 c	50.331
T1	148740190±30260356 a	80.589
T2	300729460±12570363 b	60.755
T3	117476621±29196983 a	84.669
T4	285034441±17806769 b	62.802

*Los valores acompañados por letras iguales NO presentaron diferencia significativa ($P=0.000$, $\alpha=0.05$)

T0= Microbiota autóctona

T2=Complejo fúngico+Flor

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

Las figuras 4.10 y 4.11, muestran las curvas resultantes del análisis en HPLC.

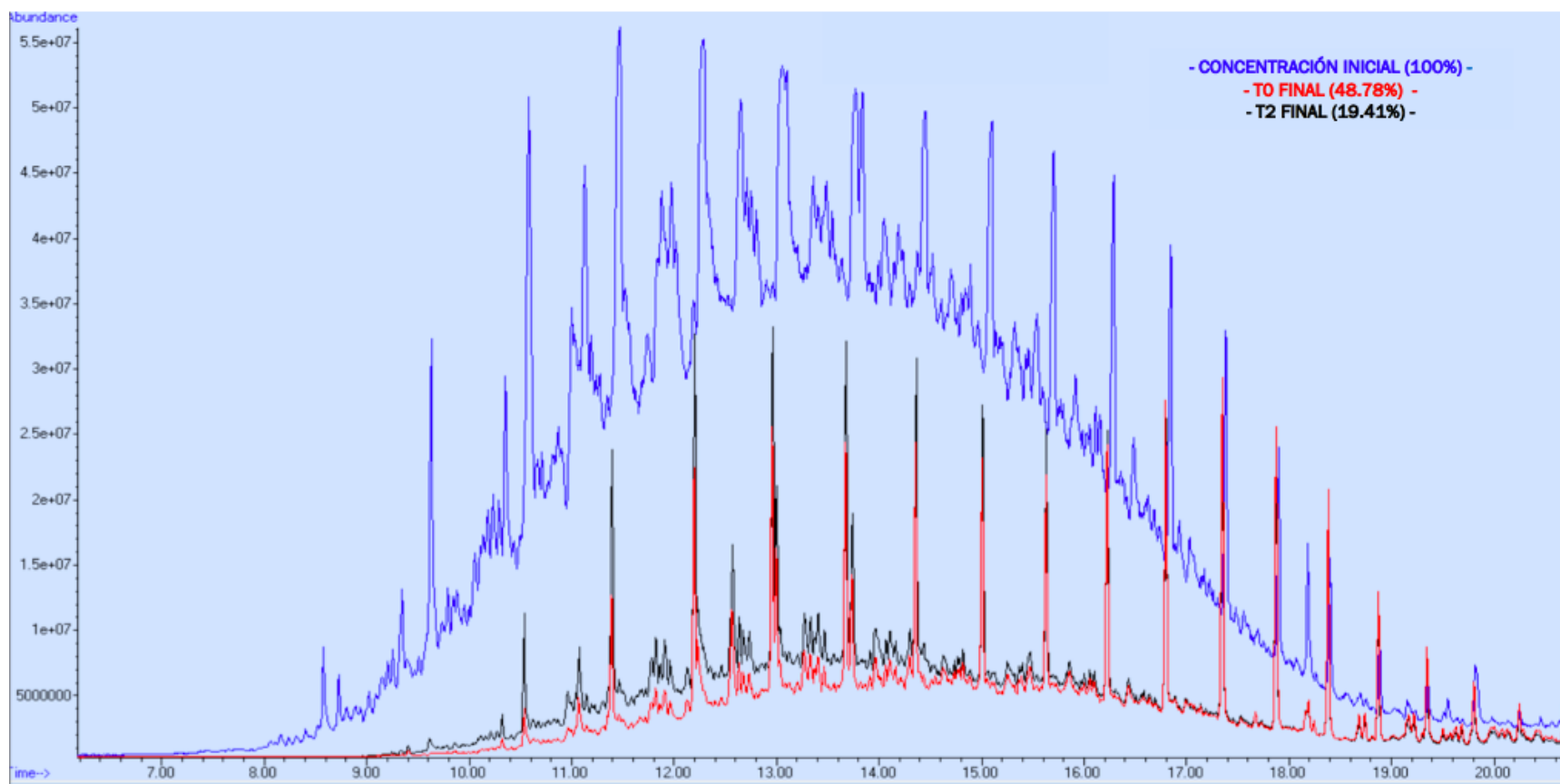


Figura 4.10 Remoción de diésel T0 y T2
T0= Microbiota autóctona, T2= Complejo fúngico+Flor

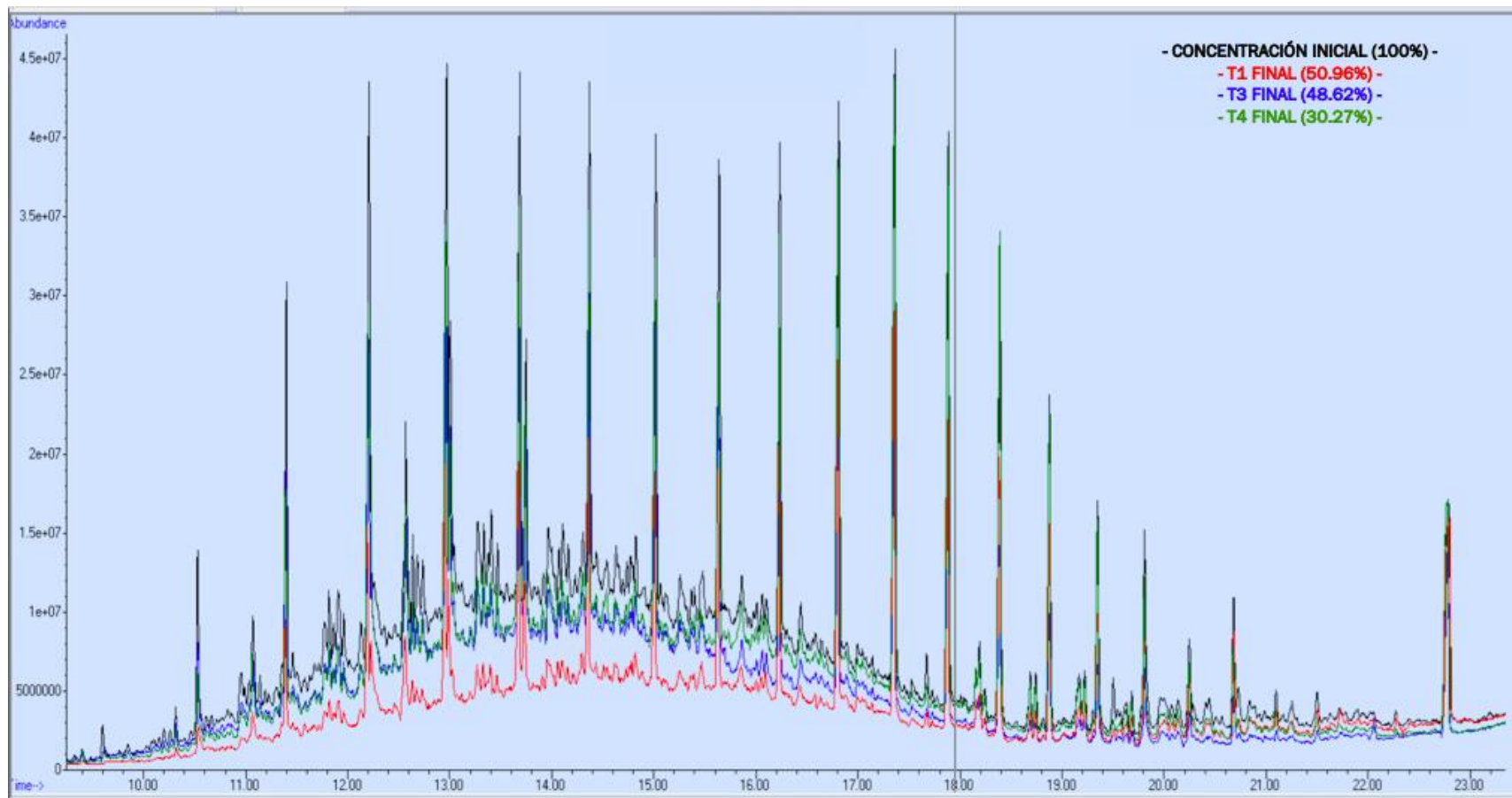


Figura 4.11 Remoción de diésel T1, T3 y T4
T1= T1= SAP+Complejo fúngico+Flor, T3= SAP+Flor, T4=SAP+Complejo fúngico

Cuantificación de mg kg⁻¹ de Diésel residual por gravimetría

Los resultados de la extracción de hidrocarburos (Anexo 11), así como sus diferencias significativas en la Prueba T-Pareada (Anexo 12) se muestran en la Tabla 4.6 y la Figura 4.12. Los estadísticos resultantes del ANOVA (Anexo 13) y los porcentajes de remoción se pueden observar en la Tabla 4.7.

Tabla 4.6 T-Student Pareada para mg kg⁻¹ de diésel residual iniciales y finales

TRATAMIENTO	mg kg⁻¹ de Diésel residual	P-value
T0 Inicial	4289.7 ±171.6	0.001
T0 Final	3385.5 ±126.4	
T1 Inicial	4289.7 ±171.6	0.001
T1 Final	2658.0 ± 107.5	
T2 Inicial	4289.7 ±171.6	0.001
T2 Final	2493.7 ± 87.2	
T3 Inicial	4289.7 ±171.6	0.001
T3 Final	2588.7 ± 97.2	
T4 Inicial	4289.7 ±171.6	0.001
T4 Final	2671.8 ± 108.1	

**Los valores acompañados por letras iguales NO presentaron diferencia significativa (α= 0.05)*

T0= Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

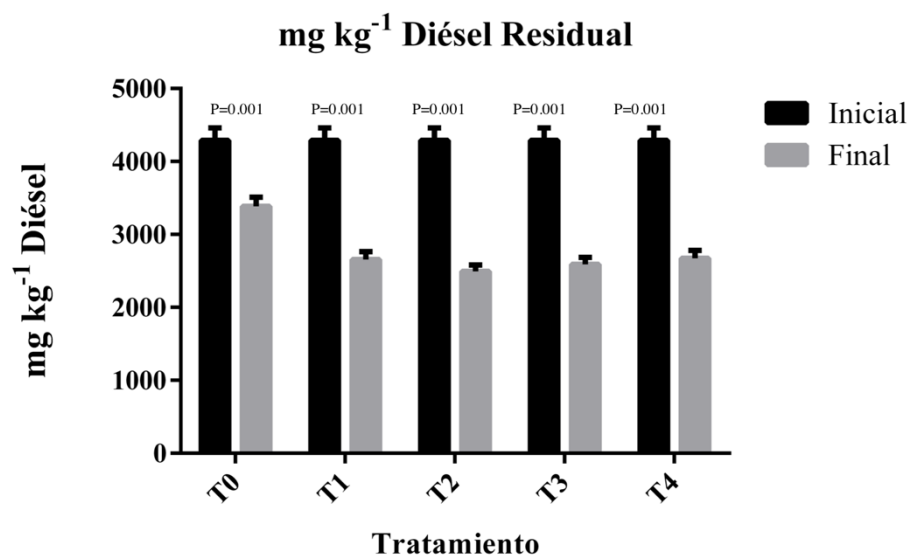


Figura 4.12 Gráfica de T-Student Pareada para Diésel residual (mg kg⁻¹)

Tabla 4.7 ANOVA y Tukey de mg kg⁻¹ de Diésel Residual

TRATAMIENTO	mg kg ⁻¹ de diésel residual	% de Remoción
T0	3385.5 ±126.4 b	21.078
T1	2658.0 ± 107.5 a	38.037
T2	2493.7 ± 87.2 a	41.867
T3	2588.7 ± 97.2 a	39.653
T4	2671.8 ± 108.1 a	37.715

*Los valores acompañados por letras iguales NO presentaron diferencia significativa (P=0.000, α= 0.05)

T0= Microbiota autóctona

T2=Complejo fúngico+Flor

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

4.1.2.6 Caracterización química del suelo biorremediado.

Los resultados de los análisis físicos y químicos del suelo antes y después del ensayo de biorremediación (Anexo 14) se muestran en la Tablas 4.9.

*Tabla 4.8 Caracterización química del suelo contaminado y biorremediado**

Tratamiento	pH		Materia orgánica (%)		Nitrógeno total (%)		Relación C/N	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	7.76	8.2	2.9	2.23	0.084	0.102	0.02897	0.04574
T1	7.67	8.1	9.1	3.96	0.189	0.177	0.02077	0.0447
T2	7.76	7.9	2.9	2.39	0.084	0.122	0.02897	0.05105
T3	7.67	8.1	9.5	3	0.189	0.129	0.01989	0.043
T4	7.67	8.2	9.5	4.57	0.189	0.232	0.01989	0.05077
TB1	7.2	8.1	7.21	1.93	0.223	0.085	0.03093	0.04404
TB2	7.51	8	2.37	1.37	0.14	0.085	0.05907	0.06204
TB3	7.2	8.1	7.21	2.67	0.223	0.124	0.03093	0.04644
TB4	7.2	8.2	7.21	2.18	0.223	0.11	0.03093	0.05046
SAP	8.23	NA	98.5	NA	0.021	NA	2720.96	NA

**T0= Microbiota autóctona*

TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

TB1= Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico

SAP= Sustrato Agotado de Peurotus spp

NA= No aplica

Continuación Tabla 4.8 Caracterización física y química del suelo contaminado y biorremediado*

Tratamiento	Calcio (cmolc/Kg)		Magnesio (cmolc/Kg)		Sodio (cmolc/Kg)		Potasio (cmolc/Kg)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	6.62	8.2	1.233	0.3	0.582	0.7	0.8	1
T1	21.94	37.1	1.966	3	0.379	0.7	0.9	1.2
T2	6.62	8.6	1.233	4.8	0.582	0.7	0.8	1
T3	21.94	36.6	1.966	4.7	0.379	0.9	0.9	1.3
T4	21.94	33.2	1.966	0.9	0.379	0.7	0.9	1
TB1	6.2	37.5	4.9	2.8	0.6	0.8	0.9	0.7
TB2	3.55	6.9	0.5	4.3	0.313	0.8	0.6	0.4
TB3	6.2	28.7	4.9	4.3	0.6	0.8	0.9	0.9
TB4	6.2	28.2	4.9	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9
SAP	0.016	NA	0.03	NA	0.01	NA	0.03	NA

Tratamiento	Capacidad de Intercambio Catiónico (cmolc/Kg)		Fósforo (mg/mk)		Densidad aparente (g/ml)		Conductividad Eléctrica (dS/m)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	11.5	10.2	11.41	0	1.325	1.26	0.05	0.35
T1	19.2	16.3	23.25	0	1.183	1.22	0.95	0.47
T2	11.5	11.6	11.41	14.6	1.325	1.28	0.08	0.36
T3	19.2	13.9	23.45	6	1.183	1.29	0.95	5.56
T4	19.2	14.7	23.45	16	1.183	1.26	0.95	4.41
TB1	16.3	10.9	0	0	1.22	1.26	0.47	5.31
TB2	12.7	8.9	10.36	10.3	1.337	1.26	0.69	0.33
TB3	16.3	14.7	0	16	1.22	1.26	0.47	4.41
TB4	16.3	12.1	0	0.9	1.22	1.25	0.47	5.55
SAP		NA	23.6	NA		NA	0.32	NA

* SAP= Sustrato Agotado de *Peurotus spp*

NA=No Aplica

T0= Microbiota autóctona

TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico

4.2 Discusión

4.2.1 Parámetros fisiológicos de la planta

Como puede observarse en la Tabla 4.3, no existen diferencias significativas entre los tratamientos T1(SAP+Complejo fúngico+Flor), T2 (Complejo fúngico+Flor) y T3 (SAP+Flor) y sus grupos testigo en las variables de respuesta peso húmedo, peso seco, peso seco radicular, ICD, altura, diámetro, hojas, flores y botones. Estos resultados sugieren que *Gypsophila paniculata* es una especie vegetal con capacidad de tolerar y crecer óptimamente en ambientes contaminados con hidrocarburos. *Gypsophila paniculata* ya ha sido utilizada como especie fitorremediadora, y bioacumuladora de contaminantes inorgánicos. Zhang y Gui-Jian (2019), concluyeron que *Gypsophila paniculata* era capaz de crecer óptimamente en medios con Cesio, mientras que Muszyńska y colaboradores (2018), probaron lo mismo para Cadmio. La incidencia que podría tener en la biorremediación de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos, aún no ha sido estudiada, sin embargo, gran variedad de especies vegetales ornamentales han sido utilizadas para la degradación de hidrocarburos, Xiao y colaboradores (2015), realizaron un experimento de 150 días utilizando 5 especies diferentes de plantas ornamentales para la remoción de hidrocarburos policíclicos aromáticos, teniendo tasas de remoción mayores al 95%. Liu y colaboradores (2012), investigaron el potencial de remoción de crudo con 14 especies ornamentales, los resultados después de 30 días mostraron porcentajes de remoción de 37 a 49%.

Adicionalmente, la Tabla 4.3, muestra que la síntesis de clorofila es afectada negativamente por la presencia de hidrocarburos en todos los tratamientos ($T1= 1.23 \mu g \pm 0.72 \mu g$, $TB1= 10.80 \mu g \pm 6.01 \mu g$, $T2= 2.82 \mu g \pm 1.03 \mu g$, $TB2= 20.19 \mu g \pm 4.81 \mu g$, $T3= 1.89 \mu g \pm 1.74 \mu g$, $TB3= 9.08 \mu g \pm 1.56 \mu g$), indicando que los hidrocarburos ocasionan cambios en la síntesis de energía de la planta. Kreslavsk y colaboradores (2014), realizaron un trabajo donde estudiaron los efectos de naftaleno, fenantreno y fluoranteno sobre la actividad fotoquímica del fotosistema II (PSII) en hojas de chícharo, concluyendo que dichos compuestos recalcitrantes, dañan el PSII ya que logran acumularse en los tilacoides, los hinchan produciendo estrés oxidativo.

A partir de los resultados descritos, la determinación de clorofila podría utilizarse como bioindicador de la presencia de hidrocarburos policíclicos aromáticos en suelos.

Por otro lado, el grupo control TB2 (Suelo sin contaminar+Complejo fúngico+Flor) mostró diferencias significativas respecto a los demás tratamientos en las variables de peso seco (T2= 0.65 g $\pm$ 0.20 g, TB2= 1.83 g $\pm$ 0.77 g), peso seco aéreo (T2= 0.27 g $\pm$ 0.02 g, TB2= 1.34 g $\pm$ 0.99 g), índice de calidad de Dickson (T2= 0.036 $\pm$ 0.016, TB2= 0.0920 $\pm$ 0.0255), diámetro (T2= 1.38 mm $\pm$ 0.26 mm, TB2= 2.52 $\pm$ 0.63 mm), y hojas (T2=15.20 $\pm$ 1.78, TB2= 28.80 $\pm$ 6.57). Las variables de peso seco indican la producción de biomasa de la planta mientras que el índice de calidad de Dickson permite observar los atributos fisiológicos de las plantas, por su parte, la producción de hojas indica un óptimo desarrollo de la misma, lo que permite concluir que el crecimiento de *Gypsophila paniculata* se ve positivamente influenciada por la presencia del complejo fúngico en un ambiente libre de hidrocarburos. Los efectos de *Trichoderma harzianum* como hongo promotor del crecimiento vegetal ya ha sido estudiado en distintas especies vegetales (Tabla 4.9), esta cualidad se debe a la facilidad de colonizar la raíz de la planta, protegiéndola de patógenos, y produciendo fitohormonas (Candelero et al., 2015). Sin embargo, *Talaromyces helicus* aún no ha sido estudiado como promotor de crecimiento vegetal.

Tabla 4.10 Trichoderma harzianum utilizado como especies propomotas del crecimiento vegetal

Especie vegetal	Nombre común	Autor
<i>Lolium perenne</i> y <i>Trifolium repens</i>	Césped inglés y trébol	Acurio y España, 2017
<i>Helianthus annuus</i> y <i>Carica papaya</i>	Girasol y papaya	González y Fuentes, 2017
<i>Capsicum chinense</i>	Chile	Candelero et al., 2015
<i>Pisum sativum</i>	Chícharo	Camargo y Ávila, 2013
<i>Triticum aestivum</i> L	Trigo	Sharma et al., 2012
<i>Solanum lycopersicum</i>	Jitomate	Li et al., 2015

4.2.2 Remoción de diésel

La Tabla 4.4 muestra diferencias significativas en los valores de áreas bajo la curva de los cromatogramas (cm²) obtenidos por HPLC de HTPs iniciales y finales, concluyendo que existió remoción de hidrocarburos en todos los tratamientos. En la Tabla 4.5 se observa que los tratamientos con mayor porcentaje de remoción y significativamente diferentes fueron T1 (SAP+Complejo fúngico+Flor) y T3 (SAP+Flor), pudiendo concluir que el SAP mostró mejores efectos en la remoción de hidrocarburos. El SAP y el género *Pleurotus* han sido ampliamente estudiados para la biorremediación de xenobióticos. Su efecto biorremediador se debe a las características enzimáticas que contienen, así como el efecto de bioestimulación que permitió proveer de nutrientes a la microbiota encargada del proceso de mineralización y la remoción de los hidrocarburos. García-Delgado (2015), concluyó que los residuos post cultivo de setas, tienen la capacidad de degradar HAPs por acción de lacasas y peroxidasas contenidas en el SAP, así mismo, Pozdnyakova y colaboradores (2017), publicaron datos que sugieren que las lacasas pueden catalizar el ataque inicial a las moléculas de HAP, formar quinonas, para que enseguida la peroxidasa la oxide y la conduzca a la mineralización.

De acuerdo al método gravimétrico utilizado en la cuantificación de diésel, en la Tabla 4.6 se observa diferencia significativa entre las concentraciones iniciales y finales de diésel, mostrando remoción en todos los tratamientos. La Tabla 4.7 muestra que no existe diferencia significativa entre los tratamientos de enmiendas agroecológicas (T1, T2, T3 y T4), pero sí con el tratamiento control negativo de microbiota autóctona (T0), mostrando este último el porcentaje de remoción más bajo (21.07%), mientras que los demás tratamientos oscilan entre 38-03% y 41.86%.

El potencial de biorremediación de *Talaromyces helicus* y *Trichoderma harzianum* se ha estudiado ampliamente. *Trichoderma harzianum* fue investigado por Zafra y Cortés-Espinoza (2015), ellos realizaron una revisión bibliográfica sobre las aplicaciones biotecnológicas de *Trichoderma* spp., encontrando datos sobre degradación de HPAs, de igual forma, concluyeron que *Trichoderma harzianum* está asociado con la capacidad de metabolizar HAPs de alto y bajo peso molecular, como naftaleno, fenantreno, criseno, pireno y benzo[a]pireno, por su capacidad de degradar material lignocelulósico (Da Silva *et al.*, 2003; Delira *et al.*, 2012; Pernía *et al.* 2012). El género *Trichoderma* cuenta con diversas características de importancia agrícola e industrial, sin embargo, también se ha descrito como

tolerante a contaminantes recalcitrantes que incluyen metales pesados, pesticidas e hidrocarburos (Tripathi *et al.*, 2013). En el caso de *Talaromyces helicus*, en 2014, Reyes-César *et al.* (2014), trabajaron con nueve cepas fúngicas que recuperaron de suelos contaminados con HAP's donde aislaron y caracterizaron distintas especies de *Talaromyces spp.* que presentaron la mayor tolerancia al contaminante. Feyuelle *et al.* (2019), publicaron un estudio dónde aislaron cincuenta hongos de campos de cultivos contaminados con HPAs, treinta de estos aislamientos se seleccionaron en un medio mineral por su capacidad para degradar el benzo[a]pireno, destacando la capacidad de *Talaromyces helicus* para degradar mas del 30% de este contaminante en su medio de crecimiento, tanto *in vitro* como en suelos no estériles. Dichos resultados indican las potencialidades de bioaumentación utilizando esta especie y subrayan la necesidad de estrategias para aplicar este tipo de técnica en sitios contaminados.

A pesar de que todos los tratamientos presentaron remoción de diésel, ninguno de ellos cumplió con los requisitos de la NOM-138 SEMARNAT 2012, para suelos de uso agrícola (Tabla 4.12), esto pudiera deberse al tiempo del ensayo de biorremediación. Sin embargo, los límites máximos permisibles presentados en la NOM-138-SEMARNAT, hacen alusión a la ecotoxicidad de los hidrocarburos hacia cualquier especie vegetal, pero no a la toxicidad que podría respresentar consumir un cultivo crecido en estos suelos; por lo que sí podría producirse una especie ornamental tolerante a hidrocarburos como *Gypsofila paniculata*.

*Tabla 4.12 Límites máximos permisibles de Hidrocarburos por uso de suelo**

FRACCIÓN DE HIDROCARBUROS	USO DE SUELO (mg/kg)		
	Agrícola, forestal, pecuario y de conservación	Residencial y recreativo	Industrial y comercial
Ligera	200	200	500
Media	1200	1200	5000
Pesada	3000	3000	6000

- *NOM- 138 SEMARNAT-2012 (DOF, 2012).

4.2.3. Características físicas y químicas del suelo biorremediado.

Por otro lado, la Tabla 4.8 muestra los resultados sobre los parámetros físicos y químicos del suelo que fueron modificados durante el ensayo de biorremediación. Los parámetros más importantes para el proceso de biorremediación como el pH, materia orgánica, nitrógeno y relación carbono nitrógeno (Arroyo y Quesada, 2002; Pucci *et al.*, 2011; Naseri *et al.*, 2014), los resultados de estos parámetros se muestran en las Figuras 4.14, 4.17, 4.18 y 4.19, respectivamente.

Como se observa en la Figura 4.14, los valores de pH iniciales oscilan entre 7.2 y 7.7, rangos óptimos para el crecimiento de *Gypsophila paniculata* (Casierra-Posada *et al.*, 2010). Sin embargo, el pH aumentó al final del tratamiento de biorremediación hasta 8.3, pudiendo bloquear la biodisponibilidad de los nutrientes que son transportados por difusión activa a la planta, como el nitrógeno y el fósforo (Muñoz y Niell, 2009), ocasionando necrosis de hojas basales (Figura 4.4), éste fenómeno visual puede interpretarse como deficiencia de nitrógeno (Figura 4.13) (Vargas *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2011; Sepúlveda *et al.*, 2014). Igualmente, la presencia de hidrocarburos pudo haber bloqueado la biodisponibilidad de nutrientes asimilados por difusión pasiva debido a la película hidrofóbica que puede formar entre las partículas de suelo por las características hidrofóbicas de los HAP (Ki-Hyun *et al.*, 2013; Yakovleva *et al.*, 2013).

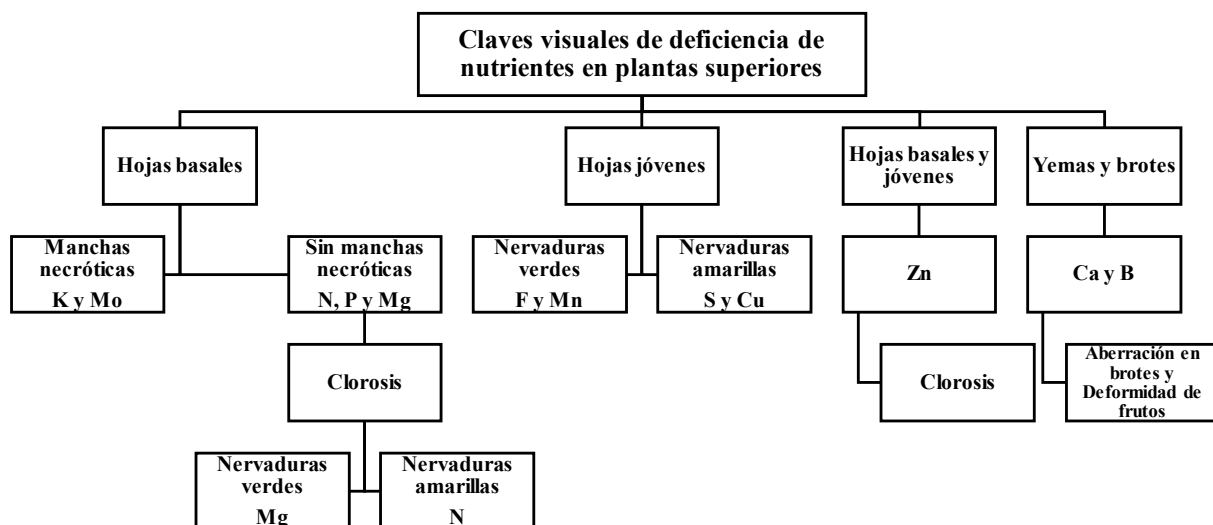


Figura 4.13 Claves visuales de deficiencias nutrimentales en plantas superiores

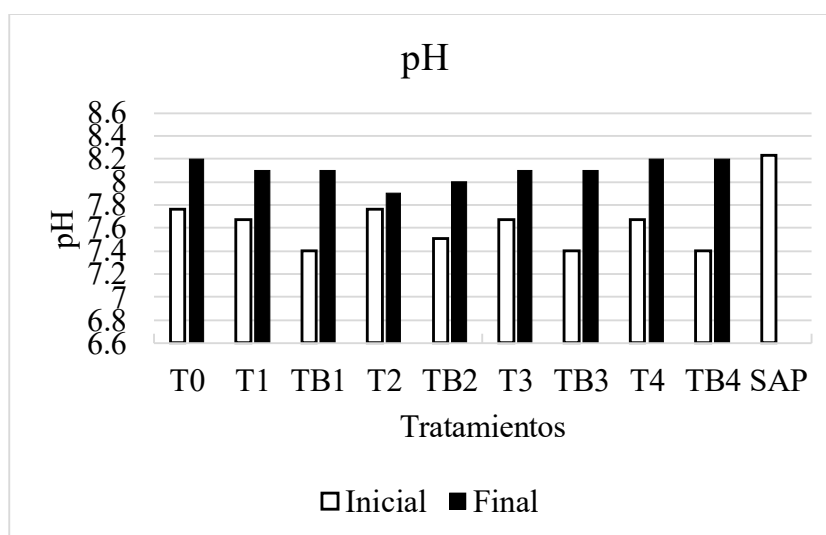


Figura 4.14 Gráfica pH antes y después del Ensayo de Biorremediación *

*T0= Microbiota autóctona
 TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona
 T1= SAP+Complejo fúngico+Flor
 TB1= Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico+Flor
 T2=Complejo fúngico+Flor
 TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor
 T3= SAP+Flor
 TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor
 T4=SAP+Complejo fúngico
 TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico
 SAP= Sustrato Agotado de *Pleurotus spp.*

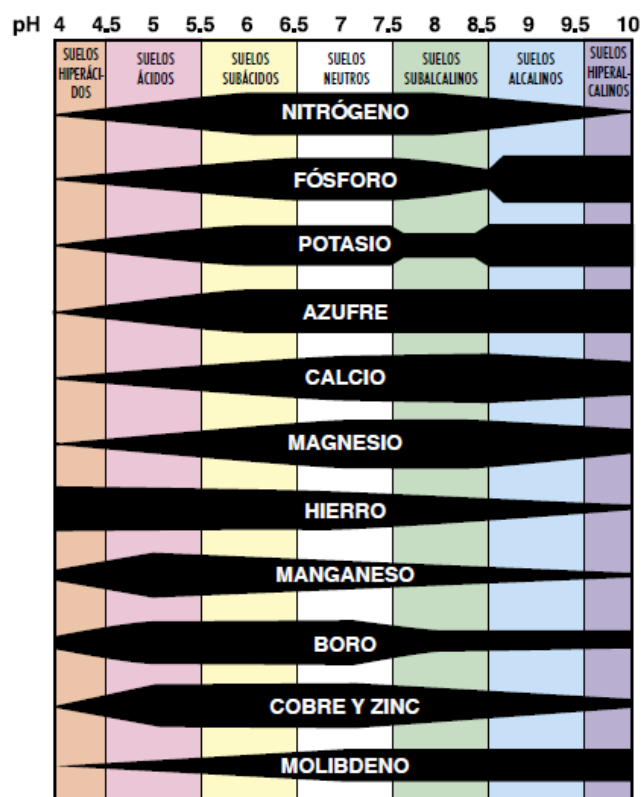


Figura 4.15 Biodisponibilidad de nutrientes por efecto del pH*.

De manera general, la Figura 4.15 muestra la disponibilidad de nutrientes por efecto del pH en el suelo, donde se observan las afectaciones del pH con valores de 8-8.5 causan en la biodisponibilidad del Zinc, Cobre, Boro, Manganeseo, Magnesio, Potasio y Fósforo (Taiz & Zeiger, 2010). La importancia de éstos nutrientes y las consecuencias que su deficiencia provoca, se pueden leer en la Tabla 4.15.

Tabla 4.15 Importancia de nutrientes y consecuencias de su deficiencia en plantas superiores.*

Nutriente	Importancia	Consecuencia por deficiencia
Nitrógeno	Esencial para formar compuestos orgánicos estructurales (proteínas) y funcionales (enzimas), así como el grupo amino de la molécula de ADN.	Hojas de pequeño tamaño, clorosis, necrosis de hojas basales, tallos púrpuras.
Fósforo	Grupo fosfato de ácidos nucleicos, parte de fosfolípidos y la molécula de ATP.	Abscisión de las hojas y pigmentaciones rojizas y purpúreas. Escaso desarrollo en tejidos vasculares.
Potasio	Forma asociaciones con proteínas y enzimas. Activa enzimas y participa en el transporte de membrana (bomba Na, K).	Afecta procesos fotosintéticos y síntesis de clorofila. Hojas necróticas en ápices y bordes.
Azufre	Forman el puente S-S en cisteína, cistina y metionina, centros activos de diversas enzimas y coenzimas y es parte estructural de las cadenas peptídicas	Clorosis en hojas nuevas.
Calcio	Esencial como componente de pared celular y estructuras lipídicas. Es un activador enzimático	Afecta regiones meristemáticas de tallo, hojas y raíz, presentan malformaciones, detiene mitosis y mueren.
Magnesio	Núcleo de molécula de clorofila, parte de enzimas y coenzimas en síntesis de ácidos nucleicos.	Clorosis y necrosis en hojas basales para pasar a hojas jóvenes. Inhibe floración.
Hierro	Reacciones redox, grupo prostético de citocromos, catalasas, peroxidasas y deshidrogenasas.	Clorosis en hojas con nervaduras verdes, impide elongación de raíz y aumento de diámetro.

**(Marschner, 2012; Taiz & Zeigler, 2010; Hopkins & Hüner, 2009).*

Continuación Tabla 4.15 Importancia de nutrientes y consecuencias de su deficiencia en plantas superiores*.

Nutriente	Importancia	Consecuencia por deficiencia
Manganeso	Esencial para la respiración, es un activador enzimático que regula descarboxilasas y deshidrogenasas. Parte importante del metabolismo nitrogenado, activador de la nitrorreductasa.	Clorosis en hojas jóvenes y necrosis en zonas interneurales.
Boro	Activador específico de enzimas. Regulador del proceso de lignificación.	Muerte de ápice, brote y raíces.
Cobre	Componente de proteínas azules y no azules, así como proteínas multicúpricas. Donar y ceder electrones.	No hay necrosis, las hojas jóvenes se blanquean.
Zinc	Activador de anhidrasa carbónica	Descenso en niveles de auxinas, mayor cantidad de indolaceticooxidasas que degrada el ácido indolacético existente.
Molibdeno	Participación en reacciones redox, implicado en la fijación de nitrógeno y la reducción de nitratos.	Manchas cloróticas intervenales y enrollamiento de hojas basales, inhibe floración.

*(Marschner, 2012; Taiz & Zeigler, 2010; Hopkins & Hüner, 2009).

Por otro lado, diversos autores mencionan que el pH alto logra inhibir la actividad microbiana. El género *Trichoderma* puede desarrollarse en suelos con pH desde 5.5 a 8.5, aunque los valores óptimos de crecimiento se encuentran entre 4.5-6.5 (Romero-Arenas et al., 2008; Martínez et al., 2013). Sin embargo, los valores de pH obtenidos se encuentran dentro del rango para un óptimo proceso de bioremediación, este rango comprende de 6 a 8.5 (Gómez et al., 2008).

Por último, Romaniuk y colaboradores, explican que el diésel hasta en una concentración de 15 000 ppm no produce efectos significativos sobre el pH, por lo que el cambio de valores en el mismo, no se debió al contaminante sino a la adición de SAP, que presenta un pH de 8.23 causado por el óxido de calcio que se agrega al sustrato antes de producir *Pleurotus* spp. y que alcaliniza el medio.

Por otra parte, la Figura 4.16, muestra los porcentajes de materia orgánica contenida en cada tratamiento, antes y después del proceso de biorremediación. Como puede observarse, los

tratamientos contaminados (T0, T1, T2, T3 y T4) muestran un aumento en materia orgánica inicial en comparación con sus blancos, esto se debe a que el carbono en el suelo aumenta en forma proporcional a la concentración de hidrocarburos contenidos en él (Martínez et al., 2001), sin embargo, este material es petrogénico y no biogénico, representando un riesgo ecotóxico (Moreno et al., 2004).

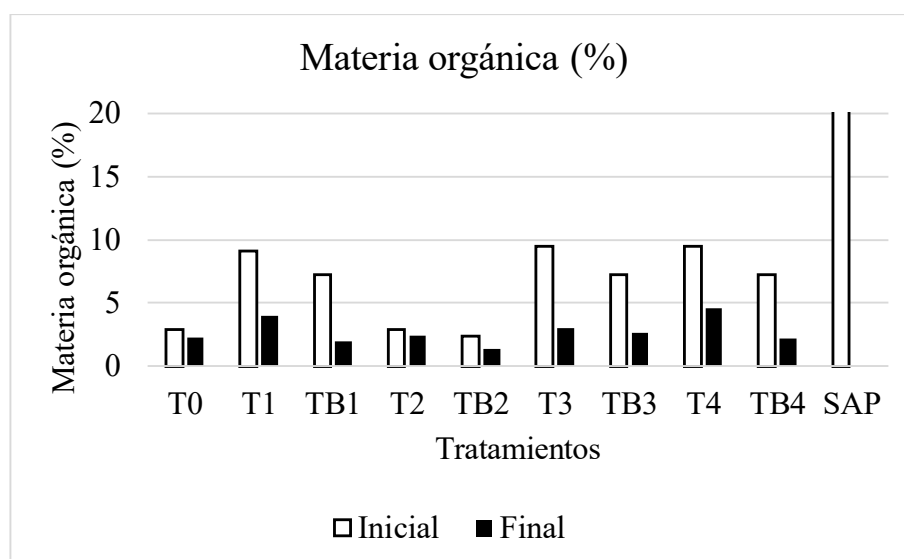


Figura 4.17 Gráfica Materia Orgánica antes y después del Ensayo de Biorremediación *

*T0= Microbiota autóctona

TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

TB1= Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico

SAP= Sustrato Agotado de *Pleurotus spp.*

La información contenida en la Figura 4.18, también arroja que la cantidad de materia orgánica disminuyó en todos los tratamientos, lo que permite inferir que la actividad microbiana aumentó degradando la materia orgánica (Pardo et al., 2004).

Por otro lado, la Figura 4.22 nos muestra los bajos niveles de nitrógeno encontrados en el suelo de todos los tratamientos, ocasionando no solo necrosis de hojas viejas, sino que también limitó el efecto biorremediador del medio (García et al., 2011).

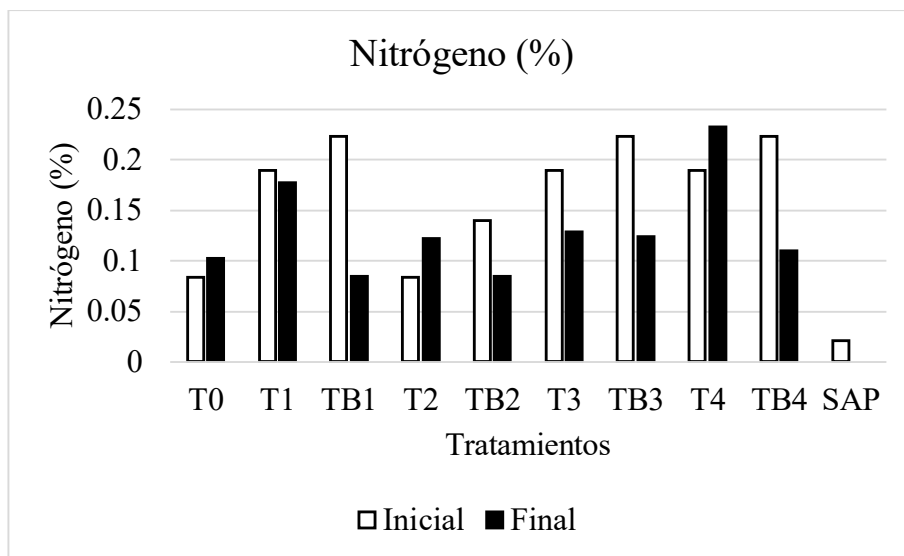


Figura 4.18 Gráfica Materia Orgánica antes y después del Ensayo de Biorremediación *

*T0= Microbiota autóctona

TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

TB1= Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico

SAP= Sustrato Agotado de *Pleurotus spp.*

La relación C:N se muestra en la Figura 4.23, donde se puede observar que al inicio del ensayo, el carbono se mostraba en menor proporción que el nitrógeno, mientras que al final del ensayo, estas proporciones se invirtieron, lo que resulta contraproducente para la etapa adulta de la planta, ya que la floración se ve activamente influenciada por estas proporciones (Marscher, 2012). Igualmente, la biorremediación de hidrocarburos muestra mejores resultados con relaciones C:N entre 100:10 – 100:1 (Van Hamme *et al.*, 2003), valores de C:N deficientes bajan 20% la remoción de hidrocarburos (Acuña *et al.*, 2008). Por lo tanto, los porcentajes tanto de Carbono como de nitrógeno pudieron limitar el efecto de biorremediación en los sistemas.

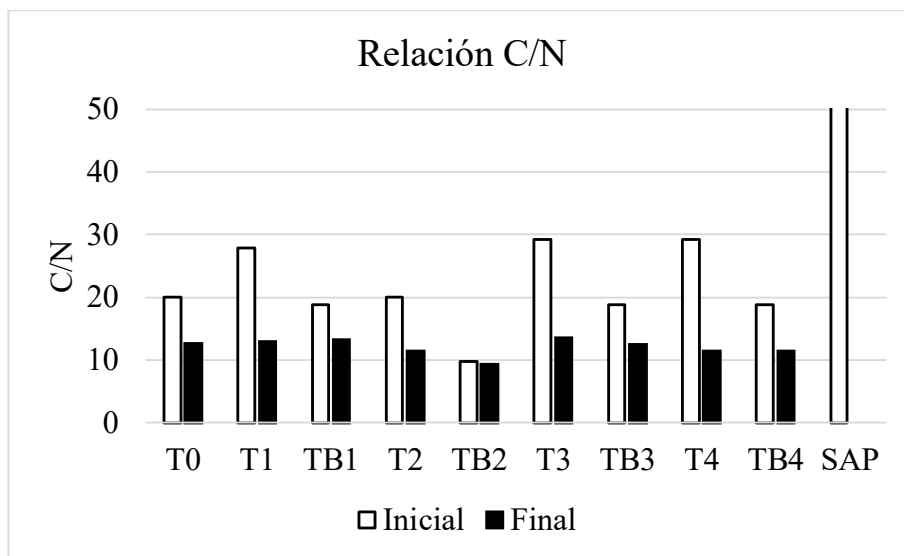


Figura 4.19 Gráfica Relación Carbono/Nitrógeno antes y después del Ensayo de Biorremediación *

*T0= Microbiota autóctona

TB0= Suelo sin contaminar+ Microbiota autóctona

T1= SAP+Complejo fúngico+Flor

TB1= Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico+Flor

T2=Complejo fúngico+Flor

TB2=Suelo sin contaminar + Complejo fúngico+Flor

T3= SAP+Flor

TB3= Suelo sin contaminar SAP+Flor

T4=SAP+Complejo fúngico

TB4=Suelo sin contaminar + SAP+Complejo fúngico

SAP= Sustrato Agotado de *Pleurotus spp.*

CAPÍTULO 5

Conclusiones

5.1 Conclusiones

- La presencia de hidrocarburos no afecta el crecimiento de *Gypsophyla paniculata* pero sí la síntesis de clorofila.
- La cuantificación de clorofila podría utilizarse como indicador biológico de HAP en suelos.
- *Trichoderma harzianum* puede actuar como promotor del crecimiento vegetal de *Gypsophyla paniculata* para prácticas sustentables agrícolas.
- El efecto del SAP en la biorremediación de hidrocarburos fue significativamente positivo.
- Los factores químicos del suelo influyen de manera importante en la biorremediación de un suelo contaminado con hidrocarburos y en la producción de *Gypsophyla paniculata*.
- Las características recalcitrantes de las moléculas del diésel no permiten una biodegradación rápida, lo que impidió cumplir con los límites establecidos por la NOM-138-SEMARNAT-2012.
- La biorremediación como tecnología agroecológica, permite utilizar suelos contaminados con hidrocarburos en la producción de *Gypsophyla paniculata* bajo condiciones de invernadero.

REFERENCIAS

- Acurio, R. y C. España. 2017. "Aislamiento, Caracterización y Evaluación de *Trichoderma* spp. Como Promotor de Crecimiento Vegetal en Pasturas de Raygrass (*Lolium perenne*) y Trébol Blanco (*Trifolium repens*).” La Granja: Revista de Ciencias de la Vida 25 (1): 53-61.
- Ajuru, M. G. & Nmom, F. W. Phytoremediation of crude oil polluted soil: a review focusing on hyperaccumulators and their structural adaptation. *Nigerian Journal of Oil & Gas Technology*, (3), 11-30
- Altieri, M. A., & Nicholls, C. (2013). Agroecología: única esperanza para la soberanía alimentaria y la resiliencia socioecológica. *Agroecología* 7 (2): 65-83 p.
- Altieri, M. A., y Nicholls, C. (2007). Conversión agroecológica de sistemas convencionales de producción: teoría, estrategias y evaluación. *Ecosistemas*, (16)
- Ángulo-Soto. ¿A QUÉ SE DEBE EL INCREMENTO DEL ROBO DE COMBUSTIBLE EN MÉXICO? (2019). Revista electrónica EXLEGE Universidad De La Salle Facultad de Derecho Año 2, núm. 3 Pp. 19-30
- Arroyo, M., Quesada, E., Quesada R., Geocisa, J. 2001. Aplicación de Sistemas de Biorremediación de Suelos y Aguas Contaminadas por Hidrocarburos. Div. Protección Ambiental de Suelos. España.
- Barragán-Huerta, B., Téllez, Y. & Laguna, A. (2008). Utilización de residuos agroindustriales. *Revista Sistemas Ambientales*, 2(1), 44-50.
- Bello, A., López Pérez, J.A., Díez Rojo, M.A., López Cepero, J., García Alvarez, A. 2008. Principios Ecológicos en la gestión de los agrosistemas. *Arbor*. 729:19-29
- Benavides L, Quintero G, Guevara AL, Jaimes DC, Gutiérrez SM, García J. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 2006;4:82-90.
- Bendía Ríos, Hildebrando. Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos mediante compost de aserrín y estiércol. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos , 2012
- BOLÍVAR, M.I.V.; MEDELLÍN, L.A.C.; TRUJILLO, M.M.P. Efecto de las deficiencias de algunos nutrientes en plantas de lulo (*Solanum quitoense* var. *quitoense*) en etapa de vivero. Facultad de Ciencias Básicas, Cundinamarca, v.5, p.64-81, 2009.

Cai, Z., Zhou, Q., Peng, S., & Li, K., 2010. Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *J. Hazard. Mater.* 183, 731–737.

Camargo-Cepeda D, Ávila ER. Efectos del *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento y desarrollo de la arveja (*Pisum sativum* L.). *Ciencia y Agricultura* 2013; 91-100.

Candelero, D.J., A.J. Cristóbal, R.A. Reyes, S.J.M. Tun S., A.M.M. Gamboa A., S.E. Ruíz, 2015. *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagoni- cas contra *Meloidogyne* incognita. *Revista Internacional de Botanica Experimental* φYTON 84: 113-119. 44

Caporal FR & JA Costabeber (2004) Agroecología e extensão rural. Contribuições para a promoção do desenvolvimento rural sustentável. MDA/SAF/DATER-IIICA. Brasília DF. 119 pp.

CASIERRA-POSADA, F; PEÑA, JE. 2010. Crecimiento y producción de *Gypsophila paniculata* en respuesta al termoperiodo, confinamiento y despunte. *Colimbiana de Ciencias Hortícolas* 4(3): 209 - 222.

Casierra-Posada, F., Peña Olmos, J., & Villareal, A. (2012). Crecimiento y producción de *Gypsophila paniculata* en respuesta al termoperiodo, confinamiento y despunte. *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 4(2), 199-208.

Castro, A., Acevedo-Berruecos, D., Urbietta, J., Iturbe, R., & Delgado-Rodríguez, O. (2013). Caracterización geoquímica y geoelectrica de un sitio contaminado por hidrocarburos en el Estado de Puebla, México. *Boletín de la Sociedad Geológica Mexicana*, 65(2), 405-418.

Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*, 11(4), 539–550.

Cavazos-Arroyo, J., Pérez-Armendáriz, B., & Mauricio-Gutiérrez, A. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, Sociedad Y Desarrollo*, 11(4), 539–550.

Chenaut V., (2017). Impactos sociales y ambientales de la explotación de hidrocarburos en el municipio de Papantla, Veracruz (México) Social and Environmental Impacts of Hydrocarbons Exploitation in the Papantla Municipality of Veracruz, Mexico.

Fayeulle, A., Veignie, E., Schroll, R., Munch, J. C., & Rafin, C. (2019). PAH biodegradation by telluric saprotrophic fungi isolated from aged PAH-contaminated soils in mineral medium and historically contaminated soil microcosms. *Journal of Soils and Sediments*, (19), 3056–3067

Flores-Puente, M.A., Torras-Ortiz, S. and Téllez-Gutiérrez, Medidas de Mitigación para uso de Suelos cContaminados por Derrames de Hidrocarburos en Infraestructura de Transporte Terrestre, Sanfandila, I.M.d.T. Secretaría de Comunicaciones y Transportes, Editor 2004.

García-Delgado, C. (2015). Bioremediation of contaminated soils with polycyclic aromatic hydrocarbons using spent mushroom substrate (Agaricus bisporus) (Tesis doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. España

GARCÍA-TORRES, R.; RÍOS-LEAL, E.; MARTINEZ- TOLEDO, A.; RAMOS-MORALES, F.R.; CRUZ-SAN- CHEZ, J.S.; CUEVAS-DÍAZ, M del C. (2011). Uso de ca- chaza y bagazo de caña de azúcar en la remoción de hidro- carburos en suelo contaminado. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 27(1): 31-39

González, H., & Molina, N. F. (2017). Mecanismo de acción de cinco microorganismos promotores de crecimiento vegetal. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(1), 17-31. Recuperado de <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=6045804>

González, N. (18 de enero de 2019). Pemex gastó tres mil mdp en reparar ductos; costos de 2006 a 2017. *Excelsior*.

Gribble K, Conroy JP, Holford P, Milham PJ. In vitro uptake of minerals by *Gypsophyla paniculata* and hybrid eucalypts, and relevance to media mineral formulation. *Aust J Bot* 2002;50:713–23.

J. Tang, X. Lu, Q. Sun, W. Zhu, Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions, *Agric. Ecosyst. Environ.* 149 (2012) 109–117.

Jianwang. Li, X. Shang, Z. Zhao, R.L. Tanguay, Q. Dong, C. Huang, Polycyclic aromatic hydrocarbons in water, sediment, soil, and plants of the Aojiang River waterway in Wenzhou, China, *J. Hazard. Mater.* 173 (2010) 75–81. doi:10.1016/j.jhazmat.2009.08.050.

Kim, K.-H., Jahan, S.A., Kabir, E., Brown, R.J., 2013. A review of airborne polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and their human health effects. *Environ. Int.* 60, 71–80.

Kulshreshtha Arpita, Agrawa ranu , Barar manika , Saxena shilpi. (2014). A Review On Bioremediation Of Heavy Metals In Contaminated Water, *IOSR Journal Of Environmental Science, Toxicology And Food Technology*, 2014, 8:44-50.

Li R-X, Cai F, Pang G, Shen Q-R, Li R, Chen W (2015) Solubilisation of Phosphate and Micronutrients by *Trichoderma harzianum* and Its Relationship with the Promotion of Tomato Plant Growth. PLoS ONE 10(6): e0130081. doi:10.1371/journal.pone.0130081

Limnetica, 28 (2): 215-224 (2009)c Asociaci' on Ib' erica de Limnolog' Æa, Madrid. Spain. ISSN: 0213-8409Limnetica, 27 (2): xxx-xxx (2008)Incorporaci' on de nitr' ogeno y f' osforo por *Sarcocornia perennis* (Miller) A. J. Scott en concentraciones reales en el estuario del r' Æo Palmones

Liu R, Zhou QX. Treatment and remediation of petroleum-contaminated soils using selective ornamental plants. Environ Eng Sci 2012;29(6):494–501.;

Liu WT, Zhou QX, An J, Sun YB, Liu R. Variations in cadmium accumulation among Chinese cabbage 2 cultivars and screening for Cd-safe cultivars. J Hazard Mater 2010;173(1–3):737–43.

Luna-Fontalvo, J., Córdoba-López, L., Gil-Pertuz, K., & Romero-Borja, I. (2013). Efecto de residuos agroforestales parcialmente biodegradados por *Pleurotus ostreatus* (Pleurotaceae) sobre el desarrollo de plántulas de tomate. Acta biológica colombiana, 18 (2), 365-374.

Machado, H. y Campos, M. (2008). Reflexiones acerca de los ecosistemas agrícolas y la necesidad de su conservación. Pastos y Forrajes, 31 (4), 307-320.

Marschner P (2012) Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants, Ed 3. Academic Press, San Diego

Martínez-Carrera, D., P. Morales, M. Sobal, M. Bonilla & W. Martínez. (2007). México ante la globalización en el siglo XXI: el sistema de producción consumo de los hongos comestibles. El Cultivo de Setas *Pleurotus* spp. en México. 20.

Martínez, B., D. Infante y Y. Reyes. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Protección Vegetal 28(1): 1-11.

Mata, G., Salmenes, D., & Michel S. (2017). Las enzimas lignocelulíticas de *Pleurotus* spp. La biología, el cultivo y las propiedades nutricionales y medicinales de las setas *Pleurotus* spp. 63-82

Mayett, Y., & Martínez-Carrera, D. (2010). El consumo de los hongos comestibles y su relevancia en la seguridad alimentaria de México. Hacia un Desarrollo Sostenible del Sistema de Producción-Consumo de los Hongos Comestibles y Medicinales en Latinoamérica: Avances y Perspectivas en el Siglo XXI. 293-329

Mezzanotte, V., Anzano, M., Collina, E., Marazzi, F.A., Lasagni, M., 2016. Distribution and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons in two Italian municipal wastewater treatment plants in 2011–2013. *Polycycl. Aromat. Compd.* 36, 213–228.

Montero-Vieira, J. I. (2018). Expansión del robo de combustible en México: de actividad delictiva a fenómeno criminal. *Instituto Español de Asuntos Estratégicos*, (119), 611-625

Muszynska, E., Hanus-Fajerska, E., Kozminska, A., 2018b. Differential tolerance to lead and cadmium of micropropagated *Gypsophila fastigiata* ecotype. *Water Air Soil Pollut.* 229, 42.

Naseri M, Barabadi A, Barabady J (2014) Bioremediation treatment of hydrocarbon-contaminated Arctic soils: influencing parameters. *Environ Sci Pollut Res Int* 21(19):11250–11265

Nguemte, M., Gregoire, N., Djumyom W., Djocgoue, P. F., Kengne N. & Wanko, N. (2018) Floristic surveys of hydrocarbon-polluted sites in some Cameroonian cities (Central Africa), *International Journal of Phytoremediation*, (20), 3

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-021-SEMARNAT-2000. Diario Oficial de la federación. México, 31 de diciembre de 2002

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Diario Oficial de la federación. México, 29 de marzo de 2005.

Nungaray-Arteaga, N. (2014). Fitorremediación del suelo de la mina La Blanca, Hidalgo, con plantas de la especie Cosmos bipinnatus y el género Dahlia (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, México.

Ortínez-Brito, O., Ize-Lema, I., & Gavilán-García, A. (2003). La restauracion de sulos contaminados con hidrocarburos en Mexico. *Gaceta ecologica*, (69), 83-92

Pardo-Giménez, A., Zied, D. C., & Pardo-Gonzalez, J. E. (2010). Utilización de compost agotado de champiñón como capa de coberturas en nuevos ciclos de producción. *Pesqui.Agropecu.Bras.*, (45), 1164–1171

Pardo-González JE (2009). Elaboración de nuevos substratos para cultivo de *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm. basados en substratos degradados por cultivo de hongos. *Inform. Téc. Econ. Agrar.* 105:89-98,.

PEMEX. (2019). Reporte de Tomas Clandestinas. Diciembre 2019, de Petróleos Mexicanos
Sitio web: https://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx

Pérez-Armendáriz B., Castañeda-Antonio D., Jiménez-Salgado G., Tapia- Hernández A. y Martínez-Carrera D. (2011). Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz

Pérez-Armendáriz, B. (2005). Estudio de la variación de la población hidrocarbonoclasta durante la remoción de hidrocarburos empleando cultivo sólido (Tesis doctoral). Centro de Investigación de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Ciudad de México, México.

Pernía, B., Demey, J.R., Inojosa, Y., & Naranjo-Briceño, L. (2012) Biodiversidad y potencial hidrocarbonoclastico de hongos aislados de crudo y sus derivados: un meta-análisis. Rev Latinoam Biotecnol Amb Algal, (3), 1–40.

Petróleos Mexicanos. (2019). Reporte de Tomas Clandestinas en 2018. México: Nombre de la página web. http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx

Philippe Morard , Corinne Fulcheri & Max Henry (1999) Mineral nutrition of Gypsophila in vitro root culture, Journal of Plant Nutrition, 22:4-5, 717-730, DOI: 10.1080/01904169909365667

Pozdnyakova N, Dubrovskaya E, Chernyshova M, et al. The degradation of three-ringed polycyclic aromatic hydrocarbons by wood-inhabiting fungus *Pleurotus ostreatus* and soil-inhabiting fungus *Agaricus bisporus*. Fungal Biol. 2018;122:363–372

Pucci GN, Acuña AJ, Pucci OH. Biodegradación de hidrocarburos en la meseta patagónica, un resumen de la optimización de los parámetros a tener en cuenta. Ingen Sanit Amb. 2011;115(3):36-41.

Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Lokeshkumar B, Rajendran P, Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. Asian Pacific J Tropical Biomed 2015; 5: 182–89.

Reyes-César, A., Absalón, Á., Fernández, F., González, J., & Cortés-Espinosa, D. (2014). Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. World J. Microbiol. Biotechnol. (30), 999–1009.

Reyes-César, A., Absalón, Á., Fernández, F., González, J., Cortés-Espinosa, D., 2014. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 30, 999 –1009.

Rodríguez-Aristizabal, M. (2017). Aportes desde el enfoque agroecológico para el manejo de la salinización del suelo con bacterias halófilas en Sáchica-Boyacá. (Magister en Ciencias Ambientales). Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales U.D.C.A.

Romero, A.O., Huerta, L.M., Damian, H.M.A., Dominguez, H.F., Arellano, V.D.A. 2009. Características de *Trichoderma harzianum*, como agente limitante en el cultivo de hongos comestibles. *Revista Colombiana de Biotecnología*.11(2):143-151. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/11759/12297>

Romero, M. C., Hammer, E., Hanschke, R., Arambarri, A. M., & Schauer, F. (2005). Biotransformation of biphenyl by filamentous fungus *Talaromyces helicus*. *World J. Microbiol. Biotech*, (21), 101-106.

Romero, M. C., Reinoso, E. H., Urrutia, M. I. & Moreno Kiernan, A. (2006). Biosorption of heavy metals by *Talaromyces helicus*: a trained fungus for copper and biphenyl detoxification. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9(3), 0-0.

Romero, M. C., Urrutia, M. I., Reinoso, H. E., & Moreno, K. M. (2010) Benzo[a]pyrene degradation by soil filamentous fungi. *J Yeast Fungal Res* (1), 25–29

Ros, M., Pacual, J., Ayuso, M., Morales, A., Miralles, & Solera, C. (2012). Salidas valorizables de los residuos y subproductos orgánicos de la industria de los transformados de frutas y hortalizas: proyecto Life+ Agrowaste. *Residuos: Revista técnica*, 130(22), 28-35.

Sardan, Cheema, Imran Khan, M.; Shen, C.; Tang, X.; Farooq, M.; Chen, L.; Zhang, C.; Chen, Y. Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *J. Hazard. Mater.* 2010, 177 (1–3), 384–9.

SAVAL, S. 2012. Aprovechamiento de residuos agroindustriales: pasado, presente y futuro”. 2012 *Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería*, A.C. 16 (2): 14–46.

Sepúlveda, Y. L., M. C. Díez., N. W. Osorio., F. H. Moreno., y J. D. León. 2014. Caracterización de los síntomas visuales de deficiencias nutricionales de 95 plántulas del roble andino en invernadero. *Agronomía Costarricense*, 38(1), 161-173.

Sevilla-Guzmán E, G Ottmann & M González de Molina (2006) Los marcos conceptuales de la Agroecología. En: Agroecología: Conceitos e Experiências. Orgs. MAB Figueiredo, JRT Lima, Ed. Bagaço, Recife. pp.101-156.

Sharma P, Patel AN, Saini MK, Deep S (2012). Field demonstration of *Trichoderma harzianum* as a plant growth promoter in wheat (*Triticum aestivum* L). *J. Agric. Sci.* 4(8):65-73.

Sharma, R., Bhardwaj, R., Gautam, V., Bali, S., & Kaur, R., (2018). Phytoremediation in Waste management: hyperaccumulation diversity and techniques. In: *Plants under metal and metalloid stress*. Springer, Singapore. 277–302

Suman S, Sinha A, Tarafdar A. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) concentration levels, pattern, source identification and soil toxicity assessment in urban traffic soil of Dhanbad, India. *Sci Total Environ.* 2016;545–546:353–360. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12. 061. PMID:26747999.

Tlahuextl-Tlaxcalteca, C., Ávila-Sanchez, J., & Leszczyńska-Borys, H. (2005). Flores de corte y follaje en florerías y mercados de Puebla, México. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 11 (2), 323-327.

Tripathi, P., Singh, P., & Mishra, A. (2013). *Trichoderma*: a potential bioremediator for environmental clean up. *Clean Techn Environ Policy* 15(4): 541-50.

Vácha, R., Čechmánková, J., Skála, J., 2010. Polycyclic aromatic hydrocarbons in soil and selected plants. *Plant Soil Environ.* 56, 434–443.

Vargas-Corredor, Y. A., & Perez-Perez, L. I. (2018). Aprovechamiento de los Residuos Agroindustriales en el Mejoramiento de la Calidad del Ambiente. *Revista Facultad de Ciencias Básicas*, 1-14.

Xiao, N., Liu, R., Jin, C., & Dai, Y. (2015). Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecological Engineering*, 75, 384–391.

Xu, G., Zhang, F., Shah, S.G., Ye, Y., Mao, H., 2011. Use of leaf color images to identify nitrogen 683 and potassium deficient tomatoes. *Pattern Recognition Letters*, 32, 1584–1590.

Yakovleva, E. V., V. A. Beznosikov, B. M. Kondratenok, and D. N. Gabov. “Bioaccumulation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Soil–Plant Systems of the Northern–Taiga Biocenoses.” *Eurasian Soil Sci.* 45, no. 3 (2013): 309– 320.

Yu Zhang & Gui-Jian Liu (2019) Uptake, accumulation and phytoextraction efficiency of cesium in *Gypsophila paniculata*, International Journal of Phytoremediation, 21:13, 1290-1295, DOI: 10.1080/15226514.2019.1566878

Zafra, G., & Cortés-Espinosa, D. V. (2015). Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Trichoderma* species: a mini review. Environmental Science and Pollution Research, (22), 19426–19433.

Zafra, G., Moreno-Montaña, A., Absalón, Á. E., & Cortés-Espinosa, D. V., (2015). Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil by a tolerant strain of *Trichoderma asperellum*. Environ. Sci. Pollut. Res. (22), 1034–1042.

ANEXOS

Anexo 1

Preparación de agar Papa Dextrosa BD Bioxon®

- Pesar 39 g Agar papa dextrosa BD Bioxon®
- Disolver en 1 L de agua destilada
- Autoclavear durante 45 minutos
- Vertirla en cajas petri estériles
- Esperar a que gelifique

Anexo 2

Preparación de caldo de Extracto de Malta DIBICO®

- Pesar 19 g caldo de extracto de malta DIBICO®
- Disolver en 1 L de agua destilada
- Autoclavear durante 45 minutos
- Vertirlo en matraces estériles

Anexo 3

Resultados de análisis físico-químicos y de fertilidad del suelo inicial

Parámetro/Muestra	Blanco	Contaminado	Blanco + SAP	Contaminado+ SAP	Método
pH	7.51	7.76	7.2	7.67	AS-02*
Materia orgánica (%)	2.37	2.90	7.21	9.50	AS-07*
N total (%)	0.14	0.084	0.223	0.189	AS-25*
C/N	9.819	20.025	18.753	27.928	
Textura	Franco arenosa	Franco arenosa	Franco arenosa	Franco arenosa	Franco arenosa
Ca (cmolc/Kg)	3.55	6.62	6.2	21.94	AS-12*
Mg (cmolc/Kg)	0.5	1.233	4.9	1.966	AS-12*
Na (cmolc/Kg)	0.313	0.582	0.6	0.379	AS-12*
K (cmolc/Kg)	0.6	0.8	0.9	0.9	AS-12*
P (mg/kg)	10.36	11.41	8.26	23.45	Bray-1
DA (g/mL)	1.337	1.325	1.22	1.183	Probeta
CE (dS/m)	166	131	470	141	AS-18*

Anexo 4
Especificaciones HPLC

INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS: GCMS

D:\MSDCHEM\1\METHODS\HIDROCARBUROSALTATEMP.M
Sat Mar 02 03:32:51 2019

Control Information

Sample Inlet : GC
Injection Source : GC ALS
Mass Spectrometer : Enabled

No Sample Prep method has been assigned to this method.

Oven
Equilibration Time 2 min
Max Temperature 350 degrees C
Slow Fan Disabled
Oven Program On
50 °C for 4 min
then 15 °C/min to 350 °C for 1 min
Run Time 25 min
0.5 min (Post Run) 350 °C
Cryo Off

Front Injector
Syringe Size 100 µL
Injection Volume 3 µL
Solvent A Washes (PreInj) 2
Solvent A Washes (PostInj) 2
Solvent A Volume 20 µL
Solvent B Washes (PreInj) 2
Solvent B Washes (PostInj) 2
Solvent B Volume 20 µL
Sample Washes 1
Sample Wash Volume 20 µL
Sample Pumps 1
Dwell Time (PreInj) 0 min
Dwell Time (PostInj) 0 min
Solvent Wash Draw Speed 3000 µL/min
Solvent Wash Dispense Speed 60000 µL/min
Sample Wash Draw Speed 3000 µL/min

Sample Wash Dispense Speed	60000 µL/min
Injection Dispense Speed	60000 µL/min
Viscosity Delay	0 sec
Sample Depth	Disabled
Injection Type	Standard
L1 Airgap	1 µL

Sample Overlap
Sample overlap is not enabled

Front SS Inlet He	
Mode	Split
Heater	On 300 °C
Pressure	On 0.23311 psi
Total Flow	On 16.2 mL/min
Septum Purge Flow	On 3 mL/min
Gas Saver	Off
Split Ratio	10 :1
Split Flow	12 mL/min

Thermal Aux 1 (G3520 Transfer Line)	
Heater	Off
Temperature Program	Off
30 °C for 0 min	
Run Time	25 min

Thermal Aux 2 (MSD Transfer Line)	
Heater	On
Temperature Program	On
300 °C for 0 min	
Run Time	25 min

Column #1
Agilent 19091S-413HP-5MS 5% Phenyl Methyl Silox
350 °C: 30 m x 320 µm x 0.25 µm
In: Front SS Inlet He
Out: Vacuum

(Initial)	50 °C
Pressure	0.23311 psi
Flow	1.2 mL/min
Average Velocity	39.923 cm/sec
Holdup Time	1.2524 min
Flow Program	On
1.2 mL/min for 0 min	
Run Time	25 min
0.5 min (Post Run)	1 mL/min

Front Detector FID

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Heater	Off
H2 Flow	Off
Air Flow	Off
Makeup Flow	Off
Const Col + Makeup	Off
Flame	Off
Electrometer	On

Back Detector TCD

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Heater	Off
Reference Flow	Off
Makeup Flow	Off
Const Col + Makeup	Off
Negative Polarity	Off
Filament	Off

Aux EPC 1 N2

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Pressure Program	Off
10 psi for 0 min	
Run Time	25 min

Aux EPC 2 He

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Pressure Program	Off
10 psi for 0 min	
Run Time	25 min

Aux EPC 3 He

Excluded from Affecting GC's Readiness State

Pressure Program	Off
10 psi for 0 min	
Run Time	25 min

Signals

Signal #1: Front Signal	Save Off
50 Hz	

Signal #2: Test Plot	Save Off
50 Hz	

Signal #3: Test Plot	Save Off
50 Hz	

Signal #4: Test Plot Save Off
50 Hz

MS ACQUISITION PARAMETERS

General Information

Tune File : atune.u
Acquisition Mode : Scan

MS Information

--

Solvent Delay : 0.00 min

EMV Mode : Gain Factor
Gain Factor : 1.00
Resulting EM Voltage : 2129

[Scan Parameters]

Low Mass : 30.0
High Mass : 450.0
Threshold : 150
Sample # : 2 A/D Samples 4

[MSZones]

MS Source : 230 C maximum 250 C
MS Quad : 150 C maximum 200 C

END OF MS ACQUISITION PARAMETERS

TUNE PARAMETERS for SN: US11077601

Trace Ion Detection is OFF.

EMISSION : 34.610
ENERGY : 69.922

REPELLER : 32.301
IONFOCUS : 90.157
ENTRANCE_LE : 19.000
EMVOLTS : 1870.588
Actual EMV : 2129.41
GAIN FACTOR : 1.00
AMUGAIN : 1021.000
AMUOFFSET : 121.938
FILAMENT : 1.000
DCPOLARITY : 0.000
ENTLENSOFFS : 19.075
MASSGAIN : -1151.000
MASSOFFSET : -36.000

END OF TUNE PARAMETERS

END OF INSTRUMENT CONTROL PARAMETERS

Anexo 5
Condiciones iniciales de la especie vegetal

Muestra /Variable	Peso seco total (g)	Peso húmedo RAÍZ (g)	Peso húmedo TALLO (g)	Peso humedo TOTAL (g)
1	0.554	5.703	0.554	6.257
2	0.208	9.037	0.431	9.468
3	0.515	11.849	0.597	12.446
4	0.534	11.811	0.415	12.226
5	0.307	11.216	0.495	11.711
6	0.521	12.347	0.415	12.762
7	0.337	9.765	0.386	10.151
8	0.308	10.33	0.368	10.698
9	0.139	8.352	0.404	8.756
10	0.09	7.142	0.263	7.405
Muestra /Variable	Hojas verdaderas	Peso seco RAÍZ (g)	Peso seco TALLO (g)	Largo RAÍZ (cm)
1	7	0.479	0.075	4
2	7	1.731	0.064	2.5
3	10	2.017	0.085	4.2
4	8	2.074	0.047	3.6
5	10	1.828	0.066	2.5
6	9	2.06	0.048	3.3
7	8	1.87	0.054	4.6
8	8	1.849	0.046	5.9
9	8	1.668	0.058	4.1
10	7	1.641	0.036	5.5
Muestra /Variable	Largo TALLO (cm)	Diametro (mm)	IDC	Clorofila Total (µg)
1	3.9	0.8	0.110104663	4.9784
2	2.4	1	0.073125	4.6488
3	4.2	0.9	0.10587251	5.2434
4	3.1	0.7	0.118008946	5.1344
5	3.6	0.9	0.071832039	4.5224
6	3.7	1.1	0.150355705	4.2414
7	3.3	0.9	0.087362748	3.9398
8	2.9	1.1	0.10953307	6.0492
9	3.2	1	0.035494956	5.456
10	2.7	0.8	0.022268041	5.9034

Anexo 6
Conteo de esporas

Talaromyces helicus

Dilución 1		Esporas			
Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	4	3	1	2.66666667
	2	2	1	2	1.66666667
	3	1	4	4	3
	4	4	3	2	3
	5	1	2	1	1.33333333
	6	2	4	3	3
	7	1	1	4	2
	8	1	2	2	1.66666667
	9	4	3	3	3.33333333
	10	1	4	4	3
	11	2	2	2	2
	12	2	2	3	2.33333333
Externa	b	182	109	140	143.666667
	c	204	141	146	163.666667
	d	216	118	141	158.333333
	e	164	146	123	144.333333
		791	545	581	639

79.875x10 ml

Dilución 5**Esporas**

Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	0	1	1	0.66666667
	2	1	1	1	1
	3	1	2	2	1.66666667
	4	2	2	1	1.66666667
	5	0	1	1	0.66666667
	6	2	0	0	0.66666667
	7	1	0	2	1
	8	2	1	1	1.33333333
	9	1	1	1	1
	10	0	2	0	0.66666667
	11	1	1	1	1
	12	1	1	1	1
Externa	b	24	24	22	23.3333333
	c	15	21	29	21.6666667
	d	29	19	22	23.3333333
	e	9	14	8	10.3333333

Dilución10**Esporas**

Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	0	1	1	0.66666667
	2	1	2	1	1.33333333
	3	1	0	0	0.33333333
	4	0	2	0	0.66666667
	5	0	1	1	0.66666667
	6	1	1	0	0.66666667
	7	0	1	1	0.66666667
	8	1	0	0	0.33333333
	9	0	1	0	0.33333333
	10	1	1	0	0.66666667
	11	1	1	1	1
	12	0	1	1	0.66666667
Externa	b	4	5	4	4.33333333
	c	7	5	3	5
	d	6	4	7	5.66666667
	e	4	4	6	4.66666667
		27	30	26	27.6666667

**3.45833333x10
esporas/ml**

Trichoderma harzianum

Dilución 1

Esporas

Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	2	0	0	0.666666667
	2	1	0	2	1
	3	2	1	2	1.666666667
	4	2	2	0	1.333333333
	5	0	2	0	0.666666667
	6	1	2	2	1.666666667
	7	1	1	1	1
	8	2	2	1	1.666666667
	9	0	2	3	1.666666667
	10	1	1	0	0.666666667
	11	1	0	0	0.333333333
	12	1	0	2	1
Externa	b	18	25	17	20
	c	33	28	26	29
	d	32	22	29	27.66666667
	e	20	29	22	23.66666667
		117	117	107	113.6666667

14.2083333x10
ml

Dilución 5

Esporas

Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	1	0	0	0.333333333
	2	0	0	0	0
	3	0	1	1	0.666666667
	4	2	0	1	1
	5	1	1	1	1
	6	0	0	0	0
	7	1	1	0	0.666666667
	8	1	1	1	1
	9	0	0	1	0.333333333
	10	0	0	0	0
	11	1	0	0	0.333333333
	12	2	0	0	0.666666667
Externa	b	3	2	1	2
	c	2	1	3	2
	d	2	2	2	2
	e	3	1	2	2

Dilución 10**Esporas**

Camara de neubauer		Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	PROMEDIO
Interna a	1	0	0	0	0
	2	1	0	0	0.333333333
	3	1	0	0	0.333333333
	4	1	0	0	0.333333333
	5	0	1	0	0.333333333
	6	0	1	1	0.666666667
	7	0	1	0	0.333333333
	8	1	0	1	0.666666667
	9	1	0	0	0.333333333
	10	1	0	0	0.333333333
	11	0	0	1	0.333333333
	12	0	0	0	0
Externa	b	1	0	1	0.666666667
	c	2	0	1	1
	d	2	1	3	2
	e	1	1	2	1.333333333

12

5

10

27

3.375 esporas/ml

Anexo 7

ANOVA y Tukey Variables biológicas

ANOVA de un solo factor: Peso Húmedo (g) vs. Tratamientos

Menú ▾

Método

Hipótesis nula Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna No todas las medias son iguales
Nivel de significancia $\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	91.10	18.220	4.80	0.004
Error	24	91.14	3.797		
Total	29	182.24			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
1.94870	49.99%	39.57%	21.86%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	2.010	1.026	(0.211, 3.809)
T2	5	3.229	0.967	(1.430, 5.028)
T3	5	1.602	1.566	(-0.197, 3.401)
TB1	5	2.488	1.458	(0.689, 4.287)
TB2	5	6.86	2.84	(5.06, 8.66)
TB3	5	2.60	2.85	(0.80, 4.40)

Desv.Est. agrupada = 1.94870

Comparaciones en parejas de Tukey

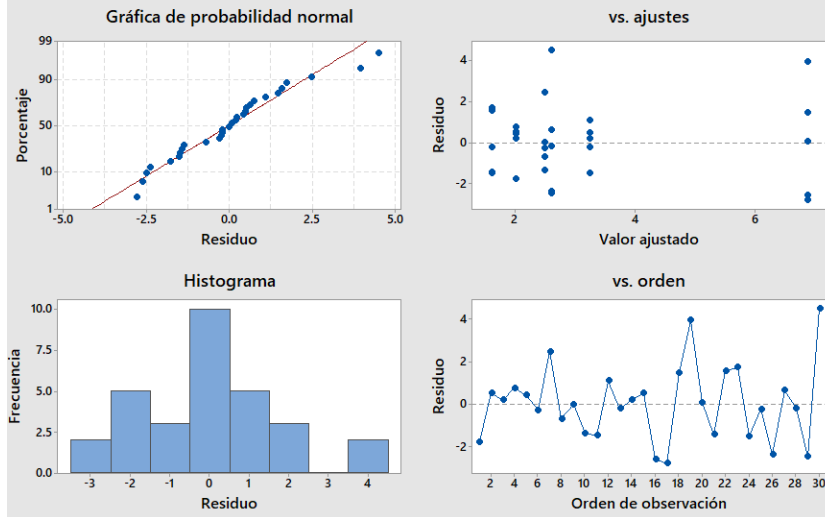
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	6.86	A
T2	5	3.229	A B
TB3	5	2.60	B
TB1	5	2.488	B
T1	5	2.010	B
T3	5	1.602	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

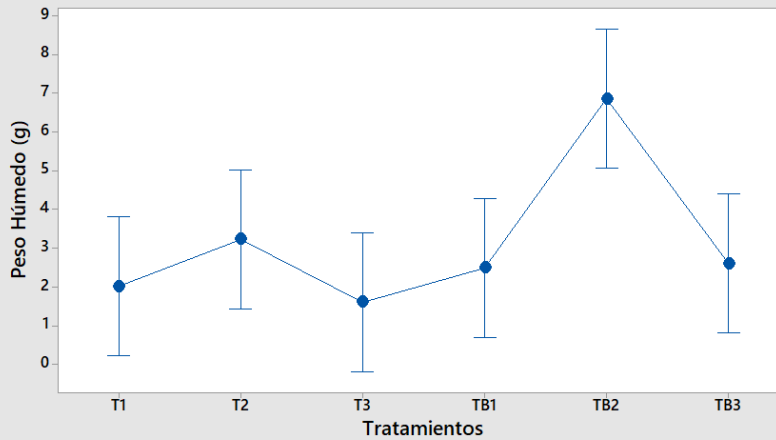
ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráficas de residuos para Peso Húmedo (g)



Gráfica de intervalos de Peso Húmedo (g) vs. Tratamientos

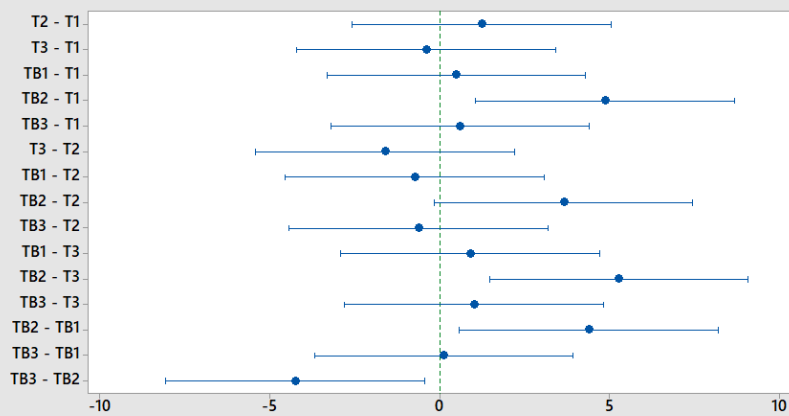
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Peso Húmedo (g)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Peso Seco (g) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	8.333	1.6666	9.71	0.000
Error	24	4.117	0.1716		
Total	29	12.450			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.414190	66.93%	60.04%	48.33%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	0.378	0.226	(-0.004, 0.761)
T2	5	0.6544	0.2037	(0.2721, 1.0367)
T3	5	0.2538	0.2230	(-0.1285, 0.6361)
TB1	5	0.532	0.342	(0.150, 0.914)
TB2	5	1.839	0.774	(1.457, 2.221)
TB3	5	0.507	0.413	(0.125, 0.890)

Desv.Est. agrupada = 0.414190

Comparaciones en parejas de Tukey

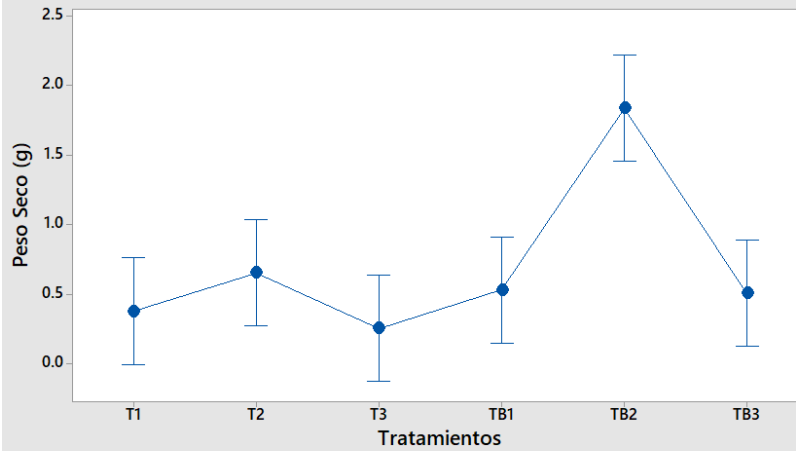
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	1.839	A
T2	5	0.6544	B
TB1	5	0.532	B
TB3	5	0.507	B
T1	5	0.378	B
T3	5	0.2538	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

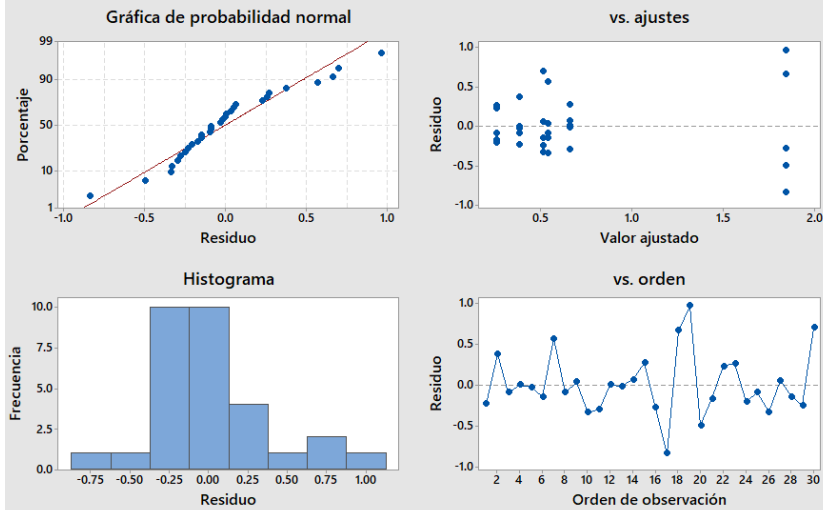
ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráfica de intervalos de Peso Seco (g) vs. Tratamientos
95% IC para la media

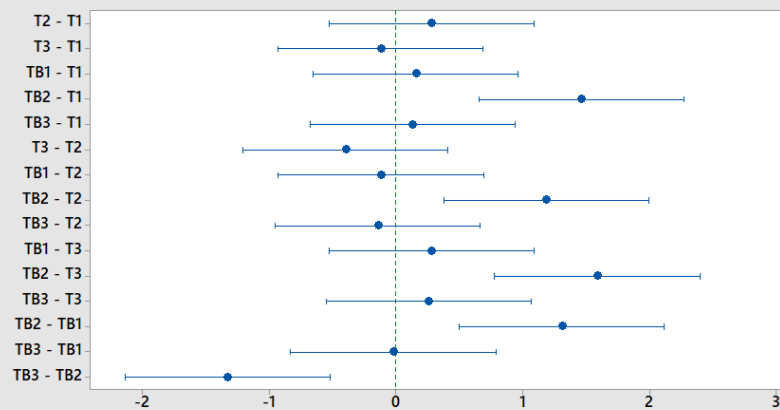


La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

Gráficas de residuos para Peso Seco (g)



ICs simultáneos de 95% de Tukey
Diferencias de las medias para Peso Seco (g)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Clorofila Total (ug) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	1334.1	266.82	8.10	0.000
Error	24	790.4	32.93		
Total	29	2124.5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
5.73886	62.80%	55.04%	41.87%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	1.233	0.726	(-4.064, 6.530)
T2	5	2.825	1.038	(-2.472, 8.122)
T3	5	1.898	1.747	(-3.399, 7.195)
TB1	5	10.80	6.01	(5.50, 16.10)
TB2	5	20.19	4.81	(14.90, 25.49)
TB3	5	9.08	11.56	(3.79, 14.38)

Desv.Est. agrupada = 5.73886

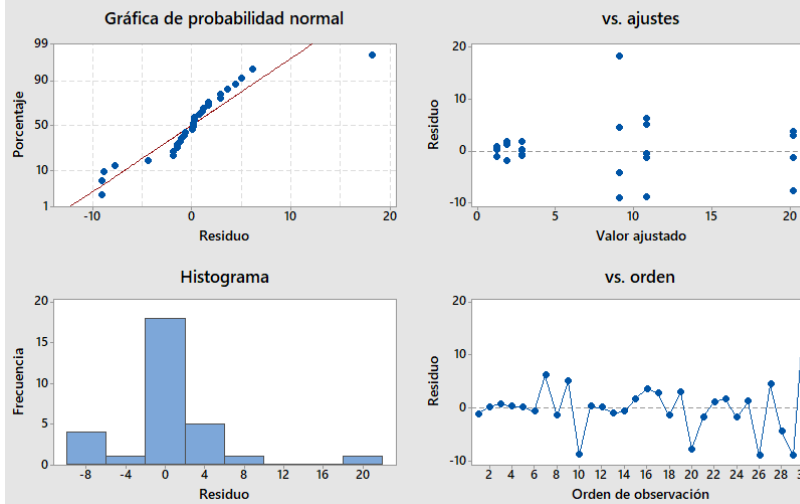
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

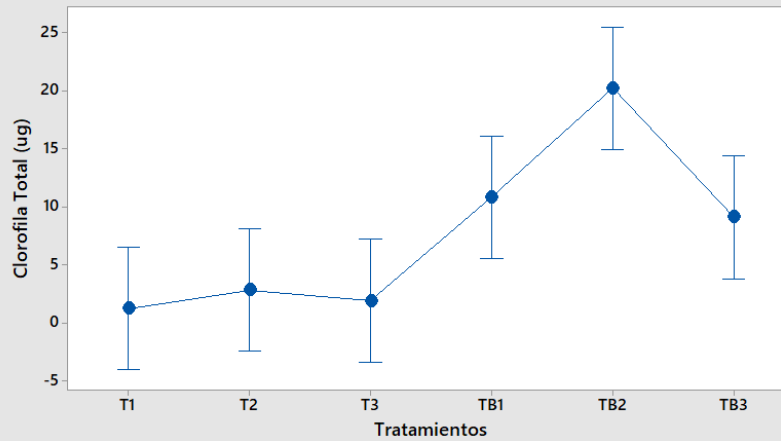
Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	20.19	A
TB1	5	10.80	A B
TB3	5	9.08	A B
T2	5	2.825	B
T3	5	1.898	B
T1	5	1.233	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráficas de residuos para Clorofila Total (ug)

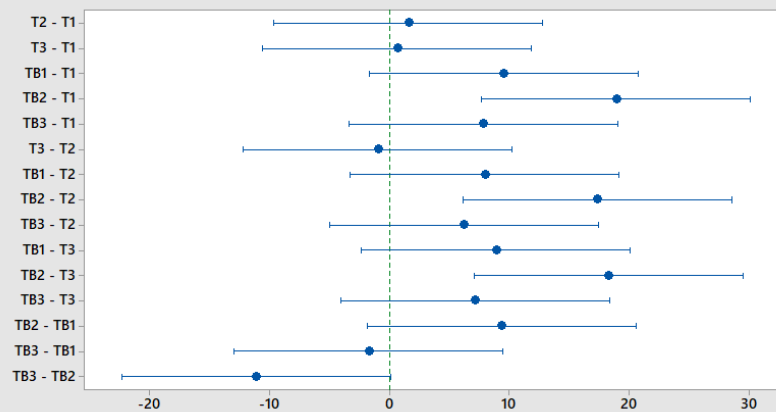


Gráfica de intervalos de Clorofila Total (ug) vs. Tratamientos 95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey Diferencias de las medias para Clorofila Total (ug)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Largo aéreo (cm) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC		Valor F	Valor p
		Ajust.	MC Ajust.		
Tratamientos	5	1675	334.96	5.78	0.001
Error	24	1390	57.91		
Total	29	3065			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
7.60995	54.65%	45.20%	29.14%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	21.18	2.55	(14.16, 28.20)
T2	5	24.700	1.685	(17.676, 31.724)
T3	5	12.52	9.78	(5.50, 19.54)
TB1	5	27.16	7.57	(20.14, 34.18)
TB2	5	37.46	12.46	(30.44, 44.48)
TB3	5	22.06	5.48	(15.04, 29.08)

Desv.Est. agrupada = 7.60995

Comparaciones en parejas de Tukey

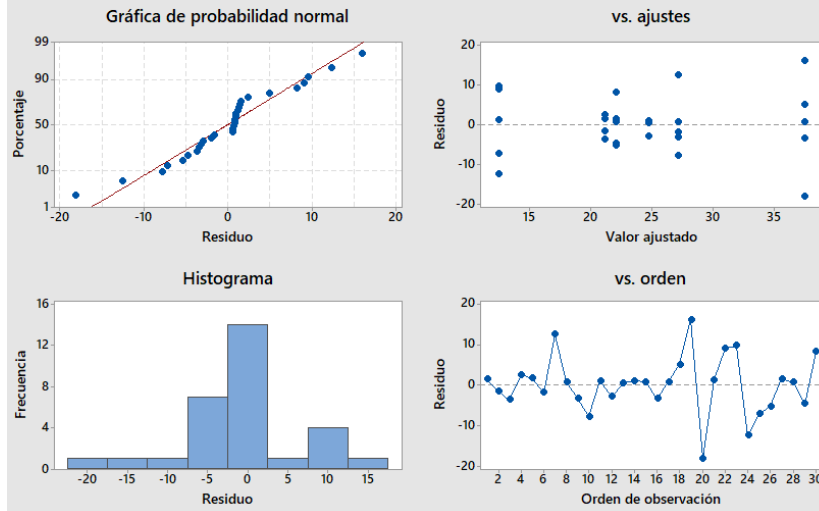
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	37.46	A
TB1	5	27.16	A B
T2	5	24.700	A B
TB3	5	22.06	B
T1	5	21.18	B
T3	5	12.52	B

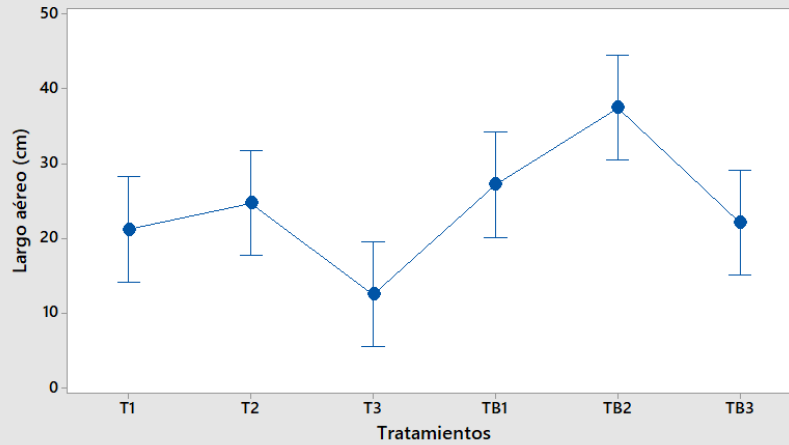
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráficas de residuos para Largo aéreo (cm)

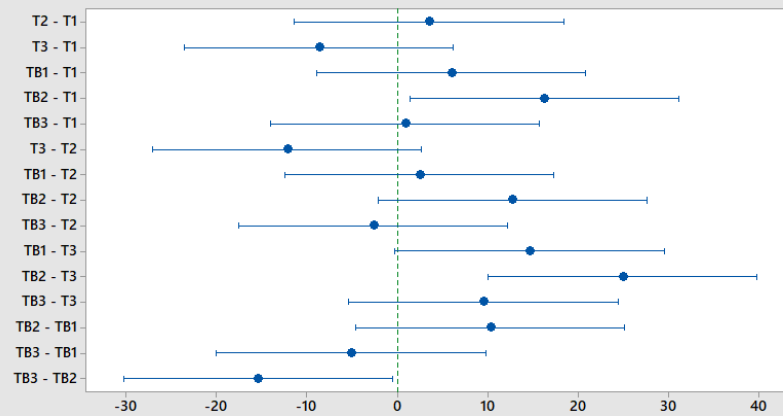


Gráfica de intervalos de Largo aéreo (cm) vs. Tratamientos 95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey Diferencias de las medias para Largo aéreo (cm)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Diámetro (mm) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	7.386	1.4771	5.53	0.002
Error	24	6.416	0.2673		
Total	29	13.802			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.517043	53.51%	43.83%	27.36%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	1.240	0.261	(0.763, 1.717)
T2	5	1.380	0.268	(0.903, 1.857)
T3	5	0.920	0.559	(0.443, 1.397)
TB1	5	1.480	0.335	(1.003, 1.957)
TB2	5	2.520	0.630	(2.043, 2.997)
TB3	5	1.360	0.802	(0.883, 1.837)

Desv.Est. agrupada = 0.517043

Comparaciones en parejas de Tukey

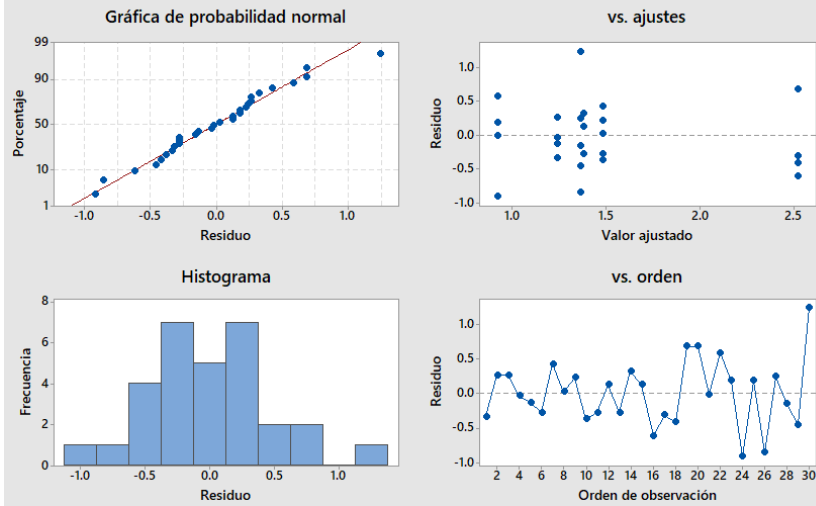
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	2.520	A
TB1	5	1.480	B
T2	5	1.380	B
TB3	5	1.360	B
T1	5	1.240	B
T3	5	0.920	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

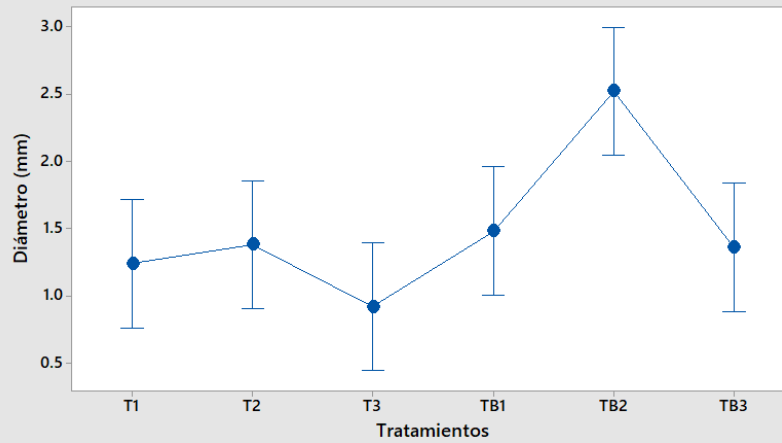
ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráficas de residuos para Diámetro (mm)



Gráfica de intervalos de Diámetro (mm) vs. Tratamientos

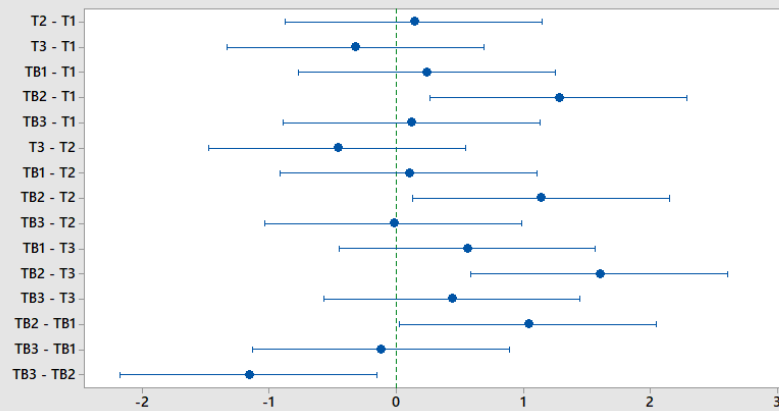
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Diámetro (mm)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Hojas vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	908.3	181.65	3.93	0.010
Error	24	1110.4	46.27		
Total	29	2018.7			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
6.80196	44.99%	33.53%	14.05%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	13.60	2.61	(7.32, 19.88)
T2	5	15.200	1.789	(8.922, 21.478)
T3	5	13.20	7.95	(6.92, 19.48)
TB1	5	22.00	8.00	(15.72, 28.28)
TB2	5	28.80	6.57	(22.52, 35.08)
TB3	5	19.20	9.86	(12.92, 25.48)

Desv.Est. agrupada = 6.80196

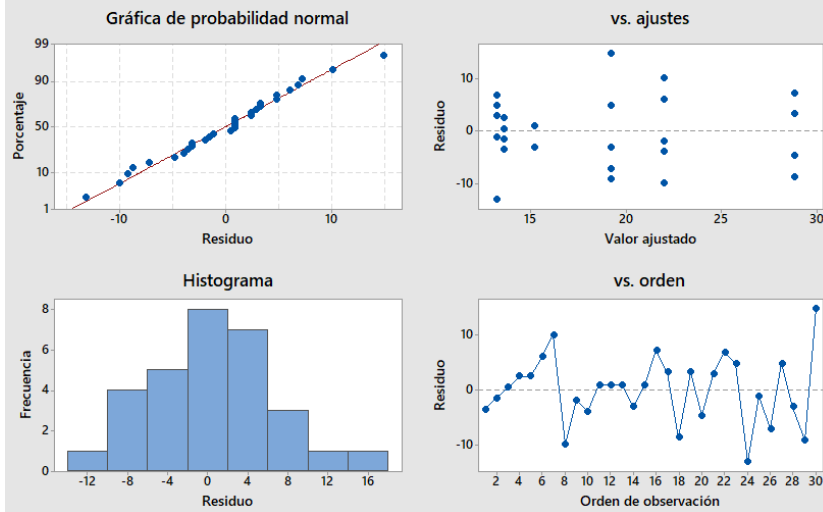
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	28.80	A
TB1	5	22.00	A B
TB3	5	19.20	A B
T2	5	15.200	B
T1	5	13.60	B
T3	5	13.20	B

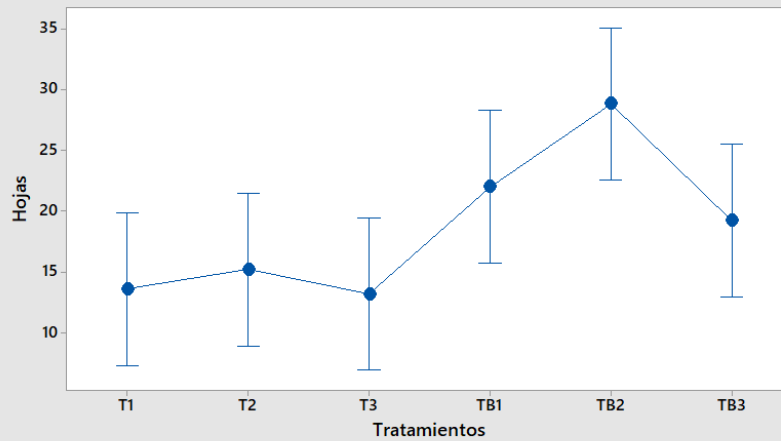
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráficas de residuos para Hojas



Gráfica de intervalos de Hojas vs. Tratamientos

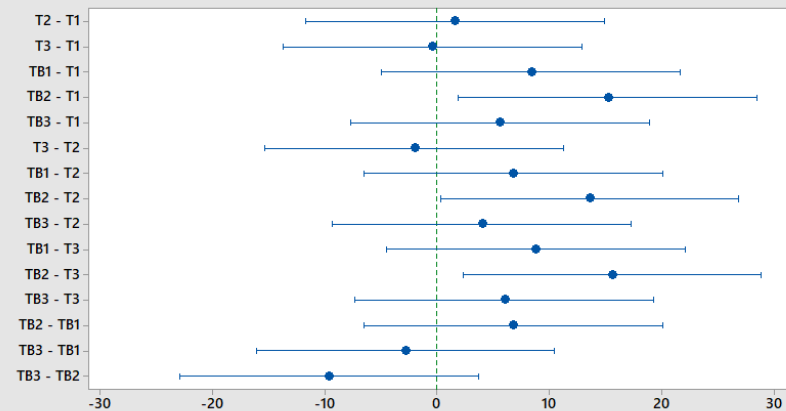
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Hojas



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Flores vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	43.20	8.640	1.71	0.172
Error	24	121.60	5.067		
Total	29	164.80			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
2.25093	26.21%	10.84%	0.00%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	0.000000	0.000000	(-2.077612, 2.077612)
T2	5	0.600	0.894	(-1.478, 2.678)
T3	5	0.600	1.342	(-1.478, 2.678)
TB1	5	3.40	3.85	(1.32, 5.48)
TB2	5	0.400	0.894	(-1.678, 2.478)
TB3	5	2.20	3.49	(0.12, 4.28)

Desv.Est. agrupada = 2.25093

Comparaciones en parejas de Tukey

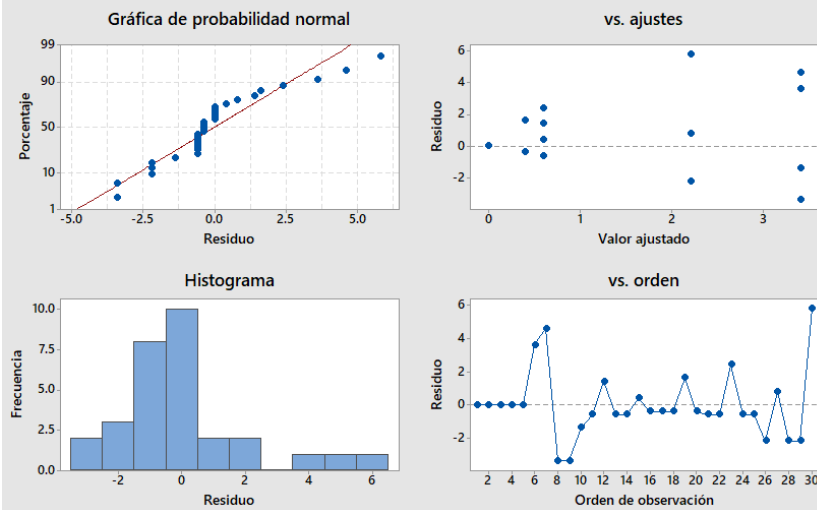
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB1	5	3.40	A
TB3	5	2.20	A
T3	5	0.600	A
T2	5	0.600	A
TB2	5	0.400	A
T1	5	0.000000	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

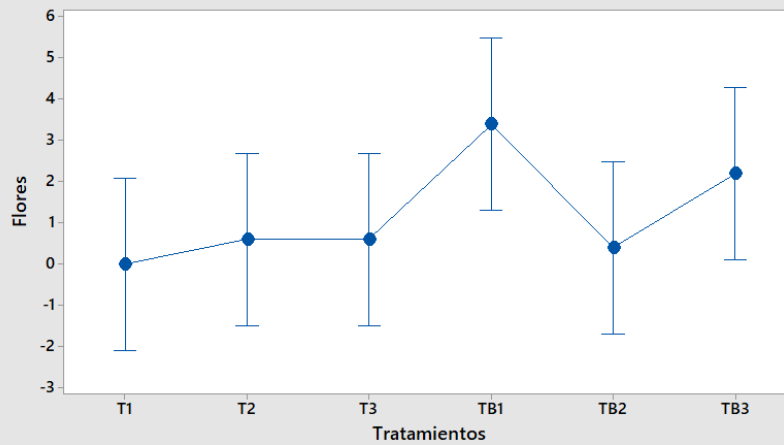
ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráficas de residuos para Flores



Gráfica de intervalos de Flores vs. Tratamientos

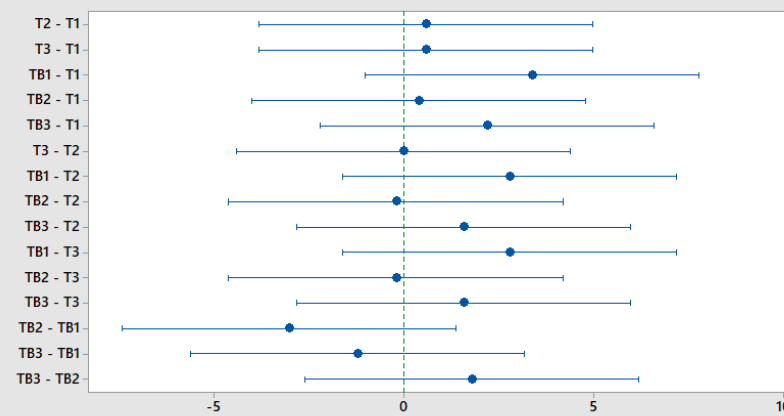
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Flores



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Botones vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	101.9	20.37	1.15	0.360
Error	24	423.6	17.65		
Total	29	525.5			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
4.20119	19.39%	2.59%	0.00%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	1.200	1.304	(-2.678, 5.078)
T2	5	1.400	1.342	(-2.478, 5.278)
T3	5	0.800	1.095	(-3.078, 4.678)
TB1	5	1.40	2.61	(-2.48, 5.28)
TB2	5	6.20	9.34	(2.32, 10.08)
TB3	5	1.80	2.68	(-2.08, 5.68)

Desv.Est. agrupada = 4.20119

Comparaciones en parejas de Tukey

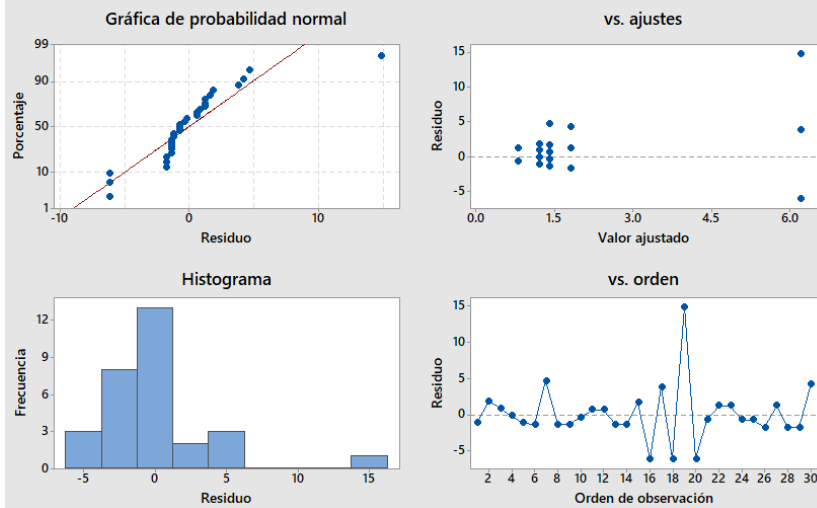
Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	6.20	A
TB3	5	1.80	A
TB1	5	1.40	A
T2	5	1.400	A
T1	5	1.200	A
T3	5	0.800	A

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

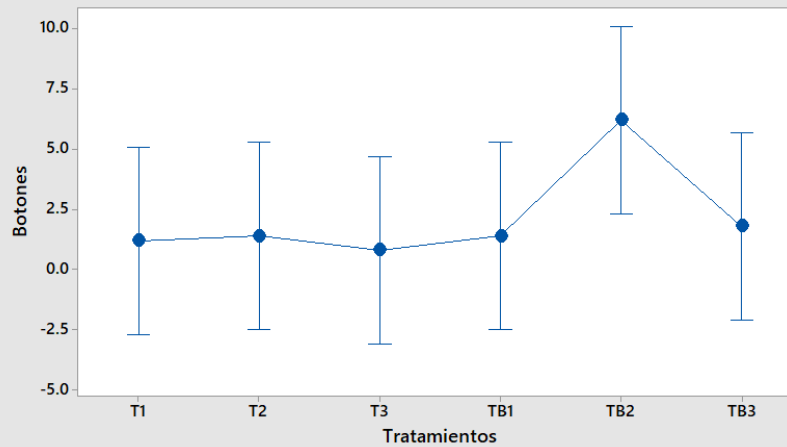
ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráficas de residuos para Botones



Gráfica de intervalos de Botones vs. Tratamientos

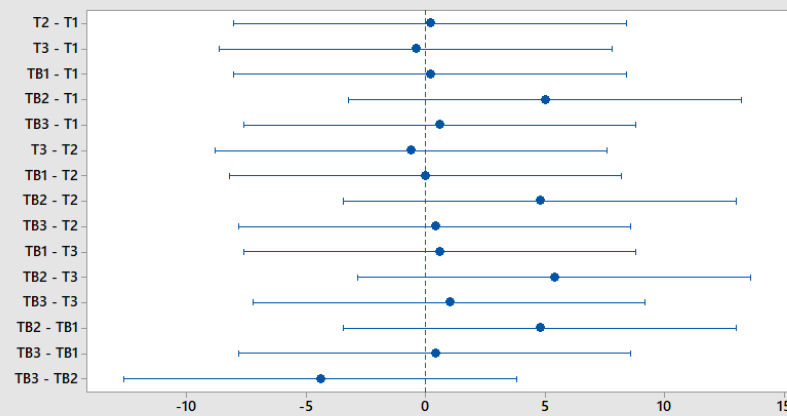
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Botones



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Peso seco radical (g) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	0.8154	0.16308	5.64	0.001
Error	24	0.6942	0.02892		
Total	29	1.5096			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.170071	54.01%	44.43%	28.15%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	0.1280	0.0618	(-0.0290, 0.2850)
T2	5	0.3784	0.2121	(0.2214, 0.5354)
T3	5	0.0812	0.0811	(-0.0758, 0.2382)
TB1	5	0.06300	0.01728	(-0.09398, 0.21998)
TB2	5	0.494	0.317	(0.337, 0.651)
TB3	5	0.1132	0.1325	(-0.0438, 0.2702)

Desv.Est. agrupada = 0.170071

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95% ▾

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	0.494	A
T2	5	0.3784	A B
T1	5	0.1280	B
TB3	5	0.1132	B
T3	5	0.0812	B
TB1	5	0.06300	B

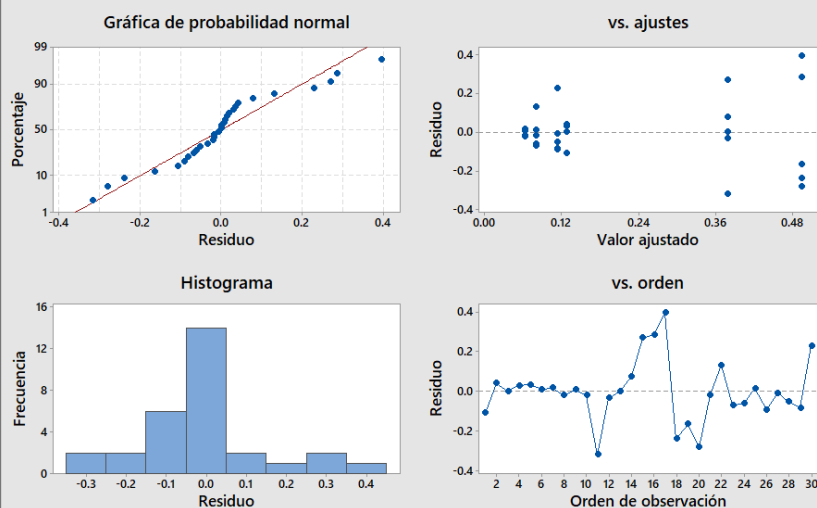
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Gráfica de intervalos de Peso seco radical (g) vs. Tratamientos

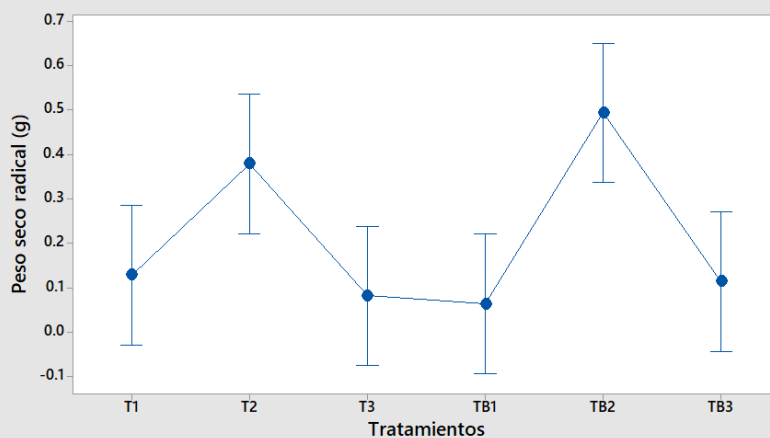
Gráficas de residuos para Peso seco radical (g)

Gráficas de residuos para Peso seco radical (g)



Gráfica de intervalos de Peso seco radical (g) vs. Tratamientos

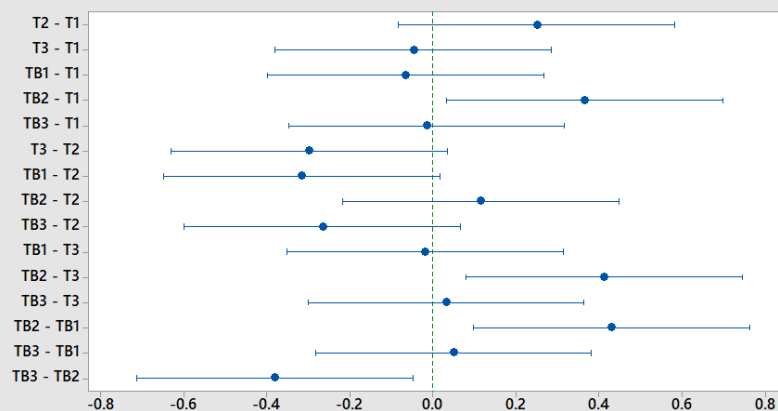
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para Peso seco radical (g)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: Peso seco parte aérea (g) vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	4.724	0.9448	4.49	0.005
Error	24	5.047	0.2103		
Total	29	9.770			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.458561	48.35%	37.59%	19.29%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	0.2504	0.1880	(-0.1729, 0.6737)
T2	5	0.2760	0.0232	(-0.1473, 0.6993)
T3	5	0.1726	0.2074	(-0.2507, 0.5959)
TB1	5	0.469	0.330	(0.046, 0.892)
TB2	5	1.345	0.997	(0.922, 1.768)
TB3	5	0.394	0.282	(-0.029, 0.817)

Desv.Est. agrupada = 0.458561

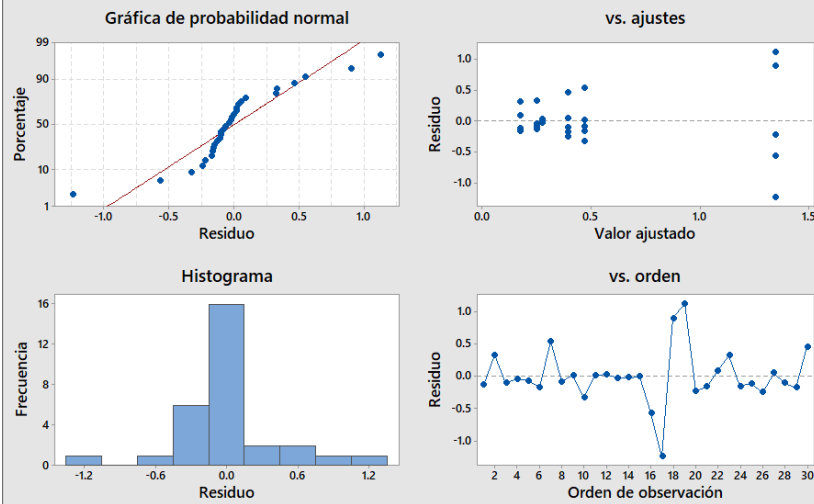
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

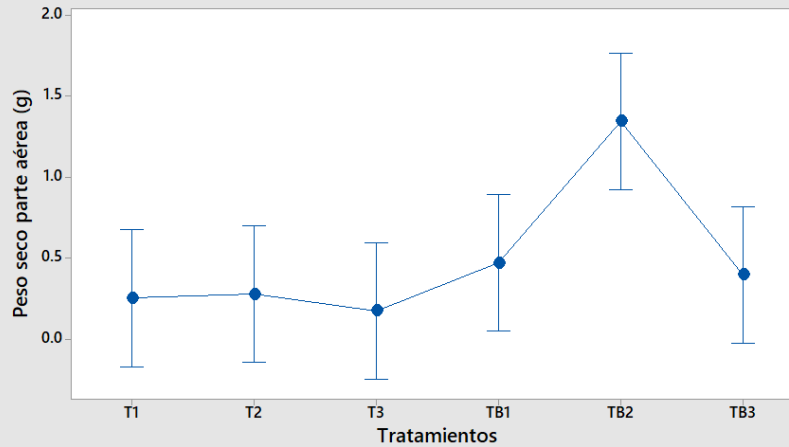
Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	1.345	A
TB1	5	0.469	A B
TB3	5	0.394	B
T2	5	0.2760	B
T1	5	0.2504	B
T3	5	0.1726	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráficas de residuos para Peso seco parte aérea (g)

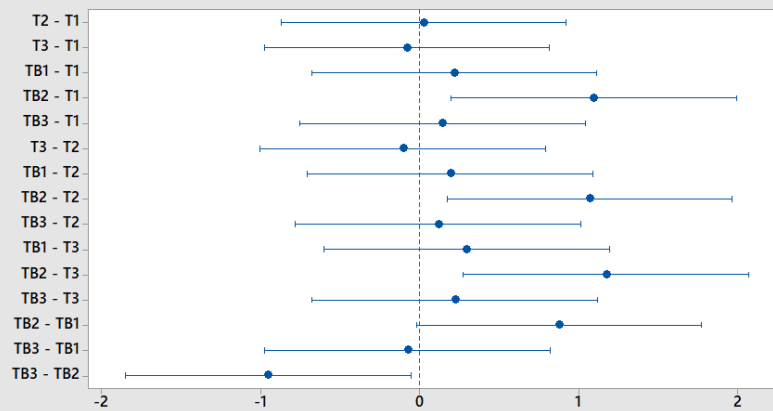


Gráfica de intervalos de Peso seco parte aérea (g) vs. Tratamientos 95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey Diferencias de las medias para Peso seco parte aérea (g)



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

ANOVA de un solo factor: ICD vs. Tratamientos

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamientos	6	T1, T2, T3, TB1, TB2, TB3

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamientos	5	0.02061	0.004123	9.82	0.000
Error	24	0.01007	0.000420		
Total	29	0.03069			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
0.0204879	67.17%	60.33%	48.71%

Medias

Tratamientos	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T1	5	0.02112	0.01511	(0.00221, 0.04003)
T2	5	0.03614	0.01629	(0.01723, 0.05505)
T3	5	0.01470	0.01418	(-0.00421, 0.03361)
TB1	5	0.01994	0.00966	(0.00103, 0.03885)
TB2	5	0.0920	0.0255	(0.0731, 0.1109)
TB3	5	0.0287	0.0328	(0.0098, 0.0476)

Desv.Est. agrupada = 0.0204879

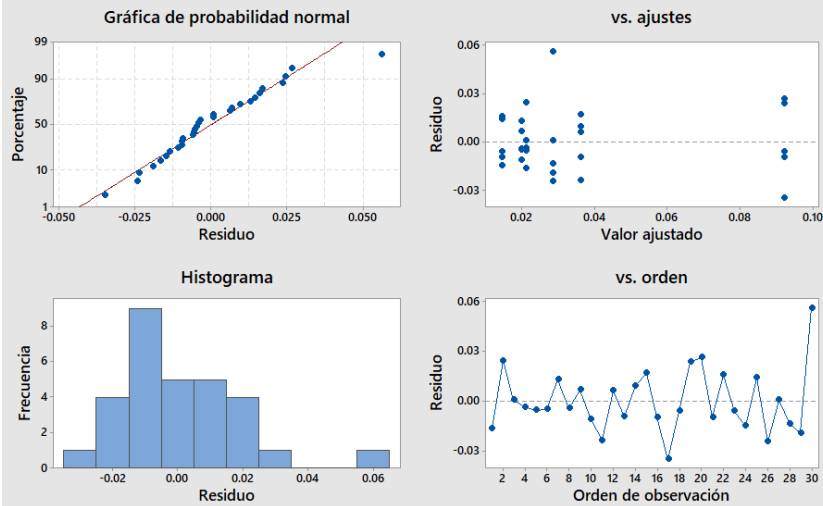
Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamientos	N	Media	Agrupación
TB2	5	0.0920	A
T2	5	0.03614	B
TB3	5	0.0287	B
T1	5	0.02112	B
TB1	5	0.01994	B
T3	5	0.01470	B

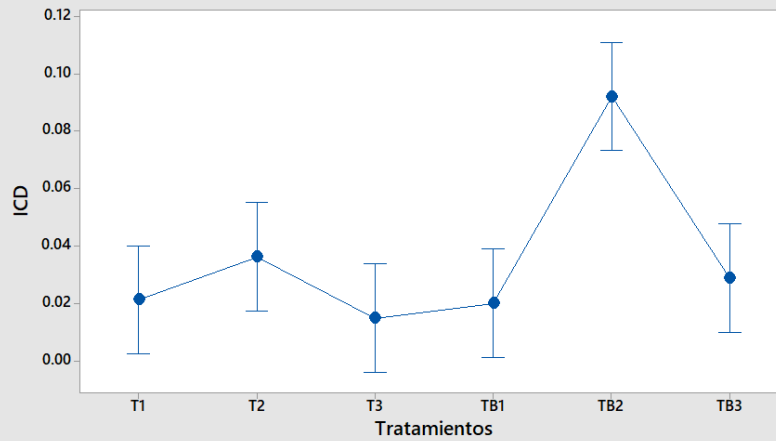
Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.

Gráficas de residuos para ICD



Gráfica de intervalos de ICD vs. Tratamientos

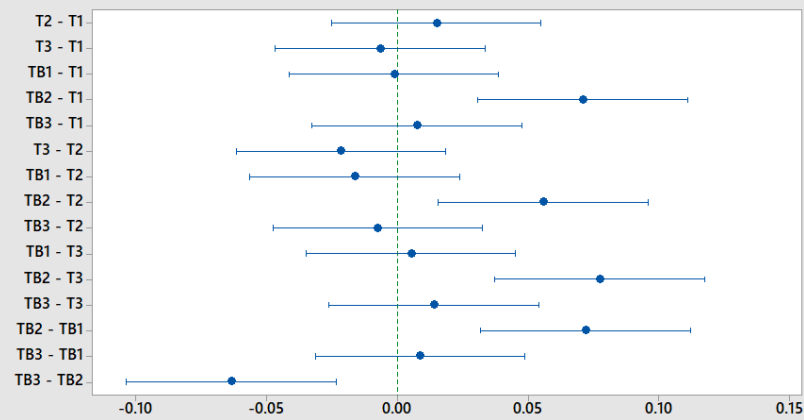
95% IC para la media



La desviación estándar agrupada se utilizó para calcular los intervalos.

ICs simultáneos de 95% de Tukey

Diferencias de las medias para ICD



Si un intervalo no contiene cero, las medias correspondientes son significativamente diferentes.

Anexo 8
HPLC (cm²)

T0 Microbiota autóctona

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	T0 inicial			T0 final		
		Área 1	Área 2	Área 3	Área 1	Área 2	Área 3
C5	1.032	25696871	26339292.78	25054449.23	34688313	35833027.3	33543598.7
C6	1.172	0	0	0	0	0	0
C10	10.531	26994375	27669234.38	26319515.63	7470270	7716788.91	7223751.09
C15	11.402	60001645	61501686.13	58501603.88	17639532	18221636.6	17057427.4
C16	12.215	110593426	113358261.7	107828590.4	0	0	0
C15 c/isómeros (C18)	12.576	41195185	42225064.63	40165305.38	17080526	17644183.4	16516868.6
C17	12.952	0	0	0	0	0	0
C18	13.67	68893096	70615423.4	67170768.6	29062598	30021663.7	28103532.3
C16 c/isómeros (C20)	13.732	34543836	35407431.9	33680240.1	15246348	15749477.5	14743218.5
C19	14.377	58128990	59582214.75	56675765.25	28671846	29618016.9	27725675.1
C20	15.643	52743874	54062470.85	51425277.15	24181037	24979011.2	23383062.8
C21	16.227	56393299	57803131.48	54983466.53	28255120	29187539	27322701
C22	16.432	0	0	0	5094970	5263104.01	4926835.99
C23	16.797	0	0	0	37990402	39244085.3	36736718.7
C24	17.352	70048005	71799205.13	68296804.88	46218724	47743941.9	44693506.1
C20 c/isómeros	17.878	57189145	58618873.63	55759416.38	35947491	37133758.2	34761223.8
C25	18.384	45625859	46766505.48	44485212.53	30032997	31024085.9	29041908.1
C26	18.871	39971813	40971108.33	38972517.68	17359588	17932454.4	16786721.6
C29	19.805	18279051	18736027.28	17822074.73	10746727	11101369	10392085
C30	20.249	0	0	0	6771651	6995115.48	6548186.52

T1 SAP+ Complejo fúngico + Flor

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	T1 inicial			T1 final		
		Área 1	Área 2	Área 3	Área 1	Área 2	Área 3
C5	1.032	14121764	14700756.32	13542771.68	32905865	33794323.4	32017406.6
C6	1.172	133469952	138942220	127997684	0	0	0
C10	10.531	18993710	19772452.11	18214967.89	14195577	14578857.6	13812296.4
C15	11.402	41473239	43173641.8	39772836.2	26681846	27402255.8	25961436.2
C16	12.215	81641276	84988568.32	78293983.68	53419168	54861485.5	51976850.5
C15 c/isómeros (C18)	12.576	30484490	31734354.09	29234625.91	21705684	22291737.5	21119630.5
C17	12.952	65761159	68457366.52	63064951.48	39086957	40142304.8	38031609.2
C18	13.67	56955066	59290223.71	54619908.29	37477522	38489415.1	36465628.9
C16 c/isómeros (C20)	13.732	28022811	29171746.25	26873875.75	20888877	21452876.7	20324877.3
C19	14.377	52697179	54857763.34	50536594.66	32608408	33488835	31727981
C20	15.643	43370655	45148851.86	41592458.15	25864578	26562921.6	25166234.4
C21	16.227	50608309	52683249.67	48533368.33	25673244	26366421.6	24980066.4
C22	16.432	9910998	10317348.92	9504647.082	7349618	7548057.69	7151178.31
C23	16.797	64067238	66693994.76	61440481.24	28318240	29082832.5	27553647.5
C24	17.352	71847648	74793401.57	68901894.43	31051034	31889411.9	30212656.1
C20 c/isómeros	17.878	61893615	64431253.22	59355976.79	24308652	24964985.6	23652318.4
C25	18.384	52711247	54872408.13	50550085.87	21131923	21702484.9	20561361.1
C26	18.871	32635686	33973749.13	31297622.87	12116159	12443295.3	11789022.7
C29	19.805	28361591	29524416.23	27198765.77	10785658	11076870.8	10494445.2
C30	20.249	10520332	10951665.61	10088998.39	0	0	0

T2 Complejo fúngico + Flor

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	T2 inicial			T2 final		
		Área 1	Área 2	Área 3	Área 1	Área 2	Área 3
C5	1.032	25696871	26262202.16	25131539.84	33382325	35018058.9	31746591.1
C6	1.172	0	0	0	0	0	0
C10	10.531	26994375	27588251.25	26400498.75	25326922	26567941.2	24085902.8
C15	11.402	60001645	61321681.19	58681608.81	47357862	49678397.2	45037326.8
C16	12.215	110593426	113026481.4	108160370.6	90028677	94440082.2	85617271.8
C15 c/isómeros (C18)	12.576	41195185	42101479.07	40288890.93	36465560	38252372.4	34678747.6
C17	12.952	0	0	0	0	0	0
C18	13.67	68893096	70408744.11	67377447.89	58743731	61622173.8	55865288.2
C16 c/isómeros (C20)	13.732	34543836	35303800.39	33783871.61	34065797	35735021.1	32396572.9
C19	14.377	58128990	59407827.78	56850152.22	53939233	56582255.4	51296210.6
C20	15.643	52743874	53904239.23	51583508.77	43131668	45245119.7	41018216.3
C21	16.227	56393299	57633951.58	55152646.42	44314811	46486236.7	42143385.3
C22	16.432	0	0	0	9571355	10040351.4	9102358.61
C23	16.797	0	0	0	0	0	0
C24	17.352	70048005	71589061.11	68506948.89	49728710	52165416.8	47292003.2
C20 c/isómeros	17.878	57189145	58447306.19	55930983.81	39746289	41693857.2	37798720.8
C25	18.384	45625859	46629627.9	44622090.1	33620767	35268184.6	31973349.4
C26	18.871	39971813	40851192.89	39092433.11	18134573	19023167.1	17245978.9
C29	19.805	18279051	18681190.12	17876911.88	0	0	0
C30	20.249	0	0	0	0	0	0

T3 SAP+ Flor

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	T3 inicial			T3 final		
		Área 1	Área 2	Área 3	Área 1	Área 2	Área 3
C5	1.032	14121764	14714878.09	13528649.91	16164887	16762987.8	15566786.2
C6	1.172	133469952	139075690	127864214	116624039	120939128	112308950
C10	10.531	18993710	19791445.82	18195974.18	5620828	5828798.64	5412857.36
C15	11.402	41473239	43215115.04	39731362.96	12446610	12907134.6	11986085.4
C16	12.215	81641276	85070209.59	78212342.41	18451880	19134599.6	17769160.4
C15 c/isómeros (C18)	12.576	30484490	31764838.58	29204141.42	13430675	13927610	12933740
C17	12.952	65761159	68523127.68	62999190.32	21632083	22432470.1	20831695.9
C18	13.67	56955066	59347178.77	54562953.23	22838690	23683721.5	21993658.5
C16 c/isómeros (C20)	13.732	28022811	29199769.06	26845852.94	12005052	12449238.9	11560865.1
C19	14.377	52697179	54910460.52	50483897.48	20336411	21088858.2	19583963.8
C20	15.643	43370655	45192222.51	41549087.49	19480915	20201708.9	18760121.1
C21	16.227	50608309	52733857.98	48482760.02	23723223	24600982.3	22845463.7
C22	16.432	9910998	10327259.92	9494736.084	0	0	0
C23	16.797	64067238	66758062	61376414	33437638	34674830.6	32200445.4
C24	17.352	71847648	74865249.22	68830046.78	43402305	45008190.3	41796419.7
C20 c/isómeros	17.878	61893615	64493146.83	59294083.17	35262494	36567206.3	33957781.7
C25	18.384	52711247	54925119.37	50497374.63	30204704	31322278	29087130
C26	18.871	32635686	34006384.81	31264987.19	19249783	19962025	18537541
C29	19.805	28361591	29552777.82	27170404.18	16951812	17579029	16324595
C30	20.249	10520332	10962185.94	10078478.06	6522715	6764055.46	6281374.55

T4 SAP+Complejo fúngico

COMPUESTO	Tiempo de retención (min)	T4 inicial			T4 final		
		Área 1	Área 2	Área 3	Área 1	Área 2	Área 3
C5	1.032	14121764	14616025.74	13627502.26	38834931	40582502.9	37087359.1
C6	1.172	133469952	138141400.3	128798503.7	117326062	122605735	112046389
C10	10.531	18993710	19658489.85	18328930.15	7750294	8099057.23	7401530.77
C15	11.402	41473239	42924802.37	40021675.64	17922349	18728854.7	17115843.3
C16	12.215	81641276	84498720.66	78783831.34	27281062	28508709.8	26053414.2
C15 c/isómeros (C18)	12.576	30484490	31551447.15	29417532.85	18644122	19483107.5	17805136.5
C17	12.952	65761159	68062799.57	63459518.44	31387443	32799877.9	29975008.1
C18	13.67	56955066	58948493.31	54961638.69	32305391	33759133.6	30851648.4
C16 c/isómeros (C20)	13.732	28022811	29003609.39	27042012.62	18785863	19631226.8	17940499.2
C19	14.377	52697179	54541580.27	50852777.74	28593520	29880228.4	27306811.6
C20	15.643	43370655	44888627.93	41852682.08	26414970	27603643.7	25226296.4
C21	16.227	50608309	52379599.82	48837018.19	38946459	40699049.7	37193868.3
C22	16.432	9910998	10257882.93	9564113.07	5774951	6034823.8	5515078.21
C23	16.797	64067238	66309591.33	61824884.67	44412670	46411240.2	42414099.9
C24	17.352	71847648	74362315.68	69332980.32	57745980	60344549.1	55147410.9
C20 c/isómeros	17.878	61893615	64059891.53	59727338.48	48386249	50563630.2	46208867.8
C25	18.384	52711247	54556140.65	50866353.36	42596681	44513531.6	40679830.4
C26	18.871	32635686	33777935.01	31493436.99	26097751	27272149.8	24923352.2
C29	19.805	28361591	29354246.69	27368935.32	19615101	20497780.5	18732421.5
C30	20.249	10520332	10888543.62	10152120.38	8072093	8435337.19	7708848.82

RESUMEN HTPs (cm²)

Tratamiento	HTPs Inicial	HTPs Final	Inicia-Final (HTPs)	% REMOCIÓN
T0	766298470	385686489	380611981	49.6688948
T0	785455931.8	398414143.1	387041788.6	49.2760667
T0	747141008.3	372958834.9	374182173.4	50.081868
T1	766298470	465569010	300729460	50.4200948
T1	785455931.8	478139373.3	307316558.5	51.0868755
T1	747141008.3	452998646.7	294142361.5	49.6963006
T2	766298470	617558280	148740190	19.4102162
T2	785455931.8	647818635.7	137637296	17.5232359
T2	747141008.3	587297924.3	159843084	21.3939648
T3	766298470	481264029	285034441	48.748683
T3	785455931.8	499070798.1	286385133.7	48.9456141
T3	747141008.3	463457259.9	283683748.3	48.5349132
T4	766298470	648821849	117476621	30.9049248
T4	785455931.8	678018832.2	107437099.5	30.6394298
T4	747141008.3	619624865.8	127516142.5	31.1931212

Anexo 9

T-Student Pareada para HTPs (cm²) iniciales y finales

T0

IC y Prueba T pareada: HTPs (cm2) Inicial, HTPs (cm2) Final

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
HTPs (cm2) Inicial	3	766298470	19157462	11060566
HTPs (cm2) Final	3	385686489	12727654	7348315

Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
380611981	6429808	3712251	(364639453, 396584509)

diferencia_μ: media de (HTPs (cm2) Inicial - HTPs (cm2) Final)

Prueba

Hipótesis nula	H_0 : diferencia_μ = 0
Hipótesis alterna	H_1 : diferencia_μ ≠ 0
Valor T	102.53
Valor p	0.000

T1

IC y Prueba T pareada: HTPs (cm2) Inicial, HTPs (cm2) Final

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
HTPs (cm2) Inicial	3	766298470	19157462	11060566
HTPs (cm2) Final	3	617558280	30260356	17470825

Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
148740190	11102894	6410259	(121159072, 176321308)

diferencia_μ: media de (HTPs (cm2) Inicial - HTPs (cm2) Final)

Prueba

Hipótesis nula	H_0 : diferencia_μ = 0
Hipótesis alterna	H_1 : diferencia_μ ≠ 0
Valor T	23.20
Valor p	0.002

T2

IC y Prueba T pareada: HTPs (cm2) Inicial, HTPs (cm2) Final

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
HTPs (cm2) Inicial	3	766298470	19157462	11060566
HTPs (cm2) Final	3	465569010	12570363	7257503

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
Media	Desv.Est.		
300729460	6587098	3803063	(284366200, 317092720)

diferencia_μ: media de (HTPs (cm2) Inicial - HTPs (cm2) Final)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia_μ = 0
Hipótesis alterna H_1 : diferencia_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
79.08	0.000

T3

IC y Prueba T pareada: HTPs (cm2) Inicial, HTPs (cm2) Final

Estadísticas descriptivas

			Error estándar de la media
Muestra	N	Media	Desv.Est.
HTPs (cm2) Inicial	3	766298470	19157462
HTPs (cm2) Final	3	648821849	29196983

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
Media	Desv.Est.		
117476621	10039521	5796320	(92537067, 142416175)

diferencia_μ: media de (HTPs (cm2) Inicial - HTPs (cm2) Final)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia_μ = 0
Hipótesis alterna H_1 : diferencia_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
20.27	0.002

T4

IC y Prueba T pareada: HTPs (cm2) Inicial, HTPs (cm2) Final

Estadísticas descriptivas

			Error estándar de la media
Muestra	N	Media	Desv.Est.
HTPs (cm2) Inicial	3	766298470	19157462
HTPs (cm2) Final	3	481264029	17806769

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
Media	Desv.Est.		
285034441	1350693	779823	(281679134, 288389748)

diferencia_μ: media de (HTPs (cm2) Inicial - HTPs (cm2) Final)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia_μ = 0
Hipótesis alterna H_1 : diferencia_μ ≠ 0

Valor T	Valor p
365.51	0.000

Anexo 10

ANOVA y Tukey HTPs (cm²)

ANOVA de un solo factor: HTPs (cm2) vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	5	T0, T1, T2, T3, T4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	1.45847E+17	3.64618E+16	75.80	0.000
Error	10	4.81048E+15	4.81048E+14		
Total	14	1.50658E+17			

Resumen del modelo

	S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
21932812	96.81%	95.53%	92.82%	

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T0	3	380611981	12727654	(352397248, 408826714)
T1	3	148740190	30260356	(120525457, 176954923)
T2	3	300729460	12570363	(272514727, 328944193)
T3	3	117476621	29196983	(89261888, 145691354)
T4	3	285034441	17806769	(256819708, 313249174)

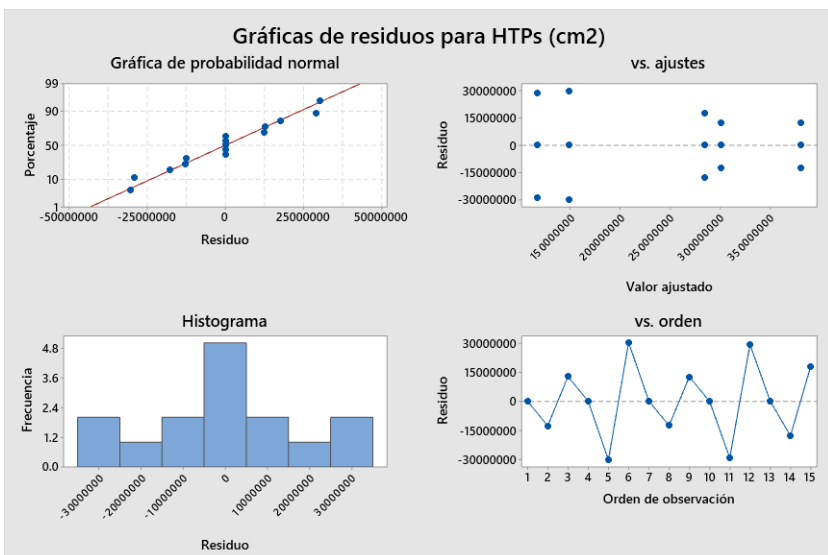
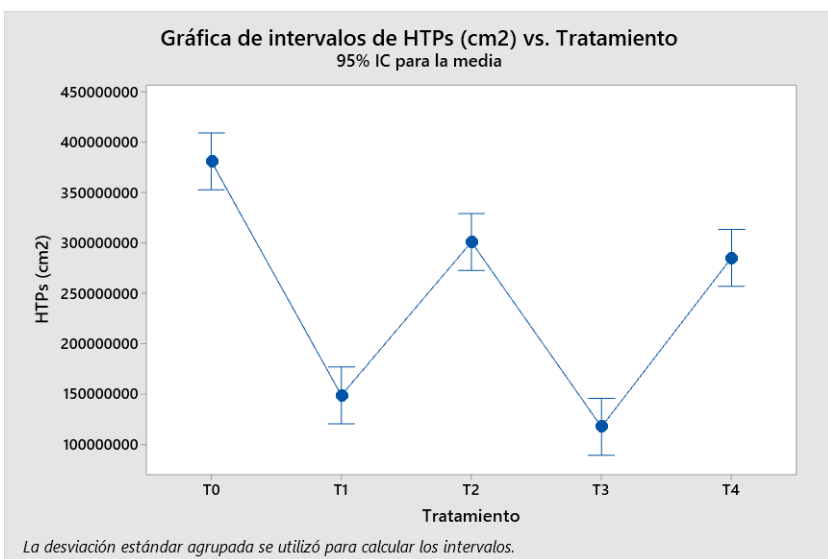
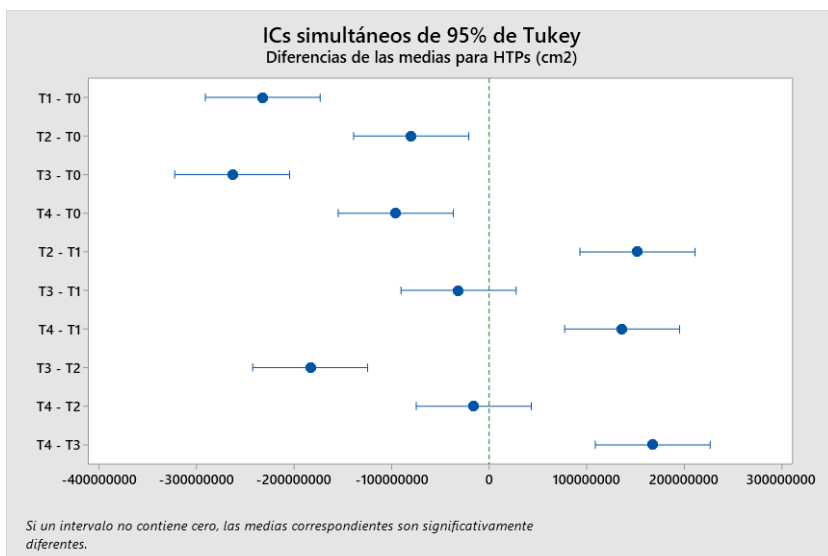
Desv.Est. agrupada = 21932812

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
T0	3	380611981	A
T2	3	300729460	B
T4	3	285034441	B
T1	3	148740190	C
T3	3	117476621	C

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 11
mg kg⁻¹ de Diésel Residual

Tratamiento	Tubo (g)	Tubo + diésel seco (g)	Tubo-Tubo diésel (g)	Suelo (g)	Diésel residual (g)	mg kg-1 Diésel Residual	mg kg-1 Diésel Residual Ajustado
T0 INICIAL 1	12.6913	12.7198	0.0285	2.9207	0.009757935	4461.251889	4461.251889
T0 INICIAL 2	12.6871	12.7071	0.02	2.9311	0.006823377	4289.665278	4289.665278
T0 INICIAL 3	12.7129	12.7499	0.037	2.9369	0.012598318	4118.078667	4118.078667
T0 FINAL 1	12.6461	12.6595	0.0134	3.1823	0.004210791	949.3782686	949.3782686
T0 FINAL 2	12.5123	12.5271	0.0148	3.0877	0.004793212	904.1702686	904.1702686
T0 FINAL 3	12.6522	12.6611	0.0089	3.1374	0.002836744	858.9622686	858.9622686
T1 INICIAL 1	12.6534	12.6655	0.0121	3.1214	0.003876466	2103.590798	4461.251889
T1 INICIAL 2	12.5897	12.6097	0.02	3.0648	0.006525711	2209.654198	4289.665278
T1 INICIAL 3	12.7146	12.7354	0.0208	3.0681	0.00677944	2315.717598	4118.078667
T1 FINAL 1	12.6415	12.6531	0.0116	3.1056	0.003735188	1249.626703	1249.626703
T1 FINAL 2	10.9133	10.9266	0.0133	3.0641	0.004340589	1202.726703	1202.726703
T1 FINAL 3	12.688	12.7033	0.0153	3.0598	0.005000327	1155.826103	1155.826103
T2 INICIAL 1	12.6913	12.7198	0.0285	2.9207	0.009757935	4461.251889	4461.251889
T2 INICIAL 2	12.6871	12.7071	0.02	2.9311	0.006823377	4289.665278	4289.665278
T2 INICIAL 3	12.7129	12.7499	0.037	2.9369	0.012598318	4118.078667	4118.078667
T2 FINAL 1	13.2424	13.2584	0.016	2.9855	0.005359236	1780.727557	1780.727557
T2 FINAL 2	13.4913	13.5051	0.0138	2.9607	0.00466106	1695.931007	1695.931007
T2 FINAL 3	12.7973	12.8136	0.0163	3.1002	0.005257725	1611.931007	1611.931007
T3 INICIAL 1	12.6534	12.6655	0.0121	3.1214	0.003876466	2103.590798	4461.251889
T3 INICIAL 2	12.5897	12.6097	0.02	3.0648	0.006525711	2209.654198	4289.665278
T3 INICIAL 3	12.7146	12.7354	0.0208	3.0681	0.00677944	2315.717598	4118.078667
T3 FINAL 1	12.6912	12.7024	0.0112	2.9673	0.003774475	1329.263426	1329.263426
T3 FINAL 2	12.7282	12.7388	0.0106	3.0978	0.003421783	1272.023426	1272.023426
T3 FINAL 3	12.4314	12.4426	0.0112	2.9376	0.003812636	1214.783426	1214.783426
T4 INICIAL 1	12.6534	12.6655	0.0121	3.1214	0.003876466	2103.590798	4461.251889
T4 INICIAL 2	12.5897	12.6097	0.02	3.0648	0.006525711	2209.654198	4289.665278
T4 INICIAL 3	12.7146	12.7354	0.0208	3.0681	0.00677944	2315.717598	4118.078667
T4 FINAL 1	12.4444	12.4555	0.0111	3.1149	0.003563517	1235.315796	1235.315796
T4 FINAL 2	13.2986	13.3137	0.0151	3.1409	0.004807539	1188.935796	1188.935796
T4 FINAL 3	12.4195	12.4306	0.0111	3.0555	0.003632793	1142.565796	1142.565796

Resumen mg kg⁻¹ Diésel residual

Tratamiento	mg kg⁻¹ Inicial	mg kg⁻¹ Final	Inicial-Final mg kg⁻¹	% Remoción
T0	4461.251889	949.3782686	3511.87362	78.719465
T0	4289.665278	904.1702686	3385.495009	78.9221254
T0	4118.078667	858.9622686	3259.116398	79.1416741
T1	4461.251889	1249.626703	3211.625186	40.5955424
T1	4289.665278	1202.726703	3086.938575	45.5694604
T1	4118.078667	1155.826103	2962.252564	50.0877782
T2	4461.251889	1780.727557	2680.524332	60.0845771
T2	4289.665278	1695.931007	2593.734271	60.464724
T2	4118.078667	1611.931007	2506.14766	60.857207
T3	4461.251889	1329.263426	3131.988463	36.8097908
T3	4289.665278	1272.023426	3017.641852	42.4333714
T3	4118.078667	1214.783426	2903.295241	47.5418148
T4	4461.251889	1235.315796	3225.936093	41.2758509
T4	4289.665278	1188.935796	3100.729482	46.193581
T4	4118.078667	1142.565796	2975.512871	50.6604002

Anexo 12

T-Student Pareada mg kg⁻¹ de Diésel residual iniciales y finales

T0

IC y Prueba T pareada: mg kg⁻¹ Diésel, mg kg⁻¹ Diésel Residual

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
mg kg ⁻¹ Diésel	3	4289.7	171.6	99.1
mg kg ⁻¹ Diésel Residual	3	3385.5	126.4	73.0

Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
904.2	45.2	26.1	(791.9, 1016.5)

diferencia μ : media de (mg kg⁻¹ Diésel - mg kg⁻¹ Diésel Residual)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia $\mu = 0$
 Hipótesis alterna H_1 : diferencia $\mu \neq 0$

Valor T	Valor p
34.64	0.001

T1

IC y Prueba T pareada: mg kg⁻¹ Diésel, mg kg⁻¹ Diésel Residual

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
mg kg ⁻¹ Diésel	3	4289.7	171.6	99.1
mg kg ⁻¹ Diésel Residual	3	3086.9	124.7	72.0

Estimación de la diferencia pareada

Media	Desv.Est.	Error estándar de la media	IC de 95% para la diferencia μ
1202.7	46.9	27.1	(1086.2, 1319.2)

diferencia μ : media de (mg kg⁻¹ Diésel - mg kg⁻¹ Diésel Residual)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia $\mu = 0$
 Hipótesis alterna H_1 : diferencia $\mu \neq 0$

Valor T	Valor p
44.42	0.001

T2

IC y Prueba T pareada: mg kg⁻¹ Diésel, mg kg⁻¹ Diésel Residual

Estadísticas descriptivas

Muestra	N	Media	Desv.Est.	Error estándar de la media
mg kg ⁻¹ Diésel	3	4289.7	171.6	99.1
mg kg ⁻¹ Diésel Residual	3	2593.5	87.2	50.3

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar	IC de 95% para de la la
Media	Desv.Est.	media	diferencia μ
1696.2	84.4	48.7	(1486.5, 1905.9)

diferencia μ : media de (mg kg⁻¹ Diésel - mg kg⁻¹ Diésel Residual)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia $\mu = 0$
Hipótesis alterna H_1 : diferencia $\mu \neq 0$

Valor T	Valor p
34.81	0.001

T3

IC y Prueba T pareada: mg kg⁻¹ Diésel, mg kg⁻¹ Diésel Residual

Estadísticas descriptivas

				Error estándar de la media
Muestra	N	Media	Desv.Est.	
mg kg ⁻¹ Diésel	3	4289.7	171.6	99.1
mg kg ⁻¹ Diésel Residual	3	3017.6	114.3	66.0

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar	IC de 95% para de la la
Media	Desv.Est.	media	diferencia μ
1272.0	57.2	33.0	(1129.8, 1414.2)

diferencia μ : media de (mg kg⁻¹ Diésel - mg kg⁻¹ Diésel Residual)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia $\mu = 0$
Hipótesis alterna H_1 : diferencia $\mu \neq 0$

Valor T	Valor p
38.49	0.001

T4

IC y Prueba T pareada: mg kg⁻¹ Diésel, mg kg⁻¹ Diésel Residual

Estadísticas descriptivas

				Error estándar de la media
Muestra	N	Media	Desv.Est.	
mg kg ⁻¹ Diésel	3	4289.7	171.6	99.1
mg kg ⁻¹ Diésel Residual	3	3100.7	125.2	72.3

Estimación de la diferencia pareada

		Error estándar	IC de 95% para de la la
Media	Desv.Est.	media	diferencia μ
1188.9	46.4	26.8	(1073.7, 1304.1)

diferencia μ : media de (mg kg⁻¹ Diésel - mg kg⁻¹ Diésel Residual)

Prueba

Hipótesis nula H_0 : diferencia $\mu = 0$
Hipótesis alterna H_1 : diferencia $\mu \neq 0$

Valor T	Valor p
44.41	0.001

Anexo 13

ANOVA y Tukey mg kg^{-1} de Diésel residual

ANOVA de un solo factor: mg kg^{-1} vs. Tratamiento

Método

Hipótesis nula	Todas las medias son iguales
Hipótesis alterna	No todas las medias son iguales
Nivel de significancia	$\alpha = 0.05$

Se presupuso igualdad de varianzas para el análisis.

Información del factor

Factor	Niveles	Valores
Tratamiento	5	T0, T1, T2, T3, T4

Análisis de Varianza

Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
Tratamiento	4	1393886	348471	30.97	0.000
Error	10	112513	11251		
Total	14	1506399			

Resumen del modelo

S	R-cuad.	R-cuad. (ajustado)	R-cuad. (pred)
106.072	92.53%	89.54%	83.19%

Medias

Tratamiento	N	Media	Desv.Est.	IC de 95%
T0	3	3385.5	126.4	(3249.0, 3521.9)
T1	3	2658.0	107.5	(2521.5, 2794.4)
T2	3	2593.5	87.2	(2457.0, 2729.9)
T3	3	2588.7	97.2	(2452.2, 2725.1)
T4	3	2671.8	108.1	(2535.3, 2808.2)

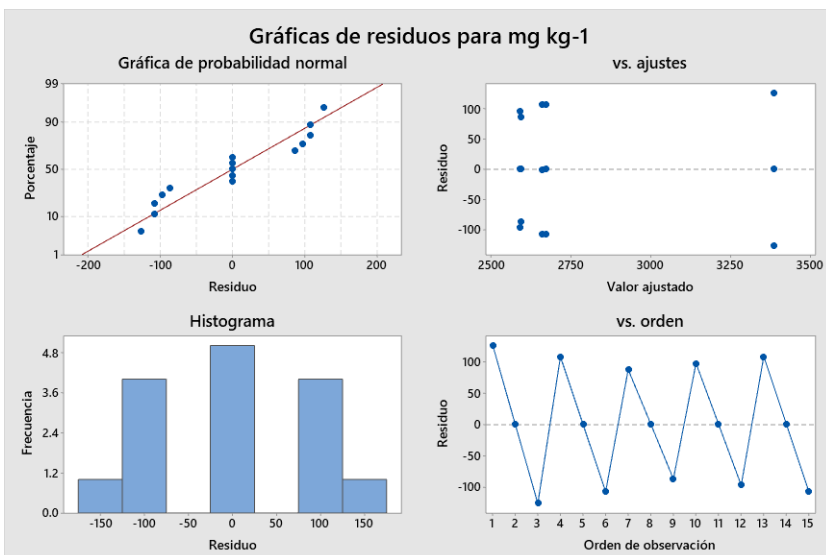
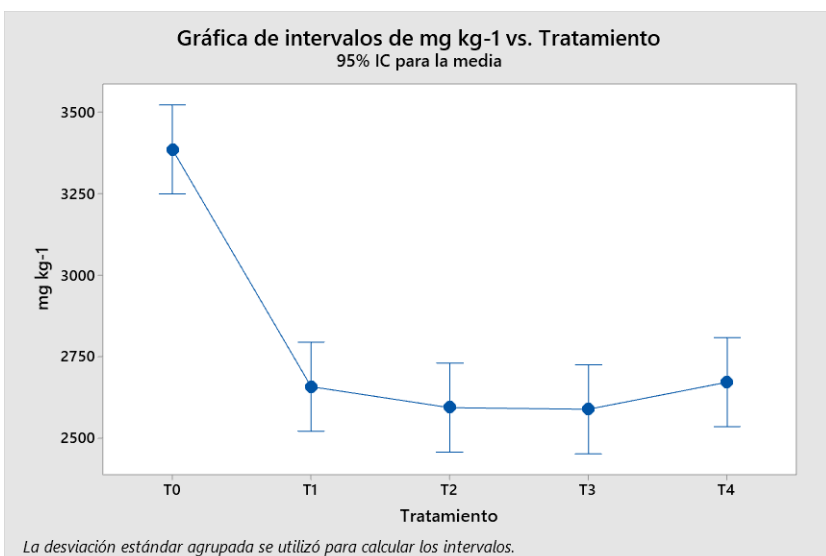
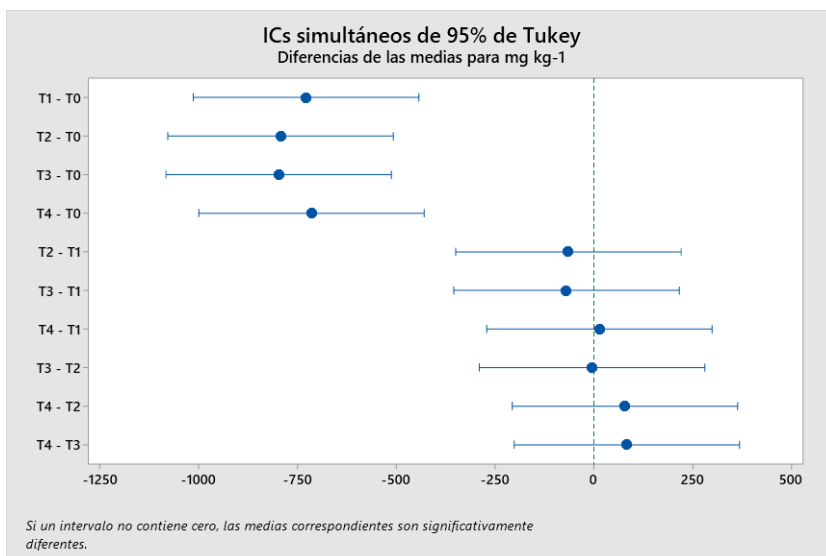
Desv.Est. agrupada = 106.072

Comparaciones en parejas de Tukey

Agrupar información utilizando el método de Tukey y una confianza de 95%

Tratamiento	N	Media	Agrupación
T0	3	3385.5	A
T4	3	2671.8	B
T1	3	2658.0	B
T2	3	2593.5	B
T3	3	2588.7	B

Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes.



Anexo 14
Análisis fisicoquímicos del suelo antes y después del ensayo de biorremediación

Tratamiento	pH		Materia orgánica (%)		Nitrógeno total (%)		Relación C/N	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	7.76	8.2	2.9	2.23	0.084	0.102	0.02897	0.04574
T1	7.67	8.1	9.1	3.96	0.189	0.177	0.02077	0.0447
T2	7.76	7.9	2.9	2.39	0.084	0.122	0.02897	0.05105
T3	7.67	8.1	9.5	3	0.189	0.129	0.01989	0.043
T4	7.67	8.2	9.5	4.57	0.189	0.232	0.01989	0.05077
TB1	7.2	8.1	7.21	1.93	0.223	0.085	0.03093	0.04404
TB2	7.51	8	2.37	1.37	0.14	0.085	0.05907	0.06204
TB3	7.2	8.1	7.21	2.67	0.223	0.124	0.03093	0.04644
TB4	7.2	8.2	7.21	2.18	0.223	0.11	0.03093	0.05046
SAP	5.06	NA	98.5	NA	0.021	NA	0.00021	NA

Tratamiento	Calcio (cmolc/Kg)		Magnesio (cmolc/Kg)		Sodio (cmolc/Kg)		Potasio (cmolc/Kg)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	6.62	8.2	1.233	0.3	0.582	0.7	0.8	1
T1	21.94	37.1	1.966	3	0.379	0.7	0.9	1.2
T2	6.62	8.6	1.233	4.8	0.582	0.7	0.8	1
T3	21.94	36.6	1.966	4.7	0.379	0.9	0.9	1.3
T4	21.94	33.2	1.966	0.9	0.379	0.7	0.9	1
TB1	6.2	37.5	4.9	2.8	0.6	0.8	0.9	0.7
TB2	3.55	6.9	0.5	4.3	0.313	0.8	0.6	0.4
TB3	6.2	28.7	4.9	4.3	0.6	0.8	0.9	0.9
TB4	6.2	28.2	4.9	0.6	0.6	0.8	0.9	0.9
SAP	0.016	NA	0.03	NA	0.01	NA	0.03	NA

Tratamiento	Capacidad de Intercambio Catiónico (cmolc/Kg)		Fósforo (mg/mk)		Densidad aparente (g/ml)		Conductividad Eléctrica (dS/m)	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
T0	11.5	10.2	11.41	0	1.325	1.26	0.05	0.35
T1	19.2	16.3	23.25	0	1.183	1.22	0.95	0.47
T2	11.5	11.6	11.41	14.6	1.325	1.28	0.08	0.36
T3	19.2	13.9	23.45	6	1.183	1.29	0.95	5.56
T4	19.2	14.7	23.45	16	1.183	1.26	0.95	4.41
TB1	16.3	10.9	0	0	1.22	1.26	0.47	5.31
TB2	12.7	8.9	10.36	10.3	1.337	1.26	0.69	0.33
TB3	16.3	14.7	0	16	1.22	1.26	0.47	4.41
TB4	16.3	12.1	0	0.9	1.22	1.25	0.47	5.55
SAP		NA	23.6	NA		NA	0.32	NA