



**Benemérita
Universidad Autónoma de Puebla**

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA

**“Rizorremediación de suelos agrícolas
contaminados con diésel de la zona de
Acatzingo, Puebla”**

Septiembre 2020

TESIS PROFESIONAL

**Que para obtener el Título de:
Licenciatura en Ingeniería Ambiental**

Presenta:

CARMINA LINETTE MARIN VÁZQUEZ

Directora de Tesis:

Dra. AMPARO MAURICIO GUTIERREZ

Codirectora de Tesis

Dra. JANETTE ARRIOLA MORALES

Puebla, Pue.

AGRADECIMIENTOS

A la Pachamama

Por ser fuente de vida y sabiduría, misma que ha guiado mi existir.

A mis padres

Alicia y Fabián, por su cariño, comprensión y apoyo durante toda mi educación, por darme la oportunidad de ser y llegar hasta donde he querido.

A mis abuelos

Alicia y Fabián, por su cariño, preocupación y apoyo incondicional a pesar de no entender bien de que se trata mi carrera.

A mi directora de Tesis

Doctora Amparo Mauricio Gutiérrez, por su apoyo, cariño, sabiduría y platicas con café en todo el tiempo de trabajar juntas.

A mis amigas, mano derecha en la realización de éste trabajo

Rosalba y Erika, por su compañía, risas, amistad y días enteros de trabajo dentro y fuera del laboratorio.

A mis amigos del laboratorio

Héctor, Rodrigo, Luis Enrique, Raúl y demás compañeros, por su apoyo, enseñanzas y conocimientos adquiridos.

A todas mis amistades de la FIQ

Karen, Vanessa, Jaqueline, Martha, Claudia, Alfredo, Elmer, Andrés, Joaquín, por su amistad, confianza y apoyo en todo momento.

A mi mejor amiga

María José, por ser mi apoyo incondicional, fuente de amor y consejos desde el 2008.

A mi perrito Spot

Mi compañero más fiel de trabajo, que ha pasado a mi lado todos los desvelos.

Índice

ABREVIATURAS.....	7
RESUMEN.....	8
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
2. JUSTIFICACIÓN	10
3. OBJETIVOS	11
3.1 Objetivo general.....	11
3.2 Objetivos específicos	11
4. HIPÓTESIS	12
5. MARCO TEÓRICO.....	13
5.1 Biorremediación	13
5.2 Fitorremediación	13
5.3 Tipos de fitorremediación.....	14
5.4 Rizósfera.....	16
5.5 Interacción planta-microorganismo	17
5.6 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal	18
5.6.1 Bacterias del género <i>Pseudomonas</i>	18
5.6.2 Bacterias del género <i>Bacillus</i>	19
5.6.3 Bacterias del género <i>Azospirillum</i>	20
5.7 Fijación de N_2	20
5.8 Hidrocarburos	21
5.9 Aromáticos volátiles bencénicos	21
5.10 PHA's	22
5.11 Diésel	22
5.12 Normatividad aplicable a suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos y sus procesos de biorremediación.....	23
5.12.1 Nacionales.....	23
5.12.2 Internacionales	24
6. METODOLOGÍA.....	27
6.1 Material biológico utilizado	28
6.1.1 Preparación del inoculante	29
6.1.1.1 Inoculante para ensayos de cinética de germinación en plantas	29

6.1.1.2 Inoculante para rizorremediación	30
6.2 Ensayos de cinética de germinación	30
6.3 Rizorremediación	32
6.3.1 Actividades preliminares de acondicionamiento del suelo.....	32
6.3.1.1 Tindalización	32
6.3.1.2 Contaminación de suelo con diésel.....	32
6.3.1.3 Adición de sustrato	32
6.3.2 Diseño experimental.....	33
6.3.3 Análisis de parámetros	34
6.3.3.1 Índice de calidad de Dickson.....	34
6.3.3.2 Capacidad de germinación.....	35
6.3.3.3 Porcentaje de germinación.....	35
6.3.3.4 Tiempo modal.....	35
6.3.3.5 Tiempo medio de germinación	36
6.3.3.6 Cuantificación de degradación de diésel.....	36
6.3.3.6.1 Extracción de fracción media	36
6.3.3.6.2 Cuantificación por cromatografía de gases.....	37
6.4 Análisis estadístico	38
7. RESULTADOS	38
7.1 Resultados de cinética de germinación.....	38
7.1.1 Efecto de diésel en <i>Zea Mays</i> (Maíz)	38
7.1.2 Efecto de diésel en <i>Helianthus annuus</i> (Girasol).....	40
7.1.3 Efecto de diésel en <i>Arabidopsis thaliana</i> (Oruga).....	42
7.1.4 Efecto de diésel en <i>Tithonia tubuformis</i> (Jacq.) Cass (Palocote)	44
7.2 Resultados de rizorremediación.....	47
7.2.1 Comparación de la calidad de la planta a 45 y 90 días	53
7.3 Degradación de diésel.....	54
8. DISCUSIÓN	56
9. CONCLUSIONES	60
BIBLIOGRAFÍA	61
ANEXOS	68

Índice de Tablas

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo agrícola	23
Tabla 2. Límites máximos permisibles de hidrocarburos específicos en suelo agrícola	23
Tabla 3. Valores máximos permisibles para criterios de calidad de suelo en uso agrícola Ecuador	24
Tabla 4. Valores máximos permisibles para criterios de remediación o restauración de suelo en uso agrícola Ecuador	25
Tabla 5. Límites de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) UE	25
Tabla 6. Listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para protección de los ecosistemas España	26
Tabla 7. Estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo Perú	26
Tabla 8. Diseño experimental para rizorremediación	33
Tabla 9. Análisis de germinación de <i>Zea Mays</i>	39
Tabla 10. Análisis de germinación de <i>Helianthus annuus</i>	41
Tabla 11. Análisis de germinación de <i>Arabidospsis thaliana</i>	43
Tabla 12. Análisis de germinación de <i>Tithonia tubuformis</i>	45
Tabla 13. Parámetros de crecimiento de <i>Zea Mays</i> a 45 días	47
Tabla 14. Parámetros de crecimiento de <i>Zea Mays</i> a 90 días	50
Tabla 15. Degradación y concentración de diésel residual a 45 y 90 días	55

Índice de Gráficas

Gráfica 1. Cinética de germinación de <i>Zea Mays</i>	39
Gráfica 2. Cinética de germinación de <i>Helianthus annuus</i>	41
Gráfica 3. Cinética de germinación de <i>Arabidospsis thaliana</i>	43
Gráfica 4. Cinética de germinación de <i>Tithonia tubuformis</i>	45
Gráfica 5. Comparación de ICD a 45 y 90 días	53

Índice de Imágenes

Imagen 1. Principales procesos implicados en la fitorremediación del suelo	16
Imagen 2. Ceba A5	28
Imagen 3. Ceba 1b	28
Imagen 4. Ceba 15a	28
Imagen 5. Ceba sb	29
Imagen 6. Germinación in vitro de <i>Zea Mays</i>	31
Imagen 7. Diseño experimental para rizorremediación	34
Imagen 8. Filtración del extracto	37

Imagen 9. Aforo del extracto a 1 mL	37
Imagen 10. Cromatógrafo de gases GC System-FID, Modelo HP 6890	38
Imagen 11. a) Longitud de raíz en SB, b) Longitud de raíz en SNEA, c) Longitud de raíz en SEBIOSin	52

Índice de Anexos

Anexo 1. Comparación de parámetros de crecimiento a 45 y 90 días	68
Anexo 2. Cinética de germinación para <i>Arabidopsis Thaliana</i>	70
Anexo 3. Montaje experimento de rizorremediación	70
Anexo 4. Análisis de parámetros 45 días	71
Anexo 5. Análisis de parámetros 90 días	71

ABREVIATURAS

ppm	Partes por millón
Ufc	Unidades formadoras de colonia
mL	Mililitro
L	Litro
μ L	Microlitro
Kg	Kilogramo
g	Gramo
ss	Suelo seco
$^{\circ}$ C	Grado centígrado
m	Metro
mm	Milímetro
μ m	Micrómetro
HBm	Bushnell Hass modificado
Nfb	Medio libre de nitrógeno
N_2	Nitrógeno atmosférico
PH	Peso húmedo
PS	Peso seco
PSR	Peso seco de la raíz
PSA	Peso seco aéreo
A	Altura
D	Diámetro
DH	Diámetro de la hoja
LR	Longitud de raíz

RESUMEN

En México existe gran extracción y producción de hidrocarburos por parte de la empresa PEMEX; estos hidrocarburos y sus derivados son transportados por todo el país por medio de tuberías que atraviesan el subsuelo, es así como se presta la oportunidad de existencia para tomas clandestinas y/o fugas por mal mantenimiento o incorrecta instalación de las tuberías. Puebla es uno de los siete estados con mayor incidencia de tomas clandestinas, siendo Acatzingo uno de los municipios más afectados causando deterioro en los suelos agrícolas, provocando consecuencias negativas en el sector agrícola, económico y social. La fitorremediación es el uso de plantas para la remediación de ambientes contaminados a través de diferentes mecanismos dentro de los que se encuentra la rizorremediación, que es la actividad microbiana llevada a cabo en la raíz, gracias a la cual ocurre una mayor degradación del contaminante orgánico. El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar la capacidad de rizorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel procedentes de Acatzingo, Puebla.

Se realizaron pruebas de cinética de germinación para cuatro plantas que fueron *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Tithonia tubiformis*, y *Arabidopsis thaliana* inoculadas con un consorcio bacteriano (*Bacillus pumilus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas frederiksbergensis* y *Azospirillum brasilense*), de las cuales fue seleccionada *Zea mays* por su mejor capacidad de germinación para ser aplicada en la rizorremediación bajo condiciones de invernadero. Se desarrollaron diferentes tratamientos con suelo tindalizado, no tindalizado, enriquecidos con sustrato post-cosecha de *Pleurotus ostreatus*, bioaumentados y semillas inoculadas. Se evaluaron los parámetros fisiológicos de la planta, así como la remoción de diésel en suelo biorremediado a los 45 y 90 días.

Dentro de los parámetros analizados se pudo observar que los tratamientos con mejor crecimiento vegetal fueron aquellos a los que se les agregó inoculación en la semilla y bioaumentación al suelo. Dichos tratamientos presentaron también los mayores porcentajes de degradación de diésel (46.30%, 44.06%).

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México existe gran extracción y producción de hidrocarburos por parte de la empresa PEMEX, al menos en un periodo del 1 de Octubre al 31 de Diciembre de 2018, se produjeron 2,435 Mbpced (miles de barriles de petróleo crudo equivalentes diarios) de hidrocarburos totales, y 1,755 Mbd (miles de barriles diarios), 7.8% menos que el mismo periodo en el año 2017 (PEMEX, 2019). Todos estos hidrocarburos y sus derivados son transportados por todo el país por medio de tuberías que atraviesan el subsuelo, acto que presenta un gran inconveniente debido a que no existe un control de los fluidos transportados. Es así como se presta la oportunidad de existencia para tomas clandestinas y/o fugas por mal mantenimiento o incorrecta instalación de las tuberías. Puebla es uno de los siete estados con mayor incidencia de tomas clandestinas con un total de 1,815 durante el 2018 (PEMEX, 2018), y tan sólo 569 del 1 al 20 de Enero del 2019 (Monroy, 2019).

Los municipios de Acatzingo y San Martín Texmelucan son los más afectados por estas actividades ilícitas y derrames de hidrocarburos en el estado, debido a que afectan (o tienen graves consecuencias) en las actividades agrícolas de los municipios ya que la contaminación por hidrocarburos daña el suelo cambiando el estado de los nutrientes e interrumpe las actividades microbianas (Ezeonu y col., 2012). Se han presentado accidentes que han tenido lugar en éstos municipios, como en marzo 2017 cuando se incendió una tubería en Acatzingo, debido a una toma clandestina (Anaya, 2018), lo cual resulta ser perjudicial debido a que la presencia de hidrocarburos en suelo agrícola llega a retrasar la germinación debido a la falta de humedad y el endurecimiento de la estructura del suelo, en caso de que la concentración sea baja, de lo contrario puede incluso no presentarse germinación y dar paso a la pudrición de la semilla, que puede deberse a la interferencia creada entre aceite - aire y aceite - agua del suelo (Quiñones-Aguilar y col., 2003), lo que a su vez repercute en la producción agrícola, afectando a la población en aspectos como salud y economía, ya que las actividades agrícolas forman parte importante del desarrollo económico de ésta región.

2. JUSTIFICACIÓN

La contaminación de suelos por hidrocarburos se ha buscado mitigar por medio de diferentes técnicas físicas, químicas y biológicas. La fitorremediación es el uso de plantas para la remediación de ambientes contaminados a través de diferentes mecanismos dentro de los que se encuentra la rizorremediación, que es la actividad microbiana llevada en la raíz, gracias a la cual ocurre una mayor degradación del contaminante orgánico.

Las ventajas de la fitorremediación son que representa una práctica “agradable” a la vista de la población, además de que representa un bajo costo que va de 50 a 100 mil pesos, un 80% menos comparado con el método convencional (Delgadillo-López, y col., 2011), debido a que no requiere un trabajo demasiado complicado. Otra de las ventajas de la fitorremediación es que se realiza *in situ* (dentro del sitio), lo que disminuye costos de transporte del suelo contaminado.

La presente investigación se enfocará en la fitorremediación, específicamente rizorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel de la zona de Acatzingo, aprovechando los procesos metabólicos de algunas bacterias y su interacción con la raíz de *Zea Mays*. Se llevará a cabo a nivel invernadero bajo condiciones controladas, para que posteriormente pueda ser aplicada a mayor escala en la remediación de los campos agrícolas de la zona lo cual generará una mejora en el sector agrícola, económico y social.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo general

Evaluar el porcentaje de degradación *ex situ* de suelos agrícolas contaminados con diésel procedentes de Acatzingo, Puebla, por medio de rizorremediación.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar la cinética de germinación *in vitro* de diésel en plantas de *Zea mays*, *Helianthus annuus*, *Tithonia tubiformis*, y *Arabidopsis thaliana* inoculadas con un consorcio bacteriano.
- Calcular la degradación de diésel por medio de bioaumentación y rizorremediación en plantas de *Zea mays* a nivel invernadero.
- Determinar la calidad de la especie vegetal por parámetros de crecimiento en presencia de diésel a 45 y 90 días.

4. HIPÓTESIS

Nula: La rizorremediación con *Zea mays* no aumentará la capacidad de degradación de diésel en suelos agrícolas y afectará los parámetros de crecimiento.

Alterativa: La rizorremediación con *Zea mays* aumentará la capacidad de degradación de diésel en suelos agrícolas y mejorará los parámetros de crecimiento.

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Biorremediación

La biorremediación es el empleo de organismos, microorganismos o sus componentes para la degradación o descomposición de una sustancia peligrosa por medio de procesos de transformación o mineralización a fin de convertirla en otra de carácter menos tóxico o más inofensivo al ambiente (Calisaya-Calderón, 2017).

La biorremediación puede aplicarse de dos formas, *in situ* (dentro del sitio), o *ex situ* (fuera del sitio). Las técnicas *ex situ* requieren la extracción del suelo contaminado y trasladarlo a otro espacio para darle el tratamiento correspondiente, que puede ser por medio de biolabranza, biopilas o biorreactor. El tratamiento *in situ* acelera el proceso de degradación en el mismo ambiente, ya sea por medio de bioestimulación, bioventeo, bioaumentación o fitorremediación.

Este proceso puede realizarse de forma natural, lo que se conoce de mejor manera como atenuación natural, y es la capacidad que tienen los microorganismos autóctonos de la zona para degradar el contaminante, por lo mismo, éste proceso puede durar un periodo muy largo. Por el contrario, se encuentra la biorremediación asistida, que es el conjunto de prácticas que utilizan los procesos naturales de biodegradación de contaminantes y buscan acelerar y/o potenciar dichos procesos; dentro de la cual se incluye la bioestimulación (adición de nutrientes) y la fitorremediación (utilización de plantas).

5.2 Fitorremediación

La fitorremediación de suelos contaminados se basa en el uso de plantas, suelo y técnicas agronómicas para eliminar, retener, o disminuir la toxicidad de los contaminantes del suelo (Carpena y Bernal, 2007). La reducción de los contaminantes con ayuda de plantas se lleva a cabo por medio de sus procesos bioquímicos y los microorganismos presentes en su rizósfera.

A diferencia de cualquier otra técnica de biorremediación, la fitorremediación aplica prácticas comunes, sin requerimiento de sustancias químicas más que las utilizadas

para la fertilización, no llega a afectar la estructura del suelo y resulta ser atractiva a la vista.

El proceso a través del cual una planta actúa sobre un contaminante en particular depende del grado de contaminación, de las características fisicoquímicas del contaminante y del sitio contaminado, así como de las propiedades fenotípicas y genotípicas de cada especie vegetal, tales como su grado de tolerancia y su capacidad para captar, absorber, acumular y/o degradar los contaminantes (Meagher, 2000; Vangronsveld y col., 2009).

5.3 Tipos de fitorremediación

Es importante recalcar la diferencia entre la fitorremediación de contaminantes elementales y orgánicos. Los contaminantes elementales presentan problemas al buscar su remediación, ya que son inmutables por procesos físicos o biológicos. Dentro de este grupo de contaminantes encontramos a metales pesados tóxicos y radionucleidos como Argón (Ar), Cadmio (Cd), Cesio (Cs), Cromo (Cr), Plomo (Pb), Mercurio (Hg), Estroncio (Sr), Tecnecio (Tc) y Uranio (U). Los mejores escenarios para la fitorremediación de los contaminantes elementales implican que las plantas extraigan y transloquen un catión u oxianión tóxico a los tejidos por encima del suelo para su posterior cosecha; convertir el elemento en una especie química menos tóxica (es decir, transformación); o al menos secuestrar el elemento en las raíces para evitar la lixiviación del sitio (Meagher, 2000).

En el caso de los contaminantes orgánicos, la fitorremediación busca mineralizarlos por completo en componentes no tóxicos, como dióxido de carbono, nitrato, cloro y amoníaco (Germida, y col., 2002). Dentro del grupo de los contaminantes orgánicos encontramos los bifenilos policlorados (PCB, por sus siglas en inglés) como la dioxina; hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHA, por sus siglas en inglés) tales como benzoapireno; nitroaromáticos como el trinitrotolueno (TNT); e hidrocarburos lineales halogenados tales como tricloroetileno (TCE). Muchos de estos compuestos no solo son tóxicos y teratogénicos, sino también cancerígenos. Los contaminantes pueden remediarse en las plantas a través de varios procesos

biofísicos y bioquímicos naturales: adsorción, transporte y translocación; hiperacumulación; o transformación y mineralización (Meagher, 2000).

La fitorremediación se presenta en diferentes categorías en las que la planta trata el contaminante, puede lograrse a través de la acción de uno o varios de los siguientes procesos:

❖ Fitoextracción

- Uso de plantas con la capacidad de acumular contaminantes en sus partes aéreas para posteriormente ser removidas (cosechadas) por medio de técnicas agrícolas.

❖ Fitovolatilización

- Uso de plantas para la absorción del contaminante que posteriormente será liberado a la atmósfera por medio de evapotranspiración de los estomas de la planta.

❖ Fitoinmovilización (Fitoestabilización)

- Uso de plantas de preferencia con un área radicular extensa, para disminuir la movilidad del contaminante acumulándolo dentro de las raíces y evitando su movilización a áreas más profundas del suelo.

❖ Fitodegradación

- Uso de plantas para la degradación de contaminantes por medio de absorción y metabolización gracias a las diferentes reacciones dentro de la planta como oxidación, reducción e hidrólisis, o a la interacción con sus enzimas.

❖ Rizorremediación

- Degradación de contaminantes recalcitrantes debido a la presencia de bacterias en la zona rizosférica y la interacción entre enzimas excretadas, los exudados radiculares y el compuesto orgánico (Hernández-A y Rubiños-P, 2004).

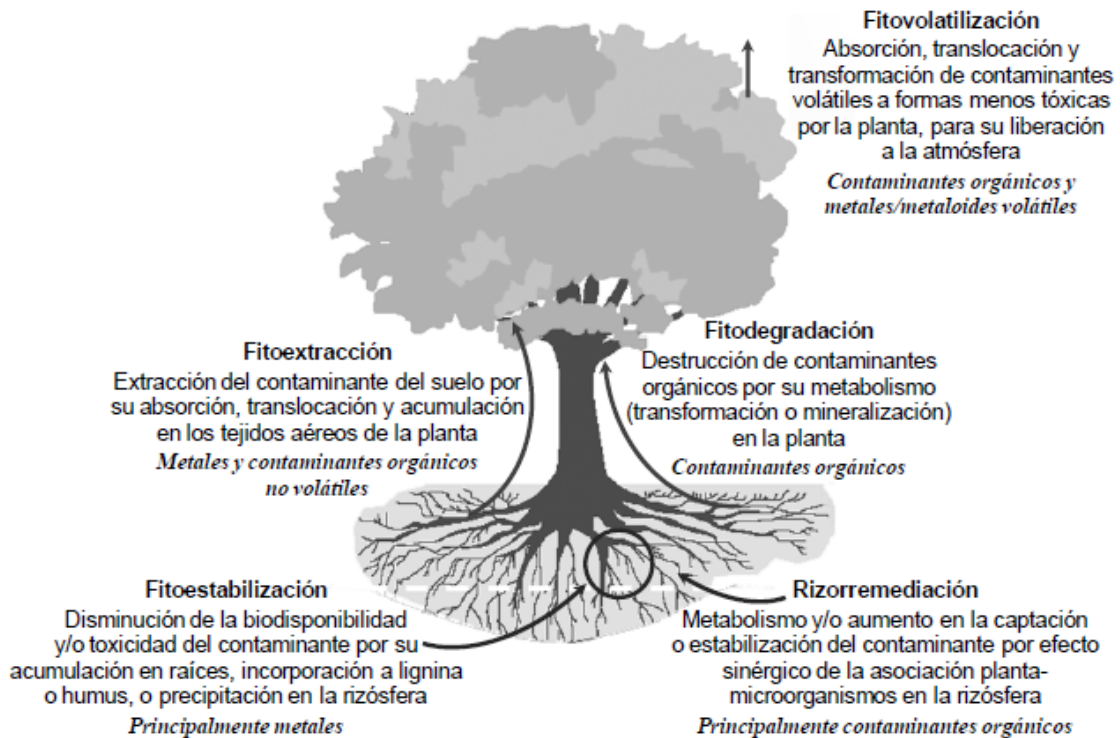


Imagen 1. Principales procesos implicados en la fitorremediación del suelo

Fuente: (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012)

La fitorremediación no se basa solamente en el aprovechamiento de los mecanismos de las plantas para la eliminación de contaminantes, sino también de los microorganismos situados en sus raíces, que ayudan a la acumulación y/o inmovilización de los mismos.

5.4 Rizósfera

La rizósfera es la zona del suelo situada en los primeros milímetros del suelo (1 a 3 mm) que rodean a la raíz, por lo cual se encuentra bajo la influencia física y fisiológica de la misma.

La actividad microbiana de la rizósfera es de gran importancia para el suelo y la planta, debido a que se incrementa el conteo microbiano gracias a los exudados que las plantas liberan en dicha zona (se ha determinado que las plantas llegan a exudar hasta un 35% de los compuestos de carbono fotosintetizados), diversos

estudios notifican que en tan sólo un gramo en peso seco del suelo se presentan de 10^8 bacterias, 10^6 actinomicetos y 10^5 hongos (Muñoz, y col., 2010). Es por esto que la presencia de microorganismos en esta zona es de gran importancia para las reacciones primordiales de la planta, como la fijación de nitrógeno, el incremento en la tolerancia al estrés (biótico y abiótico), la promoción del crecimiento de las plantas, la producción de biopelículas o antibióticos para la degradación de compuestos alelopáticos o autotóxicos; aunado a que aumenta la capacidad de remoción de los contaminantes como son los hidrocarburos.

Los exudados de las raíces de la planta se pueden clasificar en dos tipos:

1. Compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, compuestos fenólicos, etc.)
2. Compuestos de elevado peso molecular (proteínas y mucílago), gran proporción de los exudados.

Uno de los elementos más importantes para las reacciones en la rizósfera es el oxígeno, ya que es la base para la oxido-reducción y la sobrevivencia de diversos microorganismos, es por eso que éste también es liberado por las raíces de la planta.

5.5 Interacción planta-microorganismo

Las plantas participan en la degradación de hidrocarburos de petróleo gracias a la habilidad que tienen para asimilar n-alcanos y liberar CO_2 . Los procesos implicados en la degradación de hidrocarburos por las plantas son: a) presencia de exudados radicales, los cuales generan el efecto rizosférico y aumentan la degradación cometabólica; b) liberación de enzimas asociadas con las raíces capaces de transformar compuestos orgánicos y c) sistema radical sobre las condiciones del suelo (Günter, y col., 1996).

Los exudados son el enlace entre las plantas y los microorganismos que conducen al efecto rizosférico. Factores como la especie de la planta, estado de desarrollo de la misma, el lugar, tipo de suelo, cantidad de nutrimentos, pH, disponibilidad de agua, temperatura, cantidad de oxígeno, luz y la presencia de un contaminante

determinan el tipo y cantidad de exudados radicales, lo que a su vez influye en el tipo de interacción entre plantas, microorganismos y suelo (Hernández-A y Rubiños-P, 2004).

5.6 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal

En las últimas décadas, se ha investigado el papel de las bacterias de la rizósfera o rizobacterias de diversas gramíneas como caña de azúcar, maíz, trigo, sorgo, cebada y pastos tropicales. Cuando las bacterias se localizan en estructuras especializadas, como los nódulos en las leguminosas, se establece una simbiosis mutualista estricta. Por el contrario, cuando las rizobacterias aprovechan el microambiente favorable de la planta, sin formar estructuras de novo sobre la raíz, se habla entonces de una simbiosis asociativa (Loredo-Osti y col., 2004).

Estos microorganismos rizosféricos tienen la capacidad de solubilizar minerales, fijar nitrógeno atmosférico, promover el crecimiento vegetal y/o estimular respuestas de defensa para proteger a las plantas de ataques patógenos; además de que producen fitotoxinas y aleloquímicos que inhiben el crecimiento de plantas hospedantes (De la Fe-Pérez y col., 2015).

5.6.1 Bacterias del género *Pseudomonas*

La especie *Pseudomonas aeruginosa* pertenece al grupo de las bacterias Gram-negativas aerobias; se diferencian de las Gram-positivas por la estructura de la pared celular ya que contienen una membrana externa compleja, compuesta por diferentes macromoléculas (Martín, 2004).

Algunas de sus propiedades principales son: el bajo requerimiento nutritivo, la posibilidad de utilizar una amplia variedad de compuestos orgánicos como de energía y la capacidad de soportar diversas condiciones físicas.

Como resultado de estas características particulares, *P. aeruginosa* es capaz de adaptarse a diferentes nichos ecológicos, incluso donde los nutrientes son escasos. Otras de las características importantes son: la capacidad de formar biopelículas

que le permite adherirse de manera muy eficaz a las superficies, y la resistencia a los agentes antimicrobianos (Martín, 2004).

Las *Pseudomonas* son consideradas como el grupo más eficiente involucrado en la degradación de xenobióticos, debido a que pueden provocar la hidrólisis con tanto éxito como la deshalogenación, la hidroxilación, la división de anillos aromáticos y la reducción de grupos nitro (Golovleva y col., 1990). La capacidad de estas bacterias para degradar estos compuestos depende del tiempo de contacto con el compuesto, las condiciones ambientales en las que se desarrollen y su versatilidad fisiológica (Torres-Rodríguez, 2003).

5.6.2 Bacterias del género *Bacillus*

El género *Bacillus* fue descrito por primera vez por Cohn y comprende un grupo de especies filogenética y fenotípicamente heterogéneas. Incluye más de 100 especies. En una etapa temprana de la clasificación de las especies del género *Bacillus* se tienen en cuenta dos características fundamentales: el crecimiento aerobio, la respuesta positiva a la tinción de Gram, la forma bacilar y la formación de endospora (Tejera-Hernández, y col., 2011).

Este género contiene cientos de especies bacterianas, muchos de ellos promueven el crecimiento vegetal; han mostrado la capacidad de producir y excretar citoquininas en la rizósfera, e influir positivamente en el crecimiento vegetal (Rojas-Solís y col., 2013)

Gutiérrez Luna y col., (2010) analizaron doce cepas aisladas de la rizósfera de plantas de limón *Citrus aurantifolia* y el efecto de compuestos volátiles en el desarrollo de las raíces de *A. thaliana*; se observaron cambios morfológicos diferenciales en la arquitectura de la raíz, debido a que algunas cepas bacterianas promovían el desarrollo de raíces laterales y crecimiento de pelos radiculares, así como una mayor longitud de la raíz primaria de las plantas.

Corrales Ramírez y col., (2014) analizaron la capacidad de solubilización de fosfatos de *B. pumilus*; se evaluó la relación del tamaño de la colonia y el tamaño del halo

de solubilización en mm, en medio Pikovskaya, resultando el segundo mejor halo de solubilización con 15 mm de diámetro.

5.6.3 Bacterias del género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* fue descrito por Beijerinck en el año 1925, describió una nueva especie de bacteria, aislada a partir de suelo holandés. J. Dobereiner y J. M. Day aislaron la bacteria y fueron los primeros en informar que estaba ampliamente distribuida en la rizosfera de varios pastos tropicales. Desde entonces, *Azospirillum* se ha aislado de las raíces de numerosos pastos, cereales y leguminosas silvestres (Bashan y Levanony, 1990).

El género *Azospirillum* comprende bacterias que son conocidas por la capacidad que tienen para promover el crecimiento vegetal en plantas, es perteneciente a la subclase de las *Proteobacterias* (Caballero, 2001); las bacterias pertenecientes a este género son organismos fijadores de N_2 que poseen una amplia distribución ecológica, debido a que se han encontrado en zonas templadas, tropicales y subtropicales (Parra y Cuevas, 2002).

Se ha investigado la capacidad de *Azospirillum* en la degradación de compuestos xenobióticos y pesticidas (como el glifosato) a nivel *in vitro* y en prácticas de rizorremediación con plantas de maíz y trigo (Travaglia y col., 2015).

Muratova y col., (2005) demostraron la capacidad de *A. Brasilense* para degradar petróleo crudo además de que la presencia de *Azospirillum* en la rizósfera genera una disminución del efecto tóxico en la planta, promoviendo la supervivencia y el desarrollo aún en presencia del contaminante.

5.7 Fijación de N_2

La fijación biológica de nitrógeno (FBN) es la reducción enzimática de nitrógeno atmosférico (N_2) a amonio (NH_4). Este proceso es exclusivo de algunas bacterias denominadas bacterias diazotróficas y es una opción importante para la recuperación de la fertilidad del suelo. La mayor parte de la investigación sobre FBN se ha realizado en la simbiosis entre rizobios y leguminosas; sin embargo, desde el

aislamiento de *Clostridium pasteurianum* por Winogradsky en 1893 y *Azotobacter chroococcum* por Beijerinck en 1901, se despertó el interés por el estudio de los microorganismos diazotróficos de vida libre y es en las últimas décadas cuando se ha investigado la FBN en bacterias asociadas a diversas gramíneas (Loredo-Osti y col., 2004).

5.8 Hidrocarburos

Debido a su naturaleza, los hidrocarburos son una mezcla de compuestos ricos en carbono e hidrógeno, pero también contienen elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno y trazas de metales. Dada la capacidad del carbono para formar cuatro enlaces, pueden formarse cadenas o ciclos. Las cadenas se conocen como compuestos alifáticos, son átomos de carbono unidos por enlaces sencillos (alcanos), dobles (alquenos) o triples (alquinos). Los hidrocarburos cíclicos pueden ser saturados (carbonos unidos por enlaces sencillos), o aromáticos (carbonos unidos por enlaces dobles) (Luque, 2009).

Los compuestos aromáticos y los alcanos son los más predominantes en los hidrocarburos. Los n-alcanos, n-alcaliaromáticos y aromáticos de C_{10} a C_{22} son los más fácilmente biodegradables, en comparación a los n-alcanos, n-alcaliaromáticos y aromáticos de más de C_{22} que tienen muy baja solubilidad en agua y son de muy lenta transformación por los microorganismos (Luque, 2009).

Los compuestos aromáticos presentes en los hidrocarburos generalmente son de dos tipos: aromáticos volátiles bencénicos y los poliaromáticos (PHA's).

5.9 Aromáticos volátiles bencénicos

Éstos compuestos son derivados del benceno (anillo aromático de seis átomos de carbono con tres enlaces dobles y tres enlaces sencillos), pueden estar conformados por uno o varios anillos. Los más analizados son el benceno, tolueno (metilbenceno), etilbenceno y xilenos (BTEX) debido a su movilidad y toxicidad ambiental (Luque, 2009).

5.10 PHA's

Éstos compuestos conforman del 10 al 25% del petróleo crudo y son la fracción más pesada. Los PHA's son moléculas conformadas por dos o más anillos aromáticos, la mayoría contiene anillos fusionados. Se les considera compuestos orgánicos persistentes, debido a que pueden permanecer largos periodos de tiempo en el ambiente gracias a sus propiedades semivolátiles que les proporciona gran movilidad (Luque, 2009).

Tienen impactos en la salud humana, debido a sus propiedades genotóxicas, esto es que causan daños al material genético (teratogénicas, mutagénicas y carcinogénicas). Los carcinogénicos más potentes dentro de los PHA's son el benzo(a) antraceno, benzo(a) pireno y el dibenzo(a,h)antraceno.

5. 11 Diésel

Es un hidrocarburo líquido con una densidad sobre de 832 kg/m^3 (0.832 g/cm^3), el cual está compuesto principalmente por parafinas y utilizado como combustible en calefacción y en motores tipo diésel (Ríos-Vázquez, 2005).

El diésel está compuesto de una mezcla de hidrocarburos C_{10} a C_{19} , los cuales incluyen aproximadamente 64% de hidrocarburos alifáticos, 1-2% de hidrocarburos olefínicos y 35% de hidrocarburos aromáticos (ATSDR, S.F.).

De acuerdo con la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, el diésel forma parte de los hidrocarburos de fracción media debido a que su contenido de moléculas de carbono se encuentra dentro del rango establecido por la misma para esta categoría que es de C_{10} a C_{28} .

Durante la destilación fraccionada del petróleo la extracción de los gases, gasolina y queroseno se continúa con la destilación del combustible diésel. El cual está constituido por hidrocarburos muy poco volátiles, ligeramente aceitosos usado como combustibles para los motores de este tipo. Sus estándares de producción y calidad dependen de la materia prima del país que lo produce (Quiroga y Alejandra, 2016).

5.12 Normatividad aplicable a suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos y sus procesos de biorremediación

La existencia de diferentes normativas que establezcan los límites permisibles de cualquier contaminante es de gran importancia debido a que se regula su presencia en cualquier medio, asegurando así una buena calidad y evitando que la salud pública se vea afectada.

5.12.1 Nacionales

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012

Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

De acuerdo a la normativa nacional, el diésel al ser parte de los hidrocarburos de fracción media, tiene un LMP de 1200 mg/kg en suelos de uso agrícola (Tabla 1), así como concentraciones <40 mg/kg para los PHA's (Tabla 2).

Tabla 1. Límites máximos permisibles para fracciones de hidrocarburos en suelo agrícola

<i>Fracción de hidrocarburos</i>	<i>Uso de suelo agrícola (mg/kg base seca)</i>
<i>Ligera</i>	200
<i>Media</i>	1200
<i>Pesada</i>	3000

Tabla 2. Límites máximos permisibles de hidrocarburos específicos en suelo agrícola

<i>Hidrocarburos específicos</i>	<i>Uso de suelo agrícola (mg/kg base seca)</i>
<i>Benceno</i>	6
<i>Tolueno</i>	40
<i>Etilbenceno</i>	10
<i>Xileno (suma de isómeros)</i>	40
<i>Benzo[a]pireno</i>	2
<i>Dibenzo[a,h]antraceno</i>	2
<i>Benzo[a]antraceno</i>	2
<i>Benzo[b]fluoranteno</i>	2
<i>Benzo[k]fluoranteno</i>	8

Fuente: (SEMARNAT, 2013)

5.12.2 Internacionales

En cuanto a la normatividad internacional, Ecuador establece 150 mg/kg como valor máximo permisible de PHA's en suelo de uso agrícola (Tabla 3) y <2 mg/kg de hidrocarburos aromáticos policíclicos (Tabla 4); Perú establece 1200 mg/kg PS como estándar de calidad para la presencia de diésel de fracción media en suelos (Tabla 7); Unión Europea establece un contenido máximo de 6 mg/kg en peso seco de PHA₁₆ para sustratos de cultivo, enmiendas del suelo y cubiertas del suelo (Tabla 5); en el caso de España se establecen para cada PHA un valor máximo específico como lo son 0.3 mg/kg peso seco para Tolueno y 0.1 mg/kg peso seco para Naftaleno (Tabla 6).

▪ ECUADOR

Acuerdo No. 097-A

Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados (Anexo 2, Libro VI de la Calidad Ambiental, del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente).

Tabla 3. Valores máximos permisibles para criterios de calidad de suelo en uso agrícola Ecuador

Sustancia	Unidades (concentración en peso seco)	Uso de suelo agrícola
<i>Benceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.05</i>
<i>Etilbenceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Estireno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Tolueno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Xileno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>PCB's</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos(PHA's)</i>	<i>mg/kg</i>	<i>150</i>
<i>Clorobenceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>

Tabla 4. Valores máximos permisibles para criterios de remediación o restauración de suelo en uso agrícola Ecuador

Sustancia	Unidades (concentración en peso seco)	Uso de suelo agrícola
<i>Hidrocarburos aromáticos monocíclicos</i>		
<i>Benceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.05</i>
<i>Etilbenceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Estireno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Tolueno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.08</i>
<i>Xileno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>PCB's</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.5</i>
<i>Hidrocarburos totales (THP)</i>	<i>mg/kg</i>	<i>150</i>
<i>Clorobencenos (cada tipo)</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.05</i>
<i>Hidrocarburos aromáticos policíclicos</i>	<i>mg/kg</i>	<i><2</i>
<i>Benzo(a)antraceno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>
<i>Benzo(a)pireno</i>	<i>mg/kg</i>	<i>0.1</i>

Fuente: (Presidencia de la república, S.F.)

▪ **UNIÓN EUROPEA**

DECISIÓN 2015/2099 DE LA COMISIÓN

Por la que se establecen los criterios ecológicos para la concesión de la etiqueta ecológica de la UE a sustratos de cultivo, enmiendas del suelo y cubiertas del suelo

Tabla 5. Límites de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) UE

Contaminante	Contenido máximo en el producto (mg/kg de peso seco)
<i>HAP₁₆</i>	<i>6</i>
HAP16= suma de naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, fenantreno, antraceno, fluoranteno, pireno, benzo[a]antraceno, criseno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, indeno[1,2,3-cd]pireno, dibenzo[a,h]antraceno y benzo(ghi)perileno	

Fuente: (Comisión europea, 2015)

▪ **ESPAÑA**

Real Decreto 9/2005, de 14 de enero, por el que se establece la relación de actividades potencialmente contaminantes del suelo y los criterios y estándares para la declaración de suelos contaminados

Tabla 6. Listado de contaminantes y niveles genéricos de referencia para protección de los ecosistemas España

Sustancia	Organismos del suelo (mg/kg peso seco)
<i>Benceno</i>	1
<i>Clorobenceno</i>	1
<i>Fenol</i>	0.27
<i>Naftaleno</i>	0.1
<i>Benzo(a)pireno</i>	0.15
<i>Benzo(a)antraceno</i>	3.8
<i>Tolueno</i>	0.3
<i>Estireno</i>	0.68

Fuente: (Ministerio de la presidencia, 2005)

- **PERÚ**

Resolución Ministerial N°182-2018-MINAM

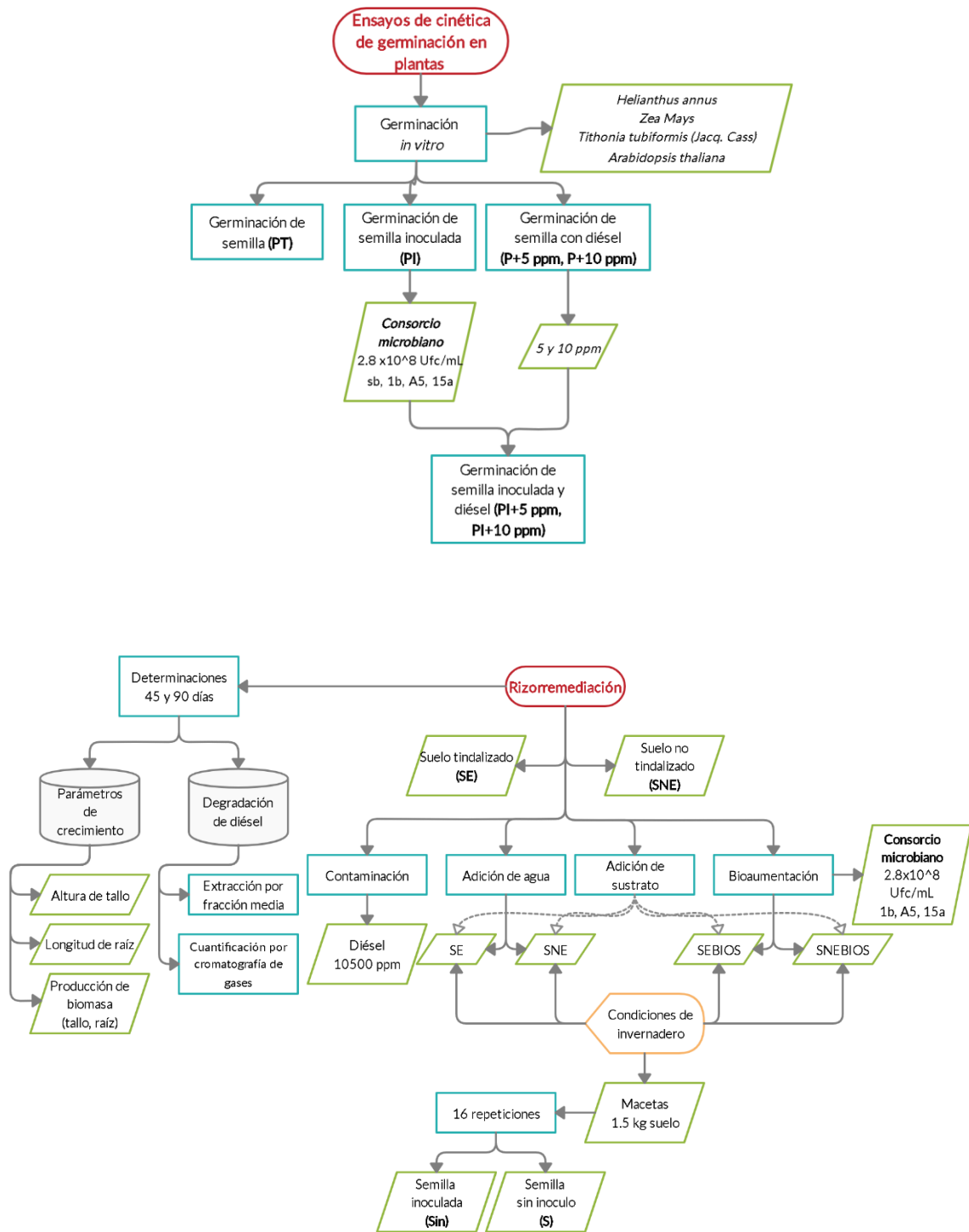
Estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo

Tabla 7. Estándares de calidad ambiental (ECA) para suelo Perú

Parámetros en mg/kgPS	Suelo agrícola
Hidrocarburo aromáticos volátiles	
<i>Benceno</i>	0.03
<i>Tolueno</i>	0.37
<i>Etilbenceno</i>	0.082
<i>Xilenos</i>	11
Hidrocarburos poliaromáticos	
<i>Naftaleno</i>	0.1
<i>Benzo(a)pireno</i>	0.1
Hidrocarburos de petróleo	
<i>Fracción C₆ – C₁₀</i>	200
<i>Fracción > C₁₀ – C₂₈</i>	1200
<i>Fracción > C₂₈ – C₄₀</i>	3000

Fuente: (Ministerio del ambiente, 2017)

6. METODOLOGÍA



6.1 Material biológico utilizado

Son utilizadas cuatro cepas bacterianas extraídas de suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos de las zonas de Acatzingo y San Martín Texmelucan, Puebla, examinadas por Sánchez Varguez en 2018, debido a su capacidad de promoción de crecimiento vegetal y sus diferentes características fisiológicas se seleccionaron:

- Cepa fijadora de N_2
(A5, *Azospirillum brasilense*)

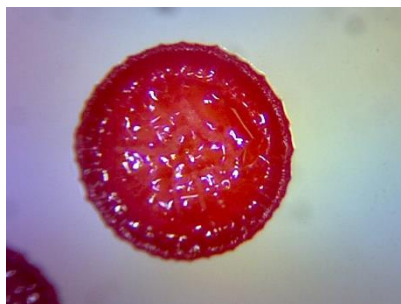


Imagen 2. Cepa A5

- Termoresistente,
emulsificadora y
biodegradadora
(1b *Bacillus pumilus*)



Imagen 3. Cepa 1b

- Emulsificadora y tolerante a
diésel
(15a *Pseudomonas
aeruginosa*)



Imagen 4. Cepa 15a

- Solubilizadora, emulsificadora y tolerante a diésel
(s-b *Pseudomonas frederiksbergensis*)

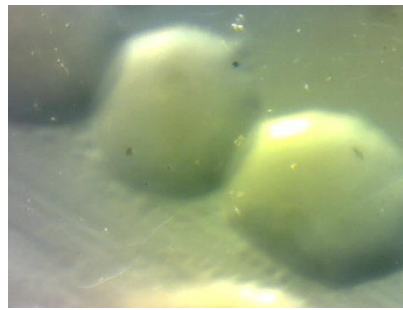


Imagen 5. Cepa sb

Fuente: Propia

Debido a que estas cepas bacterianas presentaron el mayor porcentaje de biodegradación a una concentración inicial de 24 000 ppm de diésel a nivel *in vitro*.

En 2019, Guevara-Avendaño realizó una biodegradación a nivel microcosmos para evaluar la eficiencia de dicho consorcio microbiano en el suelo a 24 000 ppm de diésel.

6.1.1 Preparación del inoculante

Debido a que el material biológico se encuentra normalmente en stock en condiciones criogénicas, es necesario hacer una reactivación de las cepas bacterianas en tubos de ensayo con Caldo Nutritivo para las cepas 15a y sb, mientras que para la cepa A5 al ser fijadora se requiere un caldo de medio Nfb, dejándose agitar en incubación en 24 y 48 horas respectivamente, posterior a esto son sembradas en cajas de Agar Nutritivo para las cepas 15a y sb, mientras que Rojo Congo se utiliza para la cepa A5. En el caso de la cepa 1b, únicamente se hace un rayado sobre una caja de Agar Nutritivo con la muestra dejándose incubar en un tiempo de 24 horas.

6.1.1.1 Inoculante para ensayos de cinética de germinación en plantas

Se realiza un pre cultivo en tubos de Caldo Nutritivo para las cepas 15a, 1b y sb, en el caso de la cepa A5 se utiliza Caldo Nfb, dejándose inocular un tiempo de 16 y 36 horas respectivamente haciendo coincidir los tiempos para que todas las cepas se encontraran listas al mismo tiempo, posteriormente se hace un ajuste de población

centrifugando en tubos falcón para sacar el concentrado bacteriano y diluirlo en buffer de fosfatos que será analizado en un espectrofotómetro a 610 nm hasta llegar a una D.O. de 0.1 para 15a, 0.3 para sb, 0.5 para A5 y 1b.

A continuación, se realiza la pre adaptación de las cepas en un medio HBm, al cual le será añadido el 0.1% de diésel estéril y el 1% de población ajustada dejándose incubar en agitación el mismo tiempo requerido para cada cepa.

6.1.1.2 Inoculante para rizorremediación

Se realiza un pre cultivo en tubos de Caldo Nutritivo para las cepas 15a y 1b, en el caso de la cepa A5 se utiliza Caldo Nfb, dejándose inocular un tiempo de 16 y 36 horas respectivamente haciendo coincidir los tiempos para que todas las cepas se encontraran listas al mismo tiempo, posteriormente se hace un proliferación bacteriana en la que el contenido de los tubos son trasladados a un matraz con los Caldos respectivos haciendo una modificación en el Caldo Nfb, el cual es aumentar la cantidad de fructuosa y así acrecentar el crecimiento bacteriano, dejándose incubar el mismo tiempo. Finalmente, la población fue ajustada en buffer de fosfatos a una D.O. de 0.1 para 15a; 0.5 para A5 y 1b, la cual nos expresa una población en el suelo de 2.8×10^8 ufc/mL.

6.2 Ensayos de cinética de germinación en plantas

Previo a la determinación del diseño experimental se realizan pruebas de cinética de germinación de cuatro plantas candidatas a la rizorremediación, escogidas por diferentes razones como: ser endémica de la zona, resistentes a poliaromáticos y utilizadas en fitorremediación de hidrocarburos, dentro de las cuales será seleccionada la más resistente y apta para la investigación.

En primera instancia se propicia la germinación *in vitro* de las semillas de las plantas a ocupar; *Helianthus annuus* (Girasol), *Zea mays* (Maíz) (Imagen 6), *Tithonia tubuformis* (Jacq.) Cass (Palocote) y *Arabidospsis thaliana* (Oruga). Para llevar a cabo este tipo de germinación, las semillas son colocadas en cajas de plástico

estériles o cajas Petri estériles, separadas en cuatro tratamientos, tales que llevarán un seguimiento diario durante 12 días:

1. Control: Germinación de semilla (PT)

Son colocadas las semillas en la caja con una cama de papel filtro y agua hasta lograr la germinación.

2. Germinación de semilla inoculada (PI)

Las semillas se colocaron en la caja con una cama de papel filtro, éstas fueron inoculadas agregando 2×10^8 cel/mL de inoculante obtenido del consorcio bacteriano con 1b, A5, 15a.

3. Germinación semilla con diésel (P+5 ppm, P+10 ppm)

Las semillas fueron contaminadas con una solución de diésel-metanol en concentraciones de 5 y 10 ppm, en base al proceso de disolución del contaminante expuesto por Alkio y col., (2005).

4. Germinación semilla con inoculante y diésel (PI+5 ppm, PI+10 ppm)

Son ubicadas las semillas en la caja con una cama de papel filtro, las cuales serán inoculadas con el consorcio bacteriano de sb, 1b, A5, 15a; además de una dosis de diésel con una solución de diésel-metanol en concentraciones de 5 y 10 ppm, para poder analizar la asociación bacteria-contaminante-planta.



Imagen 6. Germinación *in vitro* de *Zea Mays*

6.3 Risorremediación

Para poder establecer el diseño experimental de la investigación fue necesario hacer un análisis, estudio y clasificación del suelo con el que se llegó a trabajar, esto con el fin de anticipar el comportamiento del contaminante y la planta dentro del mismo.

Se diseñó el experimento a nivel invernadero bajo condiciones atmosféricas controladas como el porcentaje de humedad a 67%, una temperatura de 28°C y una dosis de fertilización del suelo C:N:P 100:10:1.

6.3.1 Actividades preliminares de acondicionamiento del suelo

6.3.1.1 Tindalización

El proceso de esterilización del suelo agrícola constó de embolsarlo y mantenerlo en una autoclave durante dos horas a 10 Psi, repitiendo el proceso cada tercer día hasta haber triplicado el procedimiento.

6.3.1.2 Contaminación de suelo con diésel

Para asegurar una exactitud en los procedimientos fue necesario obtener el valor preciso de la densidad del diésel utilizado, esto se consiguió por medio de la fórmula de densidad y el pesaje a un vial que contenía 1 mL de diésel, obteniendo un valor de 0.8248 g/mL.

Posteriormente se contaminó el suelo con 10 500 ppm, valor obtenido al término de un proceso de evaluación de la biorremediación de diésel a nivel microcosmos por (Guevara-Avenida, 2019).

6.3.1.3 Adición de sustrato

Se adicionó como texturizante, bioestimulador y bioaumentador para el suelo, la paja residual de la producción del hongo comestible *Pleurotus ostreatus* en una concentración de 6% respecto del peso del suelo, mezclándolo hasta que sea homogéneo.

6.3.2 Diseño experimental

Se utilizaron dos tipos de suelo: a) suelo tindalizado, y b) suelo no tindalizado con y sin contaminante a una concentración inicial de 10 500 ppm.

A partir de los cuales, se dividieron en cuatro tratamientos: suelo estéril (SE), suelo no estéril (SNE), suelo estéril bioaumentado (SEBIOS) y suelo no estéril bioaumentado (SNEBIOS), y sus respectivos testigos (SE ST, SNE ST, SEBIOS ST, SNEBIOS ST). Los suelos bioaumentados fueron inoculados con el consorcio bacteriano integrado por tres bacterias: 1b, 15a, y A5, a una concentración final en el suelo de 2.8×10^8 Ufc/mL.

Se colocaron 1.5 kg de cada tipo de suelo en macetas alcanzando 16 repeticiones, mismas que fueron distribuidas en dos sub-tratamientos con la diferencia de que la mitad tendría semillas inoculadas con el consorcio microbiano utilizado para la bioaumentación (Sin) y el resto tendría semillas no inoculadas (S) (Imagen 7).

Tabla 8. Diseño experimental para rizorremediación

Suelo tindalizado + diésel + sustrato (SE ST)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato (SNE ST)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + bioaumentación (SEBIOS ST)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + bioaumentación (SNEBIOS ST)
Suelo blanco + semilla no inoculada (SB)
Suelo blanco + semilla inoculada (SBI)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + semilla inoculada + agua (SESin)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + semilla no inoculada + agua (SES)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + semilla inoculada+ agua (SNESin)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + semilla no inoculada + agua (SNES)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + bioaumentación + semilla inoculada (SEBIOSin)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + bioaumentación + semilla no inoculada (SEBIOS)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + bioaumentación + semilla inoculada (SNEBIOSin)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + bioaumentación + semilla no inoculada (SNEBIOS)
Suelo tindalizado + diésel + sustrato + semilla inoculada con A5 (SEA)
Suelo sin tindalizar + diésel + sustrato + semilla inoculada con A5 (SNEA)



Imagen 7. Diseño experimental para rizorremediación

6.3.3 Análisis de parámetros

Se analizaron diferentes determinaciones para evaluar el crecimiento de las plantas a los 45 y 90 días posteriores a la germinación.

1. Tasa de crecimiento (altura de la planta (A), longitud de raíz (LR), diámetro planta (D), diámetro hoja (DH))
2. Producción de biomasa (peso raíz y tejido aéreo (PSR Y PSA))
3. Degradación de diésel (acumulación de hidrocarburos en raíz, tejido aéreo y suelo)
4. Evaluación de la calidad de la planta (ICD)

6.3.3.1 Índice de calidad de Dickson

Para obtener información sobre la calidad de la especie vegetal se tomaron las mediciones de largo aéreo, longitudes de raíz, peso húmedo y peso seco realizadas a los 45 y 90 días para posteriormente obtener el índice de calidad de Dickson.

El ICD se obtuvo a partir de la siguiente ecuación:

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

Donde:

PST= peso seco total de la planta (g)

A= altura de la planta (cm)

D= diámetro de la planta (mm)

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

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

6.3.3.2 Capacidad de germinación

Según Labouriau, la germinabilidad de una muestra de semilla es el porcentaje de semillas en el que el proceso de germinación llega al final, en condiciones experimentales, mediante el crecimiento intraseminal que resulta en la protrusión (o emergencia) de un embrión vivo. En general, se presenta como porcentaje, acompañado de alguna medición de dispersión (Ranal y García de Santana, 2006).

Del punto de vista práctico, esta estadística se parece al valor del porcentaje de germinación de semilla plena o completa obtenida al final de un ensayo de viabilidad. (FAO, s.f.)

6.3.3.3 Porcentaje de germinación

Es el número de semillas germinadas con respecto a un tiempo específico establecido.

6.3.3.4 Tiempo modal

El tiempo modal es el punto de distribución en el que se observa la mayor frecuencia de semillas germinadas. Representa el pico de germinación, aunque a veces no es único. Hay muestras de semillas cuyas distribuciones presentan dos o más picos de germinación (germinación con tiempo polimodal) y, en este caso, esta medición es inadecuada para sintetizar la información (Ranal y García de Santana, 2006).

6.3.3.5 Tiempo medio de germinación

Propuesto por Haberlandt en 1875 (Ranal y García de Santana, 2006), se calcula como la media ponderada del tiempo de germinación. El número de semillas germinadas en los intervalos de tiempo establecidos para la recolección de datos se usa como peso. En este caso, el uso de la media ponderada es indispensable, ya que considera que germina un número diferente de semillas

$$\bar{t} = \frac{\sum_{i=1}^k n_i t_i}{\sum_{i=1}^k n_i}$$

Donde:

t_i = tiempo desde el inicio del experimento hasta la observación i^{th} (día u hora)

n_i = número de semillas germinadas en el tiempo i (no el número acumulado, sino el número correspondiente a la observación i^{th})

k = última vez de germinación

6.3.3.6 Cuantificación de degradación de diésel

6.3.3.6.1 Extracción de fracción media

Se realizó el análisis de hidrocarburos de fracción media, diésel de $C_{10} - C_{28}$. Se llevó a cabo la extracción y cuantificación de diésel a 45 y 90 días de cada uno de los tratamientos por triplicado con base al método de extracción EPA 3550C (Ultrasonic Extraction). Consiste en añadir sulfato de sodio anhidro (activado a 400 °C durante 4 horas en una mufla) y sílica gel, en relación 1:1 con la finalidad de eliminar la humedad del suelo para luego sonicar en presencia del disolvente orgánico cloruro de metileno o también llamado diclorometano (grado HPLC, marca Fermont). El extracto obtenido fue filtrado en papel de filtro estándar y posteriormente evaporado a 45 °C hasta obtener un volumen de 1 mL, el cual se aforó y almacenó en viales de 2 mL en condiciones de refrigeración hasta su inyección en el cromatógrafo (Imágenes 8 y 9).



Imagen 8. Filtración del extracto



Imagen 9. Aforo del extracto a 1 mL

6.3.3.6.2 Cuantificación por cromatografía de gases

Se realizó un análisis cuantitativo de la fracción media (diésel) de acuerdo con el método EPA 8015B (Nonhalogenated Organics using CG-FID), se inyectó 1 μL de muestra extraída en un cromatógrafo de gases GC System-FID, Modelo HP 6890 con una columna capilar HP-5 (0.25 mm* 30 m* 0.25 μm) cuyo flujo inicial fue de 1.0 mL/min (Imagen 10).

Las condiciones de análisis del horno fueron: Temperatura inicial 45 °C, una rampa de 20°C/min y temperatura máxima 275 °C.



Imagen 10. Cromatógrafo de gases GC System-FID, Modelo HP 6890

6.4 Análisis estadístico

Se realizó un análisis estadístico para identificar tendencias dentro de los parámetros analizados, utilizando Minitab, versión 19.2.0. La interpretación de los resultados se llevó a cabo por medio de un ANOVA, el cual mediante las medias poblacionales y una prueba de hipótesis supone verdadera una afirmación inicial. De igual forma se utilizó la prueba de Tuckey, la cual nos sirve para probar todas las diferencias entre medias de tratamientos y nos proporciona información sobre la agrupación; todo esto para poder determinar qué tratamiento es el más eficiente.

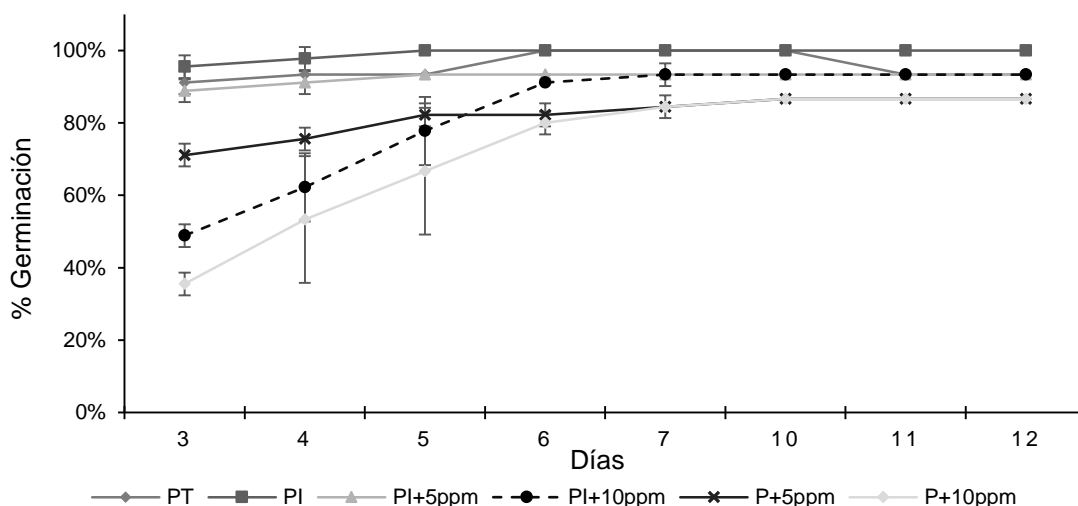
7. RESULTADOS

7.1 Resultados de cinética de germinación

7.1.1 Efecto de diésel en *Zea Mays* (Maíz)

El comportamiento de *Zea Mays* en presencia de diésel a las concentraciones de 5 y 10 ppm aunado a la presencia del consorcio microbiano se representa en la Gráfica 1 y Tabla 9.

Gráfica 1. Cinética de germinación de *Zea Mays*



El porcentaje de germinación del Testigo (PT) fue cercano al 100% al tercer día, el tratamiento inoculado con 5 ppm se comportó como el testigo. Sin embargo, en los tratamientos con 10 ppm del diésel afectó negativamente a todos retrasando la germinación tres días con respecto al testigo. El grado de afectación de la germinación con diésel fue P+10 ppm > PI+10 ppm > P+5 ppm > PI+5 ppm. Los tratamientos inoculados ya sea con 5 y 10 ppm tuvieron menos afectación al diésel y las plantas inoculadas sin diésel presentaron el segundo mayor porcentaje de germinación (Gráfica 1).

Tabla 9. Análisis de germinación de *Zea Mays*

<i>Tratamiento</i>	CG	Tiempo de germinación		
		Mediana	T mod	T med
PT	96.3% ± 0.005 a	3.50±0.00 b	6.00±0.00 b	5.90±0.01 a
PI	98.9% ± 0.009 a	2.5±0.40 c	4.0±0.81 c	5.86±0.02 b
PI+5ppm	92.2% ± 0.009 a	2.5±0.40 c	4.0±0.81 c	5.86±0.02 b
P+5ppm	80.4% ± 0.02 b	4.33±0.84 a	7.67±1.69 a	5.96±0.03 b
PI+10ppm	75.4% ± 0.08 c	3.5±0.40 b	6.0±0.81 a	6.26±0.13 a
P+10ppm	67.8% ± 0.01	4.5±0.70	8.0±1.41	6.37±0.05

P valor	d	a	a	a
	0.000	0.009	0.009	0.000

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, con respecto a cada parámetro analizado, CG= Capacidad de Germinación, T mod= Tiempo modal de germinación, T med= Tiempo medio de germinación

Como se expresa en la Gráfica 1, la mayor capacidad de germinación la obtuvo la planta testigo (PT) con un 98.9%, seguido de PI y el tratamiento con diésel PI+5 ppm. Los tratamientos posteriores fueron afectados en la capacidad de germinación PI+5 ppm > P+5 ppm > PI+10 ppm > P+10 ppm con diferencia significativa ($P=0.000$).

En el caso de las mediciones de los tiempos de germinación, la variable de mediana, nos demostró que P+10 ppm y P+5 ppm tuvieron los valores más altos, es decir el efecto toxico del diésel fue negativo para la germinación; mientras que los tratamientos con menor valor de mediana fueron el testigo (PT) y PI con diferencia significativa ($P=0.010$).

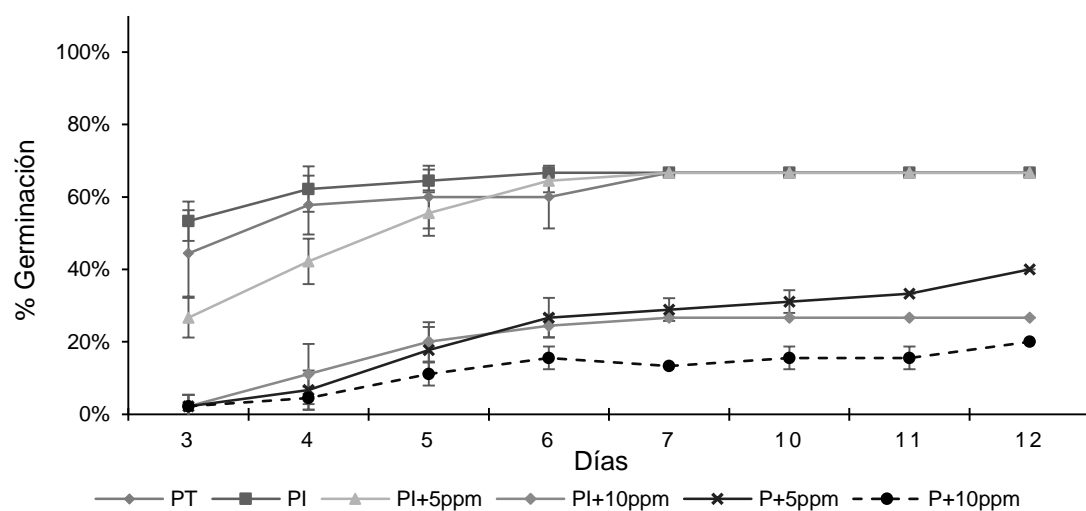
Para el tiempo modal de germinación observamos a P+10 ppm y P+5 ppm con los valores más altos, lo que significa que la frecuencia de semillas germinadas se presentó en un mayor tiempo a diferencia de los tratamientos testigo e inoculados con diferencia significativa ($P=0.010$).

El tiempo medio de germinación se presentó con diferencia significativa ($P=0.000$), donde los valores más altos se encontraron para P+10 ppm y PI+10 ppm, a diferencia de los tratamientos restantes P+5 ppm, PI+5 ppm, PT y PI.

7.1.2 Efecto de diésel en *Helianthus annuus* (Girasol)

El comportamiento de *Helianthus annuus* en presencia de diésel a las concentraciones de 5 y 10 ppm aunado a la presencia del consorcio microbiano se refleja en la Gráfica 2 y Tabla 10.

Gráfica 2. Cinética de germinación de *Helianthus annuus*



El tratamiento PI de *Helianthus annuus* presentó el mayor porcentaje de germinación (66.6%) en el día 6. Seguido del testigo (PT) y el tratamiento inoculado con 5 ppm que retrasaron el inicio de la germinación debido a la presencia de diésel. Los tratamientos sin inoculante y con 10 ppm de diésel presentaron mayor grado de afectación de forma que P+10 ppm > PI+10 ppm > P+5 ppm, mismos que presentaron los menores porcentajes de germinación alcanzando del 20 al 40% en el día 12 (Gráfica 2).

Tabla 10. Análisis de germinación de *Helianthus annuus*

Tratamiento	CG	Tiempo de germinación		
		Mediana	T mod	T med
PT	61.1% ± 0.04 a	3.16±0.62 b	5.33±1.24 b	7.56±0.22 b
PI	64.2% ± 0.01 a	2.83±0.47 c	4.66±0.94 c	7.39±0.07 b
PI+5ppm	56.9% ± 0.01 a	3.66±0.23 b	6.33±0.47 b	7.86±0.07 b
P+5ppm	23.3% ± 0.02 b	5.0±1.08 a	9.0±2.16 a	8.82±0.30 a
PI+10ppm	21.4% ± 0.01 b	3.5±0.40 b	6.0±0.81 b	8.34±0.44 a

P+10ppm	12.2% ± 0.01	6.16±0.47	11.33±0.94	8.53±0.16
	c	a	a	a
P valor	0.000	0.001	0.001	0.001

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, con respecto a cada parámetro analizado, CG= Capacidad de Germinación, T mod= Tiempo modal de germinación, T med= Tiempo medio de germinación

Los mayores valores de capacidad de germinación se encontraron con el tratamiento inoculado (PI) junto con el testigo (PT) con más del 60%, el tratamiento más afectado fue P+10 ppm que presentó una capacidad de germinación de 12.2%, con diferencia significativa ($P=0.000$).

Las mediciones del tiempo de germinación arrojaron que los mayores valores de la mediana se encontraron con los tratamientos adicionados con diésel a 5 y 10 ppm (P+10 ppm y P+5 ppm), el tratamiento inoculado (PI) presentó el menor valor con diferencia significativa ($P=0.001$).

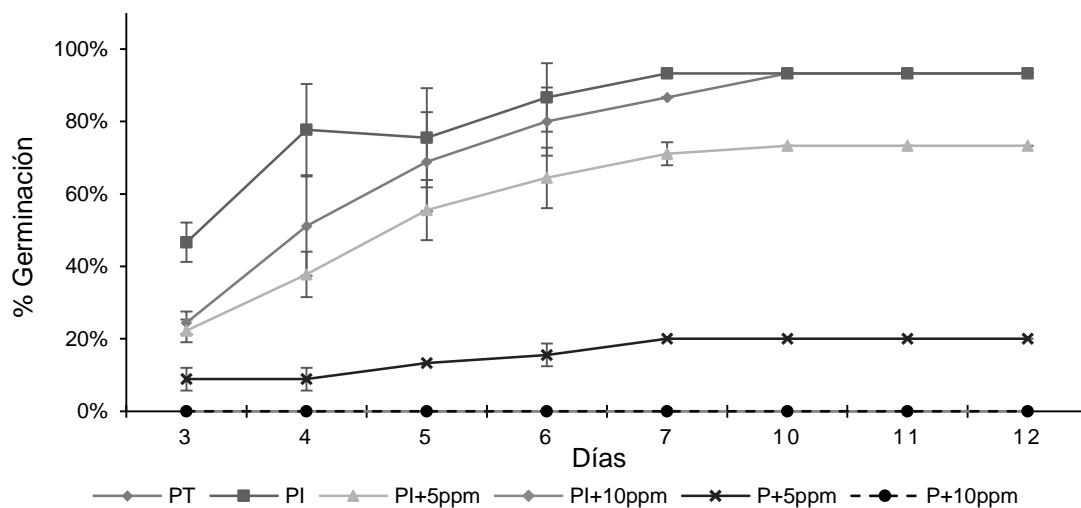
El tiempo modal de germinación mostró que los tratamientos que tardaron más en llegar al pico de germinación fueron P+10 ppm y P+5 ppm al presentar los valores más altos, a diferencia del tratamiento inoculado (PI) con tiempo modal de 4.66 días ($P=0.001$).

El tiempo medio de germinación presentó los valores más altos arriba de 8 días en los tratamientos P+10 ppm > P+5 ppm > PI+10 ppm > PI+5 ppm, a diferencia del resto de los tratamientos que presentaron valores de 7 días con diferencia significativa ($P=0.001$).

7.1.3 Efecto de diésel en *Arabidopsis thaliana* (Oruga)

El comportamiento de *Arabidopsis thaliana* en presencia de diésel a las concentraciones de 5 y 10 ppm aunado a la presencia del consorcio microbiano se refleja en la Gráfica 3 y Tabla 11.

Gráfica 3. Cinética de germinación de *Arabidopsis thaliana*



La gráfica de germinación para *Arabidopsis thaliana* demuestra que el mayor porcentaje se obtuvo del testigo (PT) con un 93.3% de germinación en el día 7, el tratamiento con inoculación (PI) se comportó de forma similar, llegando a dicho porcentaje con 3 días de diferencia; los tratamientos con 5 ppm de diésel tuvieron afectaciones significativas, debido a que el inoculado (PI+5 ppm) consiguió un 73.3% de germinación, mientras que el no inoculado (P+5 ppm) se mantuvo en 20%; siendo éste el menor valor, ya que los tratamientos con 10 ppm no presentaron germinación (Gráfica 3).

Tabla 11. Análisis de germinación de *Arabidopsis thaliana*

Tratamiento	CG	Tiempo de germinación		
		Mediana	T mod	T med
PT	61.57% ± 0.05 a	3.5 ± 0.40 a	6.0±0.81 a	6.55±0.18 a
PI	70.16% ± 0.03 a	3.5 ± 0.40 a	6.0±0.81 a	6.12±0.11 a
PI+5ppm	49.31% ± 0.03 b	4.3±0.84 a	7.66±1.69 a	6.70±0.29 a
P+5ppm	13.12% ± 0.01 c	3.8±0.23 a	6.66±0.47 a	6.51±0.21 a
PI+10ppm	0% ± 0.0 d	0.0±0.0 b	0% ± 0.0 b	0.0±0.0 b

P+10ppm	0% ± 0.0	0% ± 0.0	0% ± 0.0	0% ± 0.0
	d	b	b	b
P valor	0.000	0.000	0.000	0.000

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, con respecto a cada parámetro analizado, CG= Capacidad de Germinación, T mod= Tiempo modal de germinación, T med= Tiempo medio de germinación

La mayor capacidad de germinación analizada en *Arabidopsis thaliana* se presentó en el testigo (PT) con un 70.16%; la presencia de diésel afectó considerablemente a los tratamientos de modo que PI+5 ppm y P+5 ppm tienen una diferencia de 36% de capacidad de germinación entre tratamientos, mientras que PI+10 ppm y P+10 ppm no presentan germinación ($P=0.000$).

La mediana del tiempo de germinación presentó su valor máximo en PI+5 ppm, mientras que el valor mínimo se presentó para el tratamiento inoculado (PI) y el testigo (PT), con diferencia significativa ($P=0.000$).

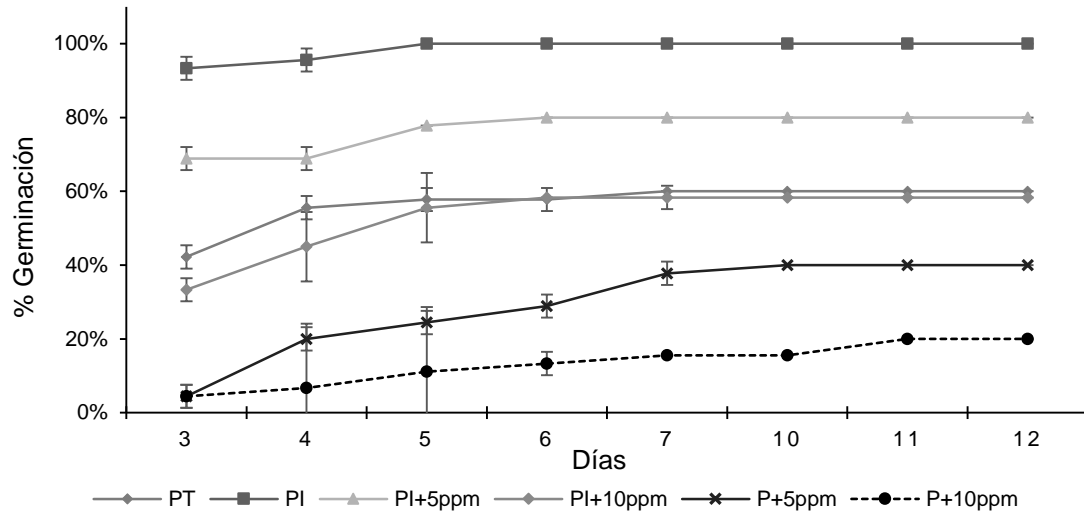
El tiempo modal mostró que el tratamiento que tardó más tiempo en llegar a su pico de germinación fue PI+5 ppm, mientras que el testigo (PT) y el tratamiento inoculado (PI) obtuvieron un menor tiempo modal de germinación, con diferencia significativa ($P=0.000$).

El tiempo medio de germinación para *Arabidopsis thaliana* es muy parecido en todos los tratamientos, teniendo PI+5 ppm > PI > P+5 ppm > PT presentando valores arriba de 6 días, con diferencia significativa ($P=0.000$).

7.1.4 Efecto de diésel en *Tithonia tubuformis* (Jacq.) Cass (Palocote)

El comportamiento de *Tithonia tubuformis* en presencia de diésel a las concentraciones de 5 y 10 ppm aunado a la presencia del consorcio microbiano se refleja en la Gráfica 4 y Tabla 12.

Gráfica 4. Cinética de germinación de *Tithonia tubuformis*



El porcentaje de germinación del tratamiento inoculado (PI) fue del 100% al quinto día, los tratamientos con diésel se vieron afectados; sin embargo, los inoculados obtuvieron mejor germinación, aún con 5 ppm se obtuvo un 80% al sexto día, y con 10 ppm un 58% de germinación al quinto día. Los tratamientos no inoculados y con diésel obtuvieron menos del 40% de germinación (Gráfica 4).

Tabla 12. Análisis de germinación de *Tithonia tubuformis*

<i>Tratamiento</i>	CG	Tiempo de germinación		
		Mediana	T mod	T med
PT	57.4% ± 0.007 c	3.2±0.62 b	5.33±1.24 b	7.46±0.07 b
PI	98.6% ± 0.01 a	2.7±0.47 b	4.33±0.94 b	7.30±0.04 b
PI+5ppm	76.9% ± 0.01 b	3.2±0.23 b	5.3±0.47 b	7.39±0.04 b
P+5ppm	30.4% ± 0.01 d	4.5±0.70 a	8.0±1.41 a	8.39±0.24 a
PI+10ppm	53.2% ± 0.02 c	3.0±0.40 b	5.0±0.81 b	7.62±0.17 b
P+10ppm	13.3% ± 0.01 e	5.3±0.94 a	9.66±1.88 a	8.50±0.52 a
P valor	0.000	0.006	0.006	0.001

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, con respecto a cada parámetro analizado, CG= Capacidad de Germinación, T mod= Tiempo modal de germinación, T med= Tiempo medio de germinación

La capacidad de germinación más alta para *Tithonia tubuformis* fue en los tratamientos inoculado (PI) y testigo (PT), mientras que los porcentajes más pequeños se presentaron en los tratamientos con presencia de diésel sin inoculación (P+5 ppm y P+10 ppm) con diferencia significativa ($P=0.000$).

La mediana del tiempo de germinación presentó sus valores más altos en los tratamientos con diésel sin inoculación P+10 ppm y P+5 ppm de 5.3 y 4.5 días respectivamente; los tratamientos con inoculación y diésel obtuvieron un tiempo de germinación similar con 3.0 y 3.2 días respectivamente ($P=0.006$).

En el tiempo modal, los tratamientos que tardaron más en llegar al pico de germinación fueron P+10 ppm y P+5 ppm con 9.66 y 8.0 días; sin embargo, los tratamientos con menor tiempo modal fueron el testigo (PT) y el tratamiento inoculado (PI) con valores de 5.33 y 4.33 días respectivamente ($P=0.006$).

El tiempo medio de germinación mayor se encontró con los tratamientos P+10 ppm y P+5 ppm con más de 8 días, el resto de los tratamientos obtuvieron tiempos similares posicionándolos como PI+10 ppm > PI+5 ppm presentando valores arriba de 7 días con diferencia significativa ($P=0.001$).

De acuerdo con los resultados obtenidos en cuanto a capacidad y tiempo de germinación *Zea Mays* es viable para aplicarla en el proceso de rizorremediación por su disponibilidad y tolerancia a diésel de acuerdo a los resultados obtenidos de los parámetros de germinación.

7.2 Resultados de rizorremediación

Tabla 13. Parámetros de crecimiento de *Zea Mays* a 45 días

<i>Tratamiento</i>	<i>45 Días</i>									
	PH (g)	PS (g)	PSR (g)	PSA (g)	A (cm)	D (mm)	ICD	Hojas	DH (mm)	LR (cm)
SB	1.58±0.06 d	0.48±0.05 d	0.30±0.05 c	0.18±0.001 c	27.25±0.20 a	3.00±0.00 a	0.04±0.007 b	5.00±0.00 c	2.83±0.23 b	38.65±4.61 b
SBI	2.61±0.15 c	0.64±0.01 c	0.38±0.01 c	0.26±0.01 b	30.55±1.26 a	4.00±0.00 a	0.08±0.001 b	6.00±0.00 a	3.66±0.47 a	55.00±4.08 a
SES	5.00±0.60 a	1.00±0.01 b	0.84±0.01 a	0.16±0.005 c	24.60±0.08 b	3.83±0.42 a	0.15±0.02 a	5.50±0.47 b	3.41±0.43 a	23.55±1.28 c
SESin	3.81±0.15 b	1.26±0.17 a	1.00±0.15 a	0.25±0.02 b	29.60±1.51 a	3.91±0.11 a	0.15±0.006 a	6.00±0.47 a	3.66±0.47 a	34.25±3.06 b
SNES	3.49±0.11 b	0.75±0.004 c	0.52±0.008 b	0.20±0.01 b	25.57±0.95 b	3.75±0.35 a	0.08±0.007 b	5.00±0.00 c	3.33±0.31 a	23.80±0.57 c
SNESin	3.59±0.12 b	0.84±0.02 c	0.63±0.01 b	0.22±0.009 b	32.40±0.77 a	3.83±0.32 a	0.12±0.01 a	5.50±0.40 b	3.41±0.23 a	51.92±3.36 a
SEBIOS	3.50±0.17 b	0.45±0.01 d	0.26±0.01 d	0.19±0.002 c	25.25±0.96 b	3.91±0.11 a	0.06±0.004 b	5.33±0.47 b	3.83±0.23 a	19.95±1.38 d
SEBIOSin	4.56±0.48 a	1.33±0.03 a	1.08±0.01 a	0.25±0.006 b	28.94±0.07 a	4.00±0.23 a	0.17±0.01 a	5.66±0.23 b	4.16±0.23 a	24.89±0.72 c
SNEBIOS	3.00±0.24 b	0.56±0.05 d	0.34±0.007 c	0.13±0.008 c	24.35±0.87 b	3.33±0.64 a	0.07±0.006 b	5.00±0.40 c	3.00±0.47 b	23.42±1.22 c
SNEBIOSin	3.83±0.53 b	1.00±0.03 b	0.87±0.03 a	0.21±0.02 b	27.82±0.34 a	3.91±0.35 a	0.13±0.02 a	6.66±0.47 a	3.66±0.47 a	26.60±0.70 b
SEA	2.46±0.12 c	0.80±0.12 c	0.50±0.009 b	0.33±0.01 a	24.57±0.75 b	3.66±0.23 a	0.09±0.002 b	5.66±0.23 b	3.66±0.23 a	29.82±2.63 a
SNEA	5.46±0.19 a	0.84±0.01 c	0.59±0.12 b	0.20±0.005 b	32.90±0.59 a	4.08±0.11 a	0.11±0.02 a	6.83±0.64 a	4.08±0.11 a	47.32±2.30 a
P valor	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.089	0.000	0.000	0.003	0.000

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, de los parámetros medidos después de 45 días. PH= Peso Húmedo, PS= Peso Seco, PSR= Peso Seco Radical, PSA= Peso Seco Parte Aérea, A= Altura, D= Diámetro, DH= Diámetro de hoja, ICD= Índice de Calidad de Dickson, LR= Longitud de raíz

Dentro de los parámetros analizados para las plantas a los 45 días, con respecto a el peso húmedo de la planta, los tratamientos con mayor valor estadísticamente significativos ($P=0.000$) fueron SNEA > SES > SEBIOSin con valores de 5.46 > 5.00 > 4.56 g, y los que obtuvieron un menor peso húmedo fueron SBI > SEA > SB con 2.61 > 2.46 > 1.58 g (Tabla 13).

Así, el mayor peso seco total de la planta se presentó para los tratamientos: SEBIOSin > SESin > SNEBIOSin con valores de 1 g hasta 1.33 g, a su vez los valores con menor peso seco fueron SB y SEBIOS con 0.48 y 0.45 g, con diferencia significativa ($P=0.000$).

En el caso del peso seco radical se observó un mayor valor en los tratamientos SEBIOSin > SES > SESin > SNEBIOSin con valores de 0.87 hasta 1.08 g, a su vez, los tratamientos con menor valor se presentaron en SBI > SB > SEBIOS con valores máximos de 0.38 g, con diferencia significativa ($P=0.000$).

Podemos observar que el peso seco en la parte aérea fue mayor en el tratamiento SEA con 0.33 g, además de que no existió diferencia entre el resto de los tratamientos pues sus valores fueron de 0.26 a 0.18 g, sin embargo, el valor más bajo lo presentó SNEBIOS (0.13) g con diferencia significativa ($P=0.000$).

La mayor altura a los 45 días se registró para los tratamientos SNEA > SNESin > SBI > SESin con un rango de valores que van de 32.9 a 28.94 cm; los tratamientos más afectados que presentaron menor altura fueron SES > SEA > SNEBIOSin ligeramente arriba de 24 cm ($P=0.000$).

Con respecto al diámetro de la planta los tratamientos no fueron diferentes significativamente ($P=0.089$). Los tratamientos SNEA, SEBIOSin y SBI presentaron el máximo valor de un 4.0 mm; y el tratamiento SB presentó el menor valor de 3.00 mm.

El índice de calidad de Dickson demostró que, la calidad de la especie vegetal es mejor en los tratamientos SEBIOSin > SESin > SES, mientras que la menor calidad

se presentó para los tratamientos SEBIOS y SB con diferencia significativa ($P=0.000$).

El número de hojas mantuvo valores similares, no obstante, los tratamientos SNEA > SNEBIOSin > SBI > SESin presentaron los valores más grandes con 6.83 hasta 6.0. Sin embargo, el menor número de hojas lo presentaron los tratamientos SB, SNES, SNEBIOS pues presentaron un valor de 5.0 hojas, con diferencia significativa ($P=0.000$).

Para el diámetro de la hoja, los valores más altos los presentaron los tratamientos SEBIOSin > SNEA con más de 4 mm, mientras que el tratamiento que presentó el menor diámetro fue SB con 2.83 mm ($P=0.003$).

Las mediciones de longitud de raíz presentaron los mayores valores para SBI > SNESin > SNEA con un rango de 55.0 hasta 47.32 cm, mientras que el valor más bajo se presentó para SEBIOS con 19.95 cm, con diferencia significativa ($P=0.000$).

Tabla 14. Parámetros de crecimiento de *Zea Mays* a 90 días

Tratamiento	90 Días									
	PH (g)	PS (g)	PSR (g)	PSA (g)	A (cm)	D (mm)	ICD	Hojas	DH (mm)	LR (cm)
SB	2.96±0.06 d	0.91±0.03 d	0.46±0.02 e	0.45±0.01 c	41.83±0.65 b	2.83±0.40 d	0.05±0.01 c	8.33±0.27 c	2.94±0.07 c	32.01±1.15 c
SBI	3.27±0.17 c	1.01±0.05 c	0.50±0.02 d	0.51±0.03 b	45.81±1.34 a	3.38±0.29 b	0.06±0.006 c	9.55±0.70 a	4.48±1.05 a	42.63±2.61 b
SES	3.08±0.30 c	1.04±0.02 c	0.60±0.01 c	0.43±0.03 c	43.53±1.50 b	2.94±0.29 d	0.06±0.006 c	8.44±0.47 c	3.55±0.42 b	51.38±2.38 a
SESin	8.46±0.58 a	1.42±0.03 b	0.81±0.03 b	0.61±0.01 a	47.20±1.41 a	3.33±0.23 b	0.09±0.01 b	8.44±0.47 c	4.25±0.34 a	52.01±2.29 a
SNES	4.41±0.12 b	1.25±0.05 b	0.66±0.04 c	0.58±0.03 a	43.66±0.72 b	2.94±0.36 d	0.07±0.009 b	8.72±0.29 b	4.25±0.34 a	53.95±1.32 a
SNESin	5.25±0.28 b	1.37±0.05 b	0.72±0.02 b	0.65±0.03 a	45.55±0.98 a	3.41±0.20 b	0.09±0.009 b	10.33±0.31 a	4.50±0.54 a	56.38±2.08 a
SEBIOS	4.69±0.18 b	1.34±0.08 b	0.76±0.07 b	0.56±0.05 b	42.86±1.63 b	3.66±0.31 a	0.10±0.01 a	9.38±0.29 a	4.11±0.48 a	45.28±2.81 b
SEBIOSin	5.61±0.60 b	1.74±0.09 a	1.17±0.10 a	0.58±0.05 a	47.03±1.57 a	3.88±0.44 a	0.13±0.01 a	10.50±0.40 a	4.44±0.29 a	56.81±2.92 a
SNEBIOS	4.41±0.18 b	1.19±0.11 b	0.53±0.04 d	0.66±0.06 a	48.19±1.51 a	3.16±0.23 c	0.07±0.009 b	8.22±0.70 c	4.25±0.30 a	35.13±1.03 c
SNEBIOSin	7.84±0.29 a	1.33±0.06 b	0.73±0.04 b	0.60±0.02 a	45.33±1.04 a	3.44±0.37 b	0.08±0.008 b	9.33±0.74 a	4.36±0.35 a	35.25±0.47 c
SEA	4.19±0.23 b	1.02±0.01 c	0.40±0.01 e	0.47±0.01 c	32.20±1.06 c	3.27±0.21 c	0.07±0.004 b	8.22±0.47 c	3.83±0.60 b	37.91±1.61 c
SNEA	4.50±0.14 b	1.02±0.05 c	0.45±0.02 e	0.56±0.03 b	47.80±2.06 a	3.42±0.30 b	0.06±0.006 c	9.61±0.45 a	3.88±0.62 b	59.42±4.63 a
P valor	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.014	0.000

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p < 0.05$, de los parámetros medidos después de 90 días. PH= Peso Húmedo, PS= Peso Seco, PSR= Peso Seco Radical, PSA= Peso Seco Parte Aérea, A= Altura, D= Diámetro, DH= Diámetro de hoja, ICD= Índice de Calidad de Dickson, LR= Longitud de raíz

A los 90 días, el mayor peso húmedo se encontró en los tratamientos SESin y SNEBIOSin, con valores de 8.46 y 7.84 g, mientras que los pesos húmedos más bajos se encontraron en SBI > SES > SB con 3.27, 3.08 y 2.96 g respectivamente ($P=0.000$).

El resultado más alto para peso seco total de la planta fue para el tratamiento SEBIOSin (1.74 g), mientras que el tratamiento con el peso más bajo fue SB (0.91 g) ($P=0.000$).

El mayor valor significativo ($P=0.000$) para peso seco radical lo presentó SEBIOSin con 1.17 g, los tratamientos con menor producción radicular fueron los tratamientos SB > SNEA > SEA con valores alrededor de 0.40 g.

El peso seco aéreo presentó los valores más altos en los tratamientos SNEBIOS > SNESin > SESin > SNEBIOSin con un intervalo de valores de 0.66 a 0.60 g, mientras que los tratamientos SEA > SB > SES presentaron los valores más bajos en producción aérea de 0.47 hasta 0.43 g ($P=0.000$).

La altura analizada a los 90 días nos mostró que los tratamientos con mayor producción de parte aérea significativa ($P=0.000$) fueron SNEBIOS > SNEA > SESin > SEBIOSin con valores de 48.19 hasta 47.03 cm, mientras que el tratamiento con menor altura fue SEA con 32.2 cm.

Los valores del diámetro de la planta fueron mayores para SEBIOSin y SEBIOS con 3.88 y 3.66 mm, los menores diámetros se presentaron para los tratamientos SNES = SES > SB a 2.94 y 2.83 mm, con diferencia significativa ($P=0.000$).

El índice de calidad de Dickson demostró fue en los tratamientos SEBIOSin y SEBIOS con valores de 0.13 y 0.10 respectivamente, mientras que la menor calidad se presentó para los tratamientos SNEA = SES = SBI > SB a 0.06 y 0.05 ($P=0.000$).

Los tratamientos SEBIOSin y SNESin presentaron el número de hojas más altos significativos ($P=0.000$) con valores 10.50 y 10.33, y los tratamientos SEA y SNEBIOSin (8.22) fueron los más bajos en la producción del número de hojas.

Los mayores valores para el diámetro de hoja se encontraron para SNESin > SBI > SEBIOSin con valores de 4.50 mm > 4.48 mm > 4.44 mm, y el menor fue para SB con un valor de 2.94 mm ($P=0.014$).

En cuanto a la longitud radical los valores más bajos fueron para los tratamientos SNEBIOSin > SNEBIOS > SB (35.25 cm > 35.13 cm > 32.01 cm respectivamente) (Imagen 11); los valores más altos se presentaron en el intervalo de 59.42 cm a 56.38 cm para los tratamientos SNEA > SEBIOSin > SNESin (Imágenes 12 y 13) ($P=0.000$).

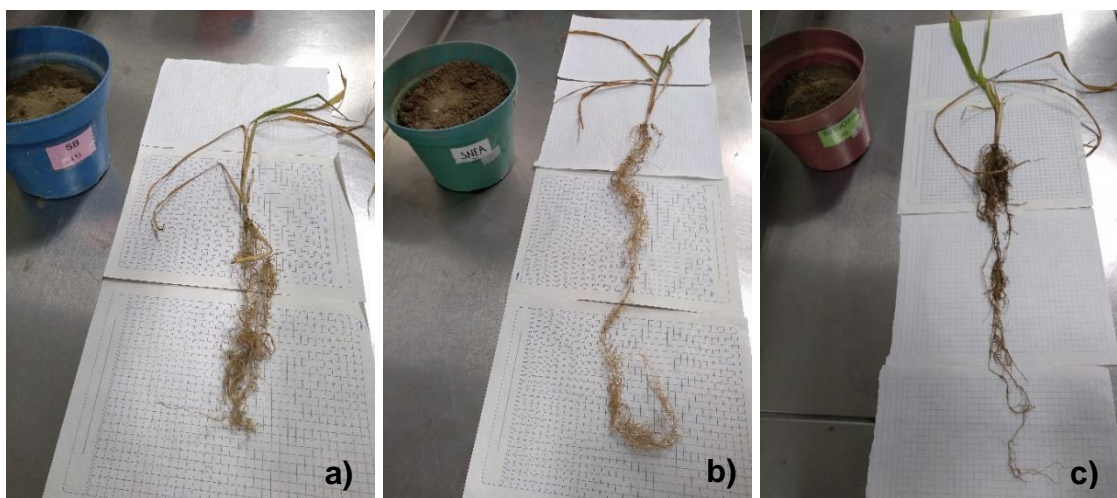
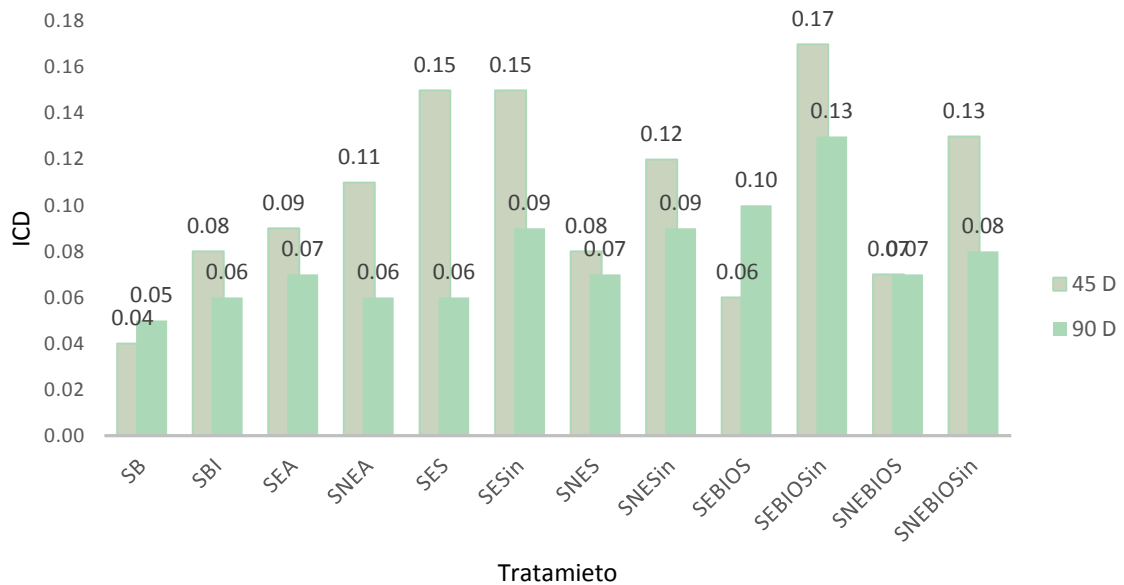


Imagen 11. a) Longitud de raíz en SB, b) Longitud de raíz en SNEA, c) Longitud de raíz en SEBIOSin

7.2.1 Comparación de la calidad de la planta a 45 y 90 días

El ICD nos proporciona información sobre el estado de la planta de acuerdo al tiempo de exposición del contaminante, y observamos en la Gráfica 5 la comparación del estado de la planta a los 45 y 90 días.

Gráfica 5. Comparación de ICD a 45 y 90 días



Para los valores del Índice de Calidad de Dickson se observó una disminución a los 90 días en comparación con lo registrado a los 45 días, lo cual demostró que la calidad de la especie vegetal se ve afectada por la presencia del contaminante (diésel) y el tiempo a la que está expuesta. Siendo el tratamiento SEBIOSin con mayores valores de ICD a los 45 y 90 días, por lo que la aplicación del consorcio bacteriano en suelo e inoculado con la planta favoreció su desarrollo en un ambiente contaminado con diésel.

7.3 Degradación de diésel

Durante la rizorremediación a los 45 días, en todos los tratamientos se observaron porcentajes de degradación similares en el rango de 30.51 - 39.68%, con la excepción del tratamiento SEA (28.15%); y una concentración de diésel residual de 6404.36 - 7629.32 mg/kg. Los porcentajes mayores de degradación fueron para los tratamientos SESin, y SNEA con 38.14% y 39.68% ($P= 0.001$) y de 6567.82 y 6404.36 mg/kg de diésel residual respectivamente ($P= 0.000$) (Tabla 15).

Se obtuvo mayor degradación a los 90 días en comparación a los 45 días. Los tratamientos SEA, SESin y SNES presentaron porcentajes de degradación de 35.86%, 38.64% y 39.15% respectivamente, y 6810.64, 6514.75 y 6460.74 mg/kg de diésel residual. El resto de los tratamientos (SEBIOS, SNEA, SNESin, SNEBIOS, SEBIOSin y SNEBIOSin) van de un 40.62 - 46.30%, y una concentración de diésel residual de 6304.24 a 5701.21 mg/kg. Los testigos SE ST y SNE ST mostraron porcentajes de degradación de 11.62% y 12.32% respectivamente y una concentración de diésel residual de 9384.25 y 9292.61 mg/kg. SEBIO y SNEBIO presentaron 41.62% y 43.45% de degradación y 6163.49 y 6003.86 mg/kg de diésel residual (Tabla 15).

Los porcentajes de degradación fueron más altos en los tratamientos con suelo no tinalizado en comparación a los tinalizados; aunado a que los tratamientos con bioaumentación y semillas inoculadas presentaron un mayor porcentaje de degradación; por lo tanto, se demostró que el tratamiento SNEBIOSin (46.3% de degradación de diésel) se posicionó como el mejor tratamiento para la rizorremediación, seguido de SEBIOSin, SNEBIOS y SNEBIO ST. Por lo que la bioaumentación y la interacción de planta-microorganismo favoreció la rizorremediación de suelo agrícola contaminado con diésel.

Tabla 15. Degradación y concentración de diésel residual a 45 y 90 días

Tratamiento	45 Días		90 Días	
	Degradación %	[Diésel] mg/kg	Degradación %	[Diésel] mg/kg
SE ST	10.61± 0.76 c	11887.71±1313.49 a	11.62±0.21 a	9384.25± 22.70 c
SNE ST	11.82± 0.81 c	11872.35± 767.75 a	12.32±0.15 a	9292.61± 16.88 c
SEBIO ST	30.63± 0.86 a	13738.96±1832.58 a	41.62±0.11 b	6163.49± 57.66 a
SNEBIO ST	32.92± 0.84 a	14169.05±1186.96 a	43.45±0.30 c	6003.86± 31.96 a
SES	31.64±11.13 a	7258.16±1182.06 b	32.55±3.16 b	7161.86±335.91 b
SESin	38.14± 5.76 a	6567.82± 612.48 c	38.64±2.82 b	6514.75±299.59 b
SNES	31.35± 6.10 a	7289.51± 648.73 b	39.15±1.83 b	6460.74±195.15 b
SNESin	35.51± 2.25 a	6847.83± 293.28 c	41.43±5.36 b	6218.54±569.18 a
SEBIOS	31.72±13.12 a	72.50.02±1393.21 b	40.62±2.51 b	6304.24±267.39 a
SEBIOSin	25.49± 1.25 b	7911.70±1393.21 b	44.06±1.03 c	5939.08±109.63 a
SNEBIOS	30.51± 1.46 a	7378.73± 155.99 b	43.45±5.24 c	6004.19±557.20 a
SNEBIOSin	34.80± 9.99 a	6922.91±1060.95 c	46.30±2.91 d	5701.21±309.81 a
SEA	28.15± 3.18 b	7629.32± 337.87 b	35.86±1.93 b	6810.64±205.43 b
SNEA	39.68± 1.74 a	6404.36± 185.12 c	40.72±1.08 b	6294.43±114.96 a
P valor	0.001	0.000	0.000	0.000

*Letras minúsculas diferentes en la misma fila indican diferencia mínima significativa con un valor de $p \leq 0.05$, de la concentración de diésel a los 45 y 90 días.

8. DISCUSIÓN

El proceso de rizorremediación es eficiente cuando se aumenta la degradación de hidrocarburos de petróleo debido a la acción conjunta de los microorganismos presentes en la rizósfera de la planta (Wojtera-Kwiczor y col., 2014). En este estudio se realizaron ensayos de cinética de germinación para elegir a la planta idónea en el proceso de rizorremediación de suelos contaminados con diésel. Para lo que, *Zea Mays* presentó el mayor porcentaje de germinación (98%) inoculada con el consorcio bacteriano (Tabla 9); y en los tratamientos con diésel se vieron afectados negativamente de forma significativa ($P=0.000$) y aumentó el grado de afectación a altas concentraciones de diésel (10 mg/kg). En estudios similares, Méndez-Natera y col. (2004) reportaron que los mayores porcentajes de germinación de maíz fueron a concentraciones de 3 % de petróleo crudo, y disminuyó la germinación con el 6 y 9 % del contaminante. Aunado a esto, Marín-Velásquez (2016) concluyó que la germinación de las semillas de maíz se ve afectada de forma directa por la concentración de petróleo utilizado en el suelo, es decir, a mayor concentración de petróleo menor fue el porcentaje de germinación.

Se utilizó un consorcio microbiano tanto para la inoculación de semillas como para la bioaumentación en suelo de acuerdo con lo reportado por Guevara-Avenidaño (2019), quien determinó que la inoculación con el consorcio bacteriano en suelos agrícolas contaminados con diésel presentó un efecto sinérgico al aumentar la degradación en el intervalo de 9.7 a 34.2 % con respecto a los monocultivos inoculados. Al final del experimento, el consorcio presentó una población de $7.41 \log \text{Ufc g}_{\text{ss}}^{-1}$ en suelos de diferente origen, lo que representó el éxito de su sobrevivencia en sistemas contaminados con diésel. Como puede observarse en las Tablas 13 y 14, los tratamientos con mejor desarrollo de planta fueron aquellos con presencia de bioaumentación con el consorcio bacteriano y la semilla inoculada con el consorcio microbiano. Las variables fisiológicas de respuesta fueron mayores para peso húmedo, peso seco, peso seco radicular, peso seco aéreo, ICD, altura y longitud de raíz en comparación a los testigos y los blancos, gracias a la interacción planta-microorganismo, y su efecto como bacterias promotoras de crecimiento

vegetal; debido a que el consorcio bacteriano está compuesto por las cepas bacterianas *Azospirillum brasilense* A5, *Bacillus pumilus* 1b y *Pseudomona aeruginosa* 15a.

Sánchez-López, y col., (2012) analizaron la inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate llegando a la conclusión de que los resultados en altura de la planta mostraron incrementos de hasta dos veces en los tratamientos con *Enterobacter* sp. y *Bacillus* sp. en el segundo mes de muestreo. Para el tercer mes, la bacteria que mostró el mayor efecto fue *Pseudomonas putida*, la cual fue casi tres veces mayor con respecto al testigo. En cuanto a la biomasa radical, las cepas *Enterobacter* sp. y *P. putida* mostraron los mejores resultados presentando diferencias estadísticamente significativas respecto al control. El aumento de la biomasa radical tiene fuertes repercusiones en la capacidad de las plantas para asimilar los nutrientes del suelo puesto que representa una mayor exploración del suelo por parte de éstas (Antoun y Prevost, 2005).

En cuando al género *Azospirillum*, García-Olivares, y col. (2012) tras haber estudiado el efecto de *A. brasilense* en el rendimiento del maíz, demostraron que el rendimiento del grano con la bacteria fue 15% mayor que el testigo. Los efectos positivos de *A. brasilense* se han atribuido principalmente el mejoramiento en el desarrollo de la raíz y el incremento subsecuente de la tasa de asimilación de agua y la utilización de minerales del suelo por la planta (Bashan, y col. , 2004).

En este estudio la concentración inicial del diésel fue de 10 500 mg/kg en el suelo, misma que no presentó un problema para la emergencia, crecimiento y desarrollo adecuado de la planta, lo cual puede compararse con lo reportado por Quiñones-Aguilar y col. (2003), donde se analizó la emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo; y concluyeron que la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ de petróleo en el suelo permitió un adecuado crecimiento y desarrollo, con base en emergencia, altura de planta, longitud de raíz, peso secos de follaje, peso seco de raíz y peso seco total.

Sin embargo, la calidad de las plantas se vio afectada con el paso del tiempo debido a la presencia del diésel, ya que los hidrocarburos del petróleo tienen efectos negativos en las plantas al reducir su crecimiento, longitud radical, biomasa, y en algunos casos provoca su muerte (Díaz-Martínez y col., 2013).

Por otro lado, el ICD indica la potencialidad de una plántula para sobrevivir y crecer en ciertas condiciones; así, plántulas con mayor calidad tienen índices de calidad más altos (Paris y col., 2011). La previa inoculación de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal dió lugar a una mejora en el ICD en presencia de diésel (Díaz-Martínez y col., 2013). Los valores del ICD obtenidos en este trabajo (Tablas 13 y 14) son similares a lo reportado para *Cedrela lilloi* C.DC. con valores de ICD en un rango de 0.16-0.02 (Rada-Lllochla, 2014).

En la Tabla 15 se observó que el tratamiento con mayor porcentaje de remoción de diésel fue SNEBIOSin (46.3%), seguido de SEBIOSin (44.06%), SNEBIOS (43.45%) y SNEBIO ST (43.45%), coincidiendo con Wojtera-Kwiczor y col. (2014) que durante la rizorremediación con dos variedades de colza en un suelo contaminado con diésel, concluyó que las plantas inoculadas con el consorcio pudieron eliminar del 75 al 85% del diésel después de ocho semanas; y todos los tratamientos con plantas fueron más exitosos que los tratamientos únicamente bioaumentados (41%). Aunado a lo concluido por Rivera-Ortiz y col. (2018) que durante la bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos, observaron que la disminución de los hidrocarburos hasta niveles cercanos a los aceptables (3586 mg/kg) ocurrió durante los primeros seis meses en las mezclas adicionadas con los nutrientes N y P, lo que significa que la actividad de los microorganismos que descomponen los hidrocarburos se incrementó con la adición de nutrientes.

Finalmente, en este experimento se utilizó sustrato post cosecha de *Pleurotus ostreus* que ha sido reportado que mejora la textura de suelos contaminados con diésel, y es fuente de nutrientes, microorganismos y enzimas para procesos de biorremediación de suelos agrícolas contaminados con diésel (Mauricio-Gutiérrez y

col., 2014). Además, Guevara-Avenidaño (2019) demostró que los tratamientos con sustrato post cosecha de *Pleurotus ostreus* mostraron mayor biodegradación (54.06%) de diésel en suelos agrícolas. El género *Pleurotus* ha sido ampliamente estudiado para la biorremediación de xenobióticos, su capacidad biorremediadora se debe a las enzimas que contiene, además de generar un efecto bioestimulador que provee de nutrientes a la microbiota (Valencia-Luna, 2020). García-Delgado (2015), concluyó que los residuos post cultivo de setas, tienen la capacidad de degradar PHA's por las enzimas lacasas y peroxidasas.

9. CONCLUSIONES

Zea Mays inoculado con el consorcio bacteriano en comparación con *Helianthus annuus*, *Tithonia tubiformis*, y *Arabidopsis thaliana* presentó una mayor capacidad y menor tiempo de germinación en presencia de diésel a 5 y 10 ppm, debido a la interacción positiva planta-bacteria y su efecto de promotor de crecimiento vegetal.

La calidad de la especie vegetal (ICD), se ve afectada negativamente con relación al tiempo de exposición al diésel durante la rizorremediación de suelos agrícolas.

El peso seco radical es más abundante en tratamientos con semilla inoculada, por el efecto promotor de crecimiento vegetal, lo que da lugar a una mayor superficie de contacto con el contaminante.

Los tratamientos con bioaumentación y semillas inoculadas presentaron un mayor porcentaje de degradación debido a la interacción planta-bacteria, efecto de la rizorremediación.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirrezábal, L., Orrioll, G., Hernández, L., Pereyra, V., & Mirayé, J. P. (Octubre de 2001). *Girasol, aspectos fisiológicos que determinan el rendimiento*. Recuperado el Marzo de 2019, de Unidad Integrada Balcarce: https://www.researchgate.net/profile/Luis_Hernandez25/publication/323970896_Girasol_Aspectos_fisiologicos_que_determinan_el_rendimiento/links/5ab563a645851515f59a76c7/Girasol-Aspectos-fisiologicos-que-determinan-el-rendimiento.pdf
- Alkio, M., Tabuchi, T., Wang, X., & Colón-Carmona, A. (2005). Stress responses to polycyclic aromatic hydrocarbons in Arabidopsis include growth inhibition and hypersensitive response-like symptoms. *Journal of Experimental Botany*, 2983–2994. Recuperado el Marzo de 2019
- Anaya, L. (17 de Octubre de 2018). *Accidentes debido a tomas clandestinas en ductos de PEMEX*. Recuperado el Febrero de 2019, de ERN: https://ern.com.mx/boletines/ERNterate_Nota_Accidentes_Debido_a_Tomas_Clandestinas_en_Ductos.pdf
- Antoun, H., & Prevost, D. (2005). Ecology of plant growth promoting rhizobacteria. *PGPR: Biocontrol and Biofertilization*. Springer, 1-38. Recuperado el Mayo de 2020
- ATSDR. (s.f.). *Chemical and physical information*. Recuperado el Noviembre de 2019, de FUEL OILS: <https://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp75-c3.pdf>
- Bashan, Y., & Levanony, H. (1990). Current status of Azospirillum inoculation technology: Azospirillum as a challenge for agriculture. *Canadian Journal of Microbiology*, 591–608. Recuperado el Febrero de 2020
- Bashan, Y., Holguin, G., & De-Bashan, L. E. (2004). Azospirillum-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances. *Canadian journal of microbiology*, 521-577. Recuperado el Mayo de 2020
- Caballero, M. (2001). *El género Azospirillum*. Obtenido de Universidad Nacional Autónoma de México: <http://biblioweb.dgsca.unam.mx/libros/microbios>.
- Calisaya-Calderón, J. M. (2017). Aislamiento y caracterización molecular del ARNr 16S de una cepa bacteriana degradadora de cianuro de la Planta de Tratamiento de Aguas Residuales de Magollo, Tacna - Perú. *Tesis de grado*. Universidad nacional Jorge Basadre Grohmann-Tacna .
- Carpena, R., & Bernal, P. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*. Recuperado el Febrero de 2019

- Comisión europea. (Noviembre de 2015). *Decisión (UE) 2015/2099 de la comisión*. Recuperado el Marzo de 2019, de <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/?uri=CELEX:32015D2099>
- Corrales-Ramirez,, L. C., Sánchez-Leal, L. C., Arévalo-Galvez, Z. Y., & Moreno-Burbano, V. E. (2014). Bacillus: género bacteriano que demuestra ser un importante solubilizador de fosfato. *NOVA*, 165-178. Recuperado el Marzo de 2020
- De la Fe-Pérez, Y., Díaz-De la Osa, A., Restrepo-Franco, G. M., Diván-Baldani, V. L., & Hernández-Rodríguez, A. (2015). *Diversidad de bacterias diazotróficas asociativas potencialmente eficientes en cultivos de importancia económica*. Recuperado el Enero de 2020, de Revista Cubana de Ciencias Biológicas: <http://www.rccb.uh.cu/index.php/RCCB/article/view/85/165>
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., & Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 597- 612. Recuperado el Noviembre de 2019
- Díaz-Martínez, M. E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz- Suarez, J. J., & García-Barradas, O. (2013). Crecimiento de Casuarina equisetifolia (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Revista de Biología Tropical*, 1039-1052. Recuperado el Mayo de 2020
- Ezeonu, C., Onwurah, I., & Oje, O. (2012). Comprehensive Perspectives in Bioremediation of Crude Oil Contaminated Environments. *INTECH*. Recuperado el Febrero de 2019
- FAO. (s.f.). *Evaluación de la calidad de la semilla*. Obtenido de FAO: <http://www.fao.org/3/Q2180S/Q2180S12.htm#:~:text=La%20capacidad%20de%20germinación%20es,la%20prueba%2C%20expresadas%20en%20porcentajes>.
- García, F. O. (31 de Julio de 2008). *IPNI*. Recuperado el Marzo de 2019, de Criterios para el manejo de la fertilización del cultivo de maíz: [http://lacs.ipni.net/0/D9BF96476AFF3A3F8525797D005FC570/\\$FILE/FGarcia-Maiz%202008.pdf](http://lacs.ipni.net/0/D9BF96476AFF3A3F8525797D005FC570/$FILE/FGarcia-Maiz%202008.pdf)
- García-Delgado, C. (2015). *Bioremediation of contaminated soils with polycyclic aromatic hydrocarbons using spent mushroom substrate (Agaricus bisporus)*. Recuperado el Abril de 2020, de Universidad Autónoma de Madrid. España.
- García-Olivares, J. G., Mendoza-Herrera, A., & Mayek-Pér, N. (2012). Efecto de Azospirillum brasilense en el rendimiento del maíz en el norte de Tamaulipas, México. *Universidad y ciencia*, 79-84. Recuperado el Mayo de 2020

- Germida, J. J., Frick, C. M., & Farrel, R. E. (2002). Phytoremediation of oil-contaminated soils. *Soil Mineral-Organic Matter-Microorganism Interactions and Ecosystem Health*, 169-186. Recuperado el Noviembre de 2019
- Golovleva, L. A., Aharonson, N., Greenhalgh, R., Sethunathian, N., & Vonk, J. W. (1990). The role and limitations of microorganisms, in the conversion of xenobiotics (IUPAC reports on pesticides no. 27). *Pure and Applied Chemistry*, 351-364.
- Guevara-Avenidaño, R. (2019). *Evaluación de la biorremediación de diésel a nivel microcosmos*. Puebla: Tesis de grado. Recuperado el Diciembre de 2019
- Günter, T., Dornberger, U., & Fritsche, W. (1996). Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 203-215. Recuperado el Noviembre de 2019
- Gutiérrez-Luna, F. M., López-Bucio, J., Altamirano-Hernández, J., Valencia-Cantero, E., Reyes-De la Cruz, H., & Macías-Rodríguez. (2010). "Plant growth-promoting rhizobacteria modulate root-system architecture in *Arabidopsis thaliana* through volatile organic compound emission. *Symbiosis*, 75-83. Recuperado el Marzo de 2020
- Hernández-A, E., & Rubiños-P, J. E. (2004). *Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: Conceptos Básicos*. Estado de México: Publicaciones Diamante. Recuperado el Noviembre de 2019
- Loredo-Osti, C., López-Reyes, L., & Espinosa-Victoria, D. (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Terra Latinoamericana*, 225-239. Recuperado el Noviembre de 2019
- Luque, J. L. (2009). *Desempeño de cuatro especies vegetales para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos en Patagonia*. Buenos Aires, Argentina: CONEAU. Recuperado el Febrero de 2018
- Marín-Velásquez, T. D. (2016). Crecimiento de plantas de maíz (*Zea mays*) en un suelo contaminado con petróleo y remediado con extracto de cáscaras de naranja (*Citrus sinensis*). *Enfoque UTE*, 1-13. Recuperado el Mayo de 2020
- Martín, I. (Octubre de 2004). *Riesgo sanitario por presencia de *Pseudomonas aeruginosa* en el agua para consumo*. Obtenido de Universidad Nacional de General Sarmiento: http://observatorioconurbano.ungs.edu.ar/Tesis%20de%20ecologia/2004_IreneMartin.pdf
- Mauricio-Gutiérrez, A., Cavazos-Arroyo, J., & Pérez-Armendáriz, B. (2014). Afectaciones y consecuencias de los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas de Acatzingo, Puebla, México. *Agricultura, sociedad y desarrollo*,

539-550. Recuperado el Febrero de 2019, de AGRICULTURA, SOCIEDAD Y DESARROLLO.

- Mauricio-Gutiérrez, A., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., Cavazos-Arroyo, J., & Pérez-Armendáriz, B. (2014). Biodegradation of hydrocarbons exploiting spent substrate from *Pleurotus ostreatus* in agricultural soils. *African Journal of Biotechnology*, 3385-3393. Recuperado el 2020
- Meagher, R. B. (2000). Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants. *Current Opinion in Plant Biology*, 153–162. Recuperado el Noviembre de 2019, de Phytoremediation of toxic elemental and organic pollutants.
- Méndez-Natera, J. R., Roque, C., Zapata, K., & Otahola-Gómez, V. A. (2004). Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *ResearchGate*, 67-71. Recuperado el Abril de 2020
- Ministerio de la presidencia. (Enero de 2005). *Real Decreto 9/2005*. Recuperado el Marzo de 2019, de Noticias Jurídicas: http://noticias.juridicas.com/base_datos/Admin/rd9-2005.html
- Ministerio del ambiente. (2017). *Resolución ministerial n°182-2017*. Recuperado el Marzo de 2019, de minam.gob.pe: http://www.minam.gob.pe/wp-content/uploads/2017/07/Res_182-2017-MINAM.pdf
- Monroy, J. (21 de Enero de 2019). Hidalgo y Puebla tienen el mayor número de tomas clandestinas: Pemex. *El Economista*. Recuperado el Febrero de 2019
- Muñoz, L., Névaros, G., Ballinas, M., & Peralta, M. (2010). Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología*. Recuperado el Febrero de 2019
- Muratova, A. Y., Turkovskaya, O. V., Antonyuk, L. P., Makarov, O. E., Pozdnyakova, L. I., & Ignatov, I. I. (2005). Oil-oxidizing potential of associative rhizobacteria of the genus *Azospirillum*. *Microbiology*, 210-215. Recuperado el Marzo de 2020
- Paris, C. I., Llusia, J., & Penuelas, J. (2011). Indirect effects of tending ants on holm oak volatiles and acorn quality. *Resultados de búsqueda*, 547-550. Recuperado el Mayo de 2020
- Parra, Y., & Cuevas, F. (2002). Potencialidades de *Azospirillum* como inoculante para la agricultura. *Cultivos Tropicales*, 31-41.
- PEMEX. (20 de Diciembre de 2018). *Reporte de tomas clandestinas en 2018*. Recuperado el Febrero de 2019, de PEMEX: http://www.pemex.com/acerca/informes_publicaciones/Paginas/tomas-clandestinas.aspx

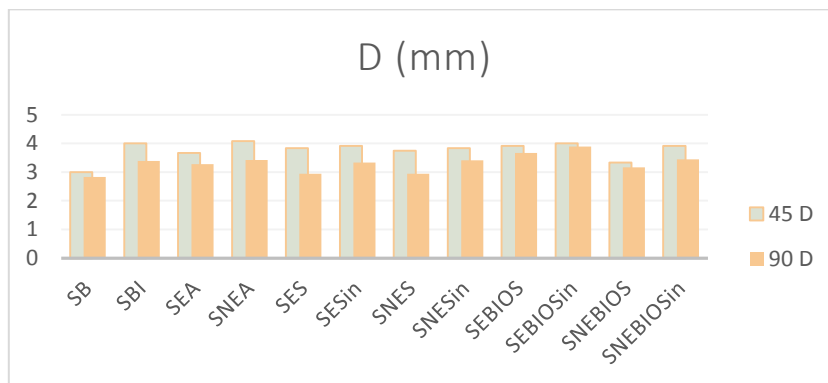
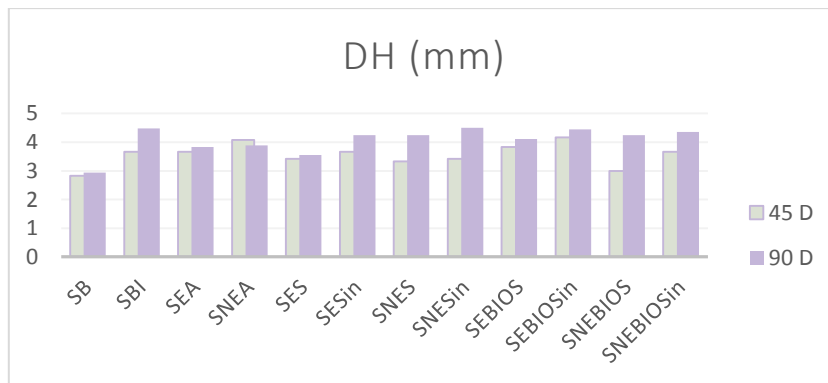
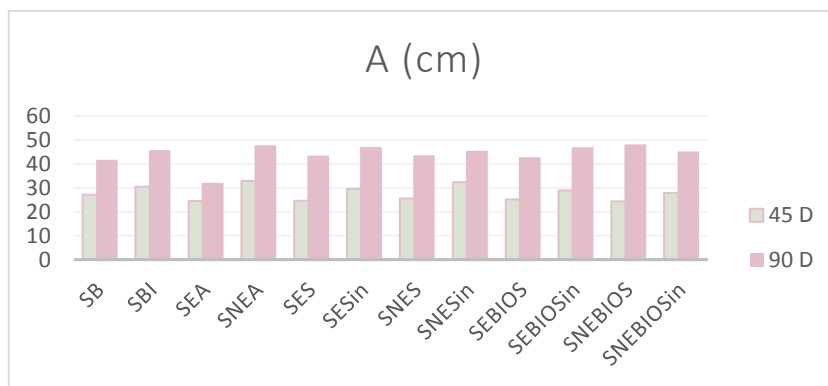
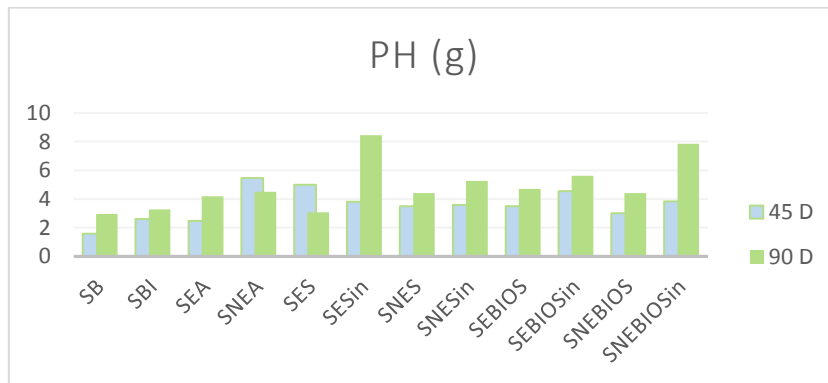
- PEMEX. (2019). *Reporte de resultados preliminares de PEMEX al 31 de diciembre de 2018*. Recuperado el Febrero de 2019, de PEMEX: <http://www.pemex.com/ri/finanzas/Reporte%20de%20Resultados%20no%20Dictaminados/Anexos%204T18.pdf>
- Peralta-Pérez, M., & Volke-Sepúlveda, T. L. (2012). La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 75-88.
- Presidencia de la república. (S.F.). *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados*. Recuperado el Marzo de 2019, de <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu112181.pdf>
- Quiñones-Aguilar, E. E., Ferrera-Cerrat, R., Gavi-Reyes, F., Fernández-Linares, L., Rodríguez-Vázquez, R., & Alarcón, A. (2003). Emergencia y crecimiento de Maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*, 585-594. Recuperado el 2019
- Quiroga, A., & Alejandra, L. (2016). *Análisis comparativo de la eficiencia de productos para la biorremediación de suelos contaminados con diesel (UN 1202) utilizando métodos de bioestimulación y bioaumentación a escala piloto*. Recuperado el Noviembre de 2019, de Universidad de La Salle: https://ciencia.lasalle.edu.co/cgi/viewcontent.cgi?article=1020&context=ing_ambiental_sanitaria
- Rada-Llloch, I. (2014). *Efecto del sustrato y tipo de envase en la calidad de plantas de Cedro Lila (Cedra lilloi C. DC) en vivero*. Recuperado el Mayo de 2020, de <http://repositorio.unas.edu.pe/bitstream/handle/UNAS/608/T.FRS-210.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Ranal, M. A., & García de Santana, D. (2006). How and why to measure the germination process? *Brasil*, 1-11. Recuperado el 2019 de Diciembre
- Ríos-Vázquez, R. R. (2005). *Estudio de la estimulación biológica para el tratamiento de residuos de perforación petrolera empleando lisímetrosPETROLERA EMPLEANDO LISÍMETROS*. Recuperado el Noviembre de 2019, de Universidad Autónoma Metropolitana.: <http://148.206.53.84/tesiuami/UAMI12129.pdf>
- Rivera-Ortiz, P., Rivera-Lárraga, J. E., Andrade-Limas, E., Heyer-Rodríguez, L., De la Garza-Requena, F. R., & Castro-Meza, B. I. (2018). Bioestimulación y biorremediación de recortes de perforación contaminados con hidrocarburos. *Revista internacional de contaminación ambiental*.
- Rojas-Solís, D., Contreras-Pérez, M., & Santoyo, G. (2013). Mecanismos de estimulación del crecimiento vegetal en bacterias del género Bacillus. *Biológicas*, 36-41. Recuperado el Marzo de 2020

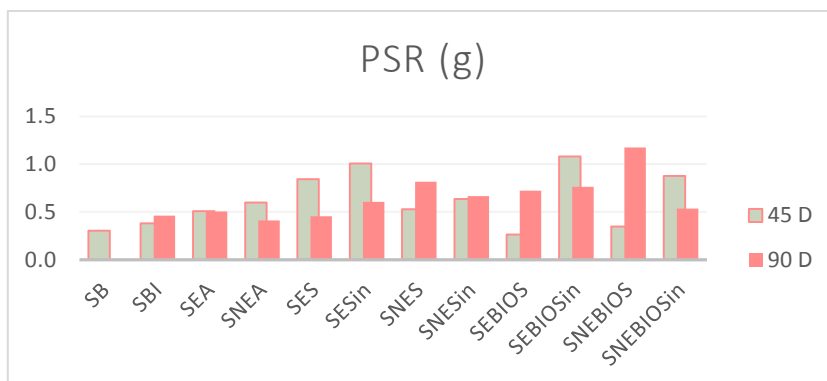
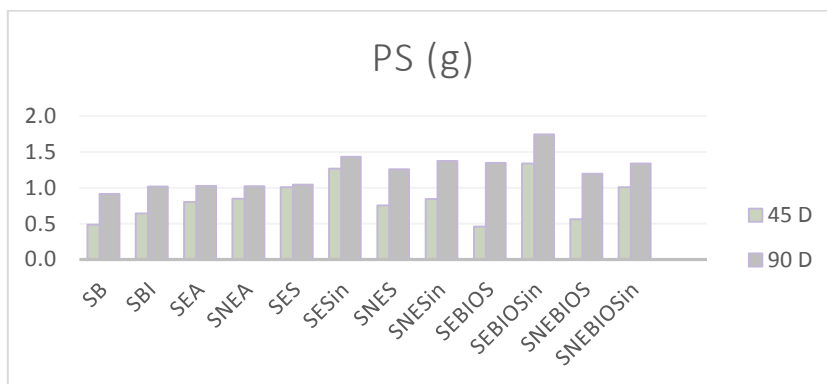
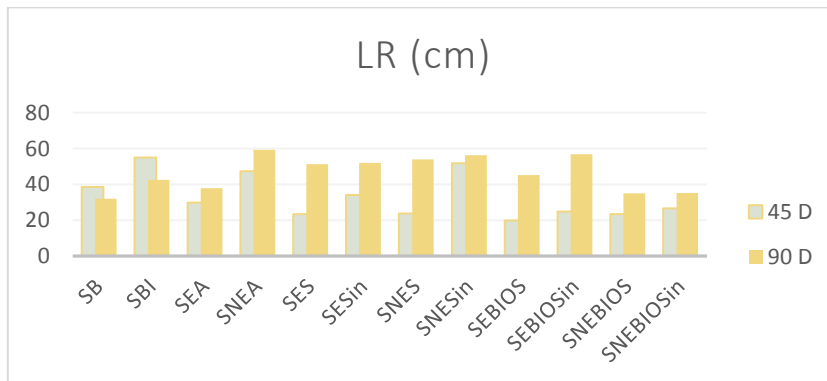
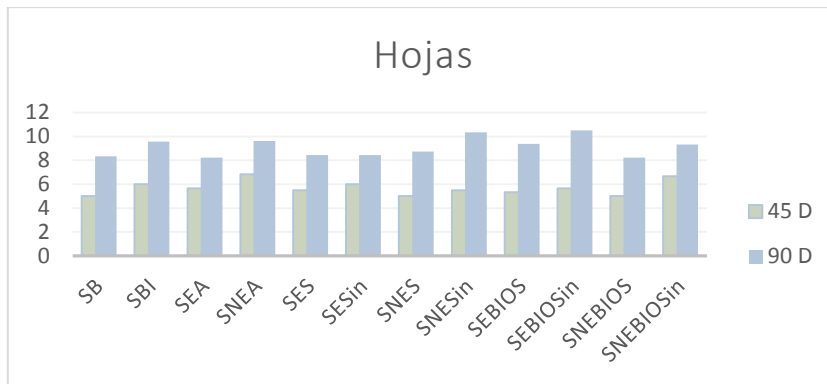
- Sánchez-López, D. B., Gómez-Vargas, R. M., Garrido-Rubiano, M. F., & Bonilla-Buitrago, R. R. (2012). Inoculación con bacterias promotoras de crecimiento vegetal en tomate bajo condiciones de invernadero. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 1401-1415. Recuperado el Mayo de 2020
- Sanchez-Varguez, K. (2018). *Evaluación de cultivos mixtos bacterianos para la biorremediación de suelos contaminados con diésel*. Recuperado el 2019
- SEMARNAT. (Septiembre de 2013). *Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación*. Recuperado el Marzo de 2019, de http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5313544&fecha=10/09/2013
- Tapia-Núñez, L. (4 de Noviembre de 2015). *Norma de calidad ambiental del recurso suelo y criterios de remediación para suelos contaminados (Anexo 2, Libro VI de la Calidad Ambiental, del Texto Unificado de la Legislación Secundaria del Ministerio del Ambiente)*. Recuperado el Marzo de 2019, de FAO: <http://extwprlegs1.fao.org/docs/pdf/ecu155129.pdf>
- Tejera-Hernández, B., Rojas-Badía, M. M., & Heydrich-Pérez, M. (2011). Potencialidades del género Bacillus en la promoción del crecimiento vegetal y el control biológico de hongos fitopatógenos. *CENIC Ciencias Biológicas*, 131-138. Recuperado el Marzo de 2020
- Torres-Rodríguez, D. (2003). El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*, XII, 1-5. Recuperado el Febrero de 2020
- Travaglia, C., Masciarelli, O., Fortuna, J., Marchetti, G., Cardozo, P., & Lucero, M. (2015). Towards sustainable maize production: Glyphosate detoxification by Azospirillum sp. and Pseudomonas sp. *Crop Protection*, 102-109. Recuperado el Febrero de 2020
- Valencia-Luna, G. A. (Enero de 2020). Biorremediación como tecnología agroecológica para la utilización de suelos contaminados con hidrocarburos y la producción de Gypsophila paniculata en invernadero. *Tesis de maestría*. Recuperado el 2020
- Vangronsveld, J., Herzig, R., Weyens, N., Boulet, J., Adriaensen, K., Ruttens, A., . . . Mench, M. (2009). Phytoremediation of contaminated soils and groundwater: lessons from the field. *Environmental Science and Pollution Research* 16, 765-794.
- Wojtera-Kwiczor, J., Żukowska, W., Graj, W., Małecka, A., Piechalak, A., & Ciszewska, L. (2014). Rhizoremediation of Diesel-Contaminated Soil with

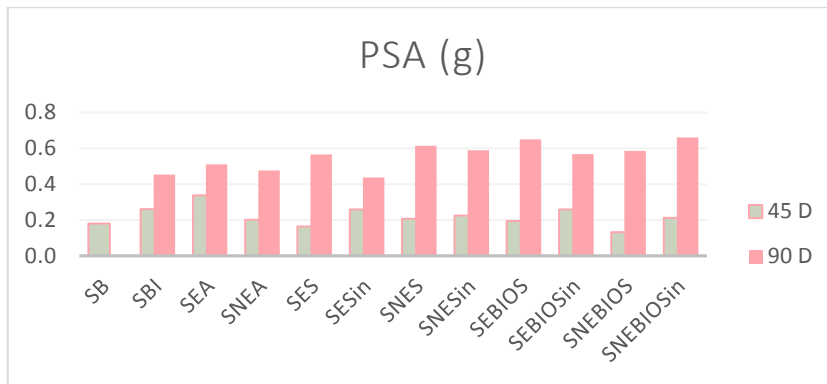
Two Rapeseed Varieties and Petroleum degraders Reveals Different Responses of the Plant Defense Mechanisms. *International Journal of Phytoremediation*, 770-789.

ANEXOS

Anexo 1. Comparación de parámetros de crecimiento a 45 y 90 días







Anexo 2. Cinética de germinación para *Arabidopsis Thaliana*



Anexo 3. Montaje experimento de rizorremediación



Anexo 4. Análisis de parámetros 45 días



Anexo 5. Análisis de parámetros 90 días

