



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE INGENIERÍA QUÍMICA
COLEGIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL

LABORATORIO DE MICROBIOLOGÍA DE SUELOS

“DR. JESUS CABALLERO MELLADO”

CENTRO DE INVESTIGACIÓN DE CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

FITORREMEDIACIÓN DE SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO CON DIÉSEL EMPLEANDO PLANTAS DE MAÍZ INOCULADAS

TESIS PROFESIONAL

PARA OBTENER TITULO DE:

INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTA:

BEATRÍZ JEANETTE PÉREZ ELIZALDE

DIRECTOR DE TESIS:

M.C. REFUGIO ARMANDO TAPIA HERNÁNDEZ

CO-DIRECTOR: **TERESITA JIMÉNEZ SALGADO**

Puebla, Pue. Enero 2018



BUAP

Oficio No. FIQ/AC/885/2017
Asunto: Registro de Tema de Tesis

**C. BEATRIZ JEANETTE PÉREZ ELIZALDE
PASANTE DE LA LICENCIATURA
EN INGENIERÍA AMBIENTAL
P R E S E N T E:**

Por medio del presente me permito informarle, de la aprobación del Registro de Tema de Tesis de la Licenciatura en Ingeniería Ambiental cuyo título es el siguiente:

**"FITORREMEDIACIÓN DE SUELO AGRÍCOLA CONTAMINADO CON DIÉSEL
EMPLEANDO PLANTAS DE MAÍZ INOCULADAS"**

Con el siguiente contenido:

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1	ANTECEDENTES
CAPÍTULO 2	METODOLOGÍA
CAPÍTULO 3	RESULTADOS Y DISCUSIÓN

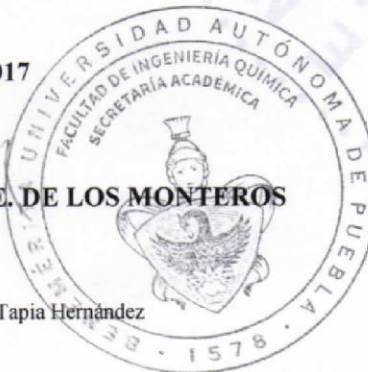
**CONCLUSIONES
BIBLIOGRAFÍA**

Director de Tesis: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández
Co-Director: M.C. Teresita Jiménez Salgado

Lo cual me permito comunicarle para su conocimiento y fines consiguientes aclarando que la vigencia de este tema será **ÚNICAMENTE POR UN AÑO.**

A T E N T A M E N T E
"Pensar Bien, Para Vivir Mejor"
H. Puebla de Z., a 11 de octubre de 2017

R. Vasquez
M.I.C. MA. GPE. TITA VÁZQUEZ E. DE LOS MONTEROS
SECRETARIA ACADÉMICA



C.c.p. Director de Tesis: M.C. Refugio Armando Tapia Hernández
C.c.p. Archivo.

80 AÑOS
DE UNIVERSIDAD

Facultad
de Ingeniería
Química

Av. San Claudio s/n, Col. San
Manuel, Ciudad Universitaria,
Puebla, Pue. C.P. 72570
01 (222) 229 55 00
Ext. 7250 y 7251

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	6
Planteamiento del problema.....	7
Objetivos	9
Objetivo general.....	9
Objetivos específicos.....	9
Hipótesis.....	10
CAPITULO I. ANTECEDENTES	11
1.1. El suelo	11
1.2. Contaminación del suelo	11
1.3 Características de los hidrocarburos	12
1.3.1 Efectos de los hidrocarburos en suelo	13
1.4 Remediación.....	14
1.4.1 Técnicas fisicoquímica y biológicas.....	14
1.4.1.1 Fitorremediación.....	16
1.4.1.2 Rizorremediación	17
1.5 Bacterias productoras de biosurfactantes	18
CAPITULO II METODOLOGÍA.....	20
2.1 Material biológico.	22
2.2 Caracterización parcial del suelo.	22
2.3 Estimación de la población bacteriana total en suelo contaminado	22
2.4 Ensayo de fitorremediación	23
2.4.1 Preparación del inoculante.....	23
2.5 Determinación del % de germinación de las semillas de maíz	23

2.6 Población bacteriana rizosférica de plantas.....	24
2.7 Determinación de la concentración de HTP fracción media	24
2.8 Determinación de HC por cromatografía de gases.....	25
CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
3.1 Caracterización de suelo sin contaminar y suelo contaminado con diésel. .	26
3.2 Población rizosférica en plantas de maíz.....	27
3.3 Ensayo de fitorremediación.....	29
3.3.1 Determinación de germinación.....	29
3.3.2 Evaluación del crecimiento de plantas de maíz	30
3.4 Evaluación de degradación de hidrocarburos en suelo contaminado	32
CONCLUSIONES.....	34
BIBLIOGRAFÍA	35

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Hidrocarburos que deberán analizarse en función del producto contaminante (NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012).....	13
Tabla 2 : Técnicas fisicoquímicas para la descontaminación de suelos contaminados por hidrocarburos (Volke y Velasco, 2002; Van Deuren et. al, 1997).....	15
Tabla 3. Técnicas biológicas para remediación (Torres y Zuluaga, 2009; Volke y Velasco, 2002; Van Deuren et. al, 1997).....	15
Tabla 4. Mecanismos de fitorremediación y su descripción (EPA, 2001; Lopez Martinez et. al, 2005).....	16
Tabla 5 clasificación y origen de algunos biosurfactantes.....	19
Tabla 6 Análisis fisicoquímico de suelo sin contaminar y suelo contaminado con diésel.....	26
Tabla 7. Población bacteriana estimada en la raíz de la planta después del ensayo de fitorremediación.....	28
Tabla 8. Porcentaje de germinación de semillas maíz en suelo contaminado y no contaminado.....	30
Tabla 9 Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de biosurfactantes después de 45 días del crecimiento en plantas de maíz en suelo sin contaminar.....	31
Tabla 10 Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de biosurfactantes después de 45 días del crecimiento en plantas de maíz en suelo contaminado.....	31
Tabla 11 concentración inicial y final de un suelo contaminado con hidrocarburos	33

INTRODUCCIÓN

El suelo es uno de los ambientes que más impacto ha recibido por contaminación, afectando de manera preocupante sus funciones. Durante la transportación, el abastecimiento del petróleo y sus derivados, así como fugas y derrames por mal manejo o robo, tienen como consecuencia altos índices de contaminación a suelos agrícolas (Pettenello *et. al*, 2014).

Existen diferentes tipos de técnicas para la restauración de suelos contaminados, por ejemplo las técnicas biológicas. Para la remediación de suelos contaminados deben ser consideradas las condiciones del sitio, evaluando las interacciones entre suelo contaminado y de los microorganismos hacia el contaminante (Telysheva *et. al*, 2002). Las técnicas biológicas también conocidas como de biorremediación son utilizadas para tratar suelos y agua con contaminantes orgánicos e inorgánicos, tomando en cuenta algunas condiciones; pueden ser realizadas con la ayuda de biofiltros, biorreactores o por compostaje, adición de nutrientes (bioestimulación) y o agregar microorganismos (bioaumentación) (Bento *et. al*, 2005).

Las plantas son capaces de purificar por si solas algunos tipos de contaminantes; la fitorremediación tiene como objetivo degradar, asimilar, metabolizar o desintoxicar metales, compuestos orgánicos y algunos compuestos radioactivos por medio de la interacción de plantas y microorganismos; utilizando su capacidad fisiológica y biológica (López Martínez *et. al*, 2005). Al igual que en la biorremediación, se deben tomar en cuenta algunas condiciones para la fitorremediación como lo es el tipo de planta y de contaminante. Algunos mecanismos pueden ser la acumulación del contaminante en la parte de raíz y tallo (Zaalishvili *et. al*, 2000).

Planteamiento del problema

La industria petroquímica y la agricultura son actividades de gran importancia en nuestro país, pero la contaminación de suelos causada por derrames de hidrocarburos en zonas agrícolas ha traído grandes afectaciones, provocando problemas sociales, ambientales y económicos.

Durante los diferentes procesos para la obtención del petróleo y sus derivados (exploración, extracción, refinación y transportación), se liberan grandes cantidades de productos que ocasionan graves problemas de contaminación. Particularmente durante el transporte, que se realiza por medio de ductos y/o vehículos, se producen derrames al suelo debido a accidentes, mal uso, desgaste de ductos y robos de combustibles. Algunos contaminantes como el diésel y la gasolina pueden filtrarse fácilmente a las capas inferiores del suelo pudiendo llegar hasta mantos acuíferos, además de afectar las propiedades físico-químicas del suelo debido a que se adhieren a la superficie de las partículas, tapando poros e impidiendo que el agua y aire sean transportados adecuadamente, alterando los procesos microbianos y ciclos biogeoquímicos, así como provocando sofocamiento de raíces de las plantas, impidiendo la fotosíntesis y un desarrollo adecuado. La contaminación del suelo por hidrocarburos afecta de manera negativa a los agricultores ya que produce pérdida de fertilidad de los suelos y daños a cultivos hacen que la producción agrícola disminuya, afectando el trabajo de los agricultores y comerciantes.

La remediación y las actividades para devolverle parte de los nutrientes a un suelo que ha sido dañado, llegan a tener altos costos, sin mencionar que algunas de las técnicas de restauración pueden tener resultados negativos, ya que el empleo de algunos químicos utilizados pueden afectar aún más al suelo.

JUSTIFICACIÓN

Existen diferentes técnicas para la remediación de suelos contaminados, como: fisicoquímicas, térmicas y biológicas. El uso de tecnologías fisicoquímicas como la adición de compuestos oxidantes o disolventes, son de acción rápida pero muy costosas, además de perjudiciales no solo para el ambiente sino también para la salud del ser humano debido a las grandes cantidades de dichos compuestos que se requieren, ya que generan vapores que son liberados a la atmósfera.

Por otro lado, la disminución o eliminación de la toxicidad del contaminante a bajos costos, son algunos de los criterios que se buscan al realizar una remediación. La principal característica de las técnicas biológicas es la utilización de organismos vivos, que por su actividad biológica pueden reducir o eliminar los contaminantes; estas son la mejor alternativa para la remediación de suelo y agua, debido a que no generan alteraciones al medio o su impacto es mínimo y sus costos pueden ser menores a las de técnicas fisicoquímicas.

La biorremediación es una técnica que se basa en la estimulación y la aplicación del proceso de biodegradación para suprimir la toxicidad que está presente en un suelo contaminado utilizando a microorganismos; por otra parte, la fitorremediación utiliza plantas, las cuales pueden eliminar, retener o disminuir contaminantes. Dependiendo de la cantidad y de la composición del contaminante es la selección de las plantas y de los mecanismos que serán utilizados.

Por lo tanto el uso de tecnologías que generan menor impacto en el ambiente como lo son biorremediación y fitorremediación, son unas de las alternativas viables para remediar suelos agrícolas contaminados con hidrocarburos.

Objetivos

Objetivo general

Evaluar el efecto de la inoculación de bacterias productoras de biosurfactantes y bacterias fijadoras de nitrógeno sobre el crecimiento de plantas de maíz y la degradación de diésel en suelo, en el proceso de fitorremediación.

Objetivos específicos

Caracterizar suelo contaminado y suelo blanco procedente del municipio de San Martín Texmelucan, Puebla.

Aplicar y Elaborar inoculantes, simple y mixto con bacterias productoras de biosurfactantes degradadoras de hidrocarburos (*Stenotrophomonas maltophilia*, *Aeromonas hydrophila*) y bacterias fijadoras de nitrógeno (*Azospirillum sp. Like*) en maíz (*Zea mays*).

Evaluar el efecto de la inoculación sobre el crecimiento de las plantas de maíz.

Determinar la concentración de diésel en suelo después del tratamiento de fitorremediación.

Hipótesis

La inoculación mixta de bacterias productoras de biosurfactante y bacterias fijadoras de nitrógeno en plantas de maíz incrementará la degradación de los hidrocarburos contaminantes del suelo.

CAPITULO I. ANTECEDENTES

1.1. El suelo

El suelo es producto de años de descomposición de rocas, flora y fauna del sitio; este proceso es muy lento, se necesitan cientos de años para que el suelo en si tenga el espesor necesario para la mayoría de los cultivos. Depende de diferentes factores para obtener las características de los distintos tipos, como pueden ser el tipo de roca que lo originó, su antigüedad, el relieve, el clima, la vegetación y los animales de la región; además de la modificaciones ocasionadas por el hombre (FAO, 2016).

1.2. Contaminación del suelo

Los accidentes que involucran compuestos derivados del petróleo, ya sea en agua o suelo han llamado la atención de la sociedad en distintos países industrializados, debido a los daños que provocan los compuestos químicos, que contienen tóxicos para los ecosistemas (Anderson *et. al*, 1993; Saval, 1999).

En México la industria petrolera aporta grandes beneficios económicos; sin embargo sus actividades son de igual forma fuente notable de contaminación hacia el ambiente. Cuenta con una amplia red de ductos a lo largo del país, para la distribución de sus diferentes productos derivados del petróleo; ésta red atraviesa importantes zonas urbanas, industriales, agrícolas y naturales. De acuerdo a los dictámenes emitidos por la Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades Riesgosas de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, los productos del petróleo, como la gasolina, el diésel y otros hidrocarburos, fueron los principales contaminantes en el período de 2003 a 2006(Cantu, 2010).

En el año 2015 las fugas y derrames en ductos de Petróleos Mexicanos presentaron un incremento del 31% en comparación con el año anterior, 52% se presentaron en los ductos de recolección relacionadas con la corrosión interior y 34% en ductos de transporte asociadas a la integridad (corrosión y falla mecánica) (PEMEX, 2015); otro problema es el incremento en el robo de hidrocarburos el cual ha aumentado

en las últimas décadas. En 2016 la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente recibió 1,961 emergencias ambientales, de las cuales: 1,822 fueron provocadas por derrames de hidrocarburos y otras sustancias químicas (PROFEPA, 2016).

Los derrames de hidrocarburos en suelos agrícolas son considerados contingencia ambiental ya que dañan a plantas, animales y seres humanos, pero en particular a microorganismos, que son una parte importante de equilibrio en el ecosistema para realizar los procesos biogeoquímicos (Vasudaran y Rajaram, 2001).

1.3 Características de los hidrocarburos

Los hidrocarburos son compuestos orgánicos, formados por cadenas de átomos de carbono e hidrógeno, estas cadenas pueden ser lineales, ramificadas, cíclicas, saturadas, insaturadas y aromáticos. Son insolubles en agua y de menor densidad que ésta. El petróleo y sus derivados son una mezcla de diferentes compuestos químicos los cuales tienen propiedades particulares (Saval, 1999). De acuerdo a la cantidad de carbonos que contenga cada molécula, cada mezcla de hidrocarburos serán clasificados como se muestra en la tabla 1.

Definiendo a los hidrocarburos de fracción media como la mezcla de hidrocarburos cuyas moléculas contengan cadenas lineales entre diez y veintiocho átomos de carbono (NOM-138-SEMARNAT/SSA-2012 Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.). El diésel está compuesto principalmente de hidrocarburos saturados (parafinas) y aromáticos poli-cíclicos y en menor proporción de compuestos de nitrógeno, azufre, algunos metales y oxígeno (Ogbo Magdalene, 2009). Su punto de ebullición se encuentra aproximadamente en 350°C, teniendo moléculas de entre 10 y 20 carbonos (PEMEX).

Tabla 1 Hidrocarburos que deberán analizarse en función del producto contaminante (NOM-138-SEMARNAT/SSAI-2012)

Producto contaminante	HIDROCARBUROS				
	Fracción pesada	Fracción media	HAP's	Fracción ligera	BTEX
Mezcla de productos desconocidos derivados del petróleo	x	x	x	x	x
Petróleo crudo	x	x	x	x	x
Combustóleo	x		x		
Parafinas	x		x		
Petrolatos	x		x		
Aceites derivados del petróleo	x		x		
Gasóleo		x	x		
Diésel		x	x		
Turbosina		x	x		
Queroseno		x	x		
Creosota		x	x		
Gasavión				x	x
Gasolvente				x	x
Gasolinas				x	x
Gas nafta				x	x

1.3.1 Efectos de los hidrocarburos en suelo

El diésel una vez en contacto con la superficie del suelo tenderá a extenderse y filtrarse, pero su migración estará directamente relacionada a las propiedades físicas del sitio (Adam y Duncan, 2002; Ortinez *et al*, 2003; Saval, 1998). La contaminación con hidrocarburos ocasiona un deterioro al suelo de manera directa o indirectamente, es decir que la velocidad de acumulación es mayor a la capacidad que este tiene para remover estos compuestos orgánicos (Kvesitadze *et al*, 2001; Anderson y Coats, 1995).

Algunos de los efectos del diésel, por su alta toxicidad es uno de los principales factores para la inhibición del crecimiento de plantas y su producción de biomasa; además, las propiedades hidrófobas de los hidrocarburos reducen el potencial de las plantas para absorber agua y minerales del suelo (M. Afzal *et al*, 2013). La

actividad enzimática también se ve afectada, disminuyendo el índice potencial bioquímico de fertilidad (Kucharski J. *et. al*, 2002).

1.4 Remediación

En México las actividades de remediación iniciaron aproximadamente en 1993 aumentando el interés por los problemas de contaminación en suelos, todo esto a causa de que en años anteriores se habían detectado antiguos derrames que causaron afectaciones a suelos y mantos friáticos. Intensificando la preocupación por identificar problemas de contaminación de subsuelos en zonas industriales pero especialmente las que están cerca de zonas urbanas (Saval, 1999).

La contaminación y la sobre explotación de recursos naturales ha llevado a la búsqueda de soluciones a los problemas generados; como las tecnologías de remediación. El término “tecnología de tratamiento” implica cualquier operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas de manera que reduzcan la toxicidad, movilidad o volumen del material contaminado (EPA, 2000), estas pueden variar dependiendo de las condiciones en las que se encuentre.

1.4.1 Técnicas fisicoquímicas y biológicas

Las técnicas **físico-químicas** son efectivas en cuanto a costos y pueden llevarse a cabo en periodos cortos, estas utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los contaminantes o del medio contaminado destruyendo, separando o conteniendo la contaminación (Van Deuren *et. al*, 1997). Estas pueden realizarse de forma *in situ* o *ex situ*, aunque la mayoría de estas es de forma *in situ* como se muestran en la tabla 2.

Tabla 2 : Técnicas fisicoquímicas para la descontaminación de suelos contaminados por hidrocarburos (Volke y Velasco, 2002; Van Deuren *et. al*, 1997).

<i>Técnicas</i>	<i>in situ</i>
<i>fisico-químicas</i>	Remediación electrocinética
	Lavado de suelo
	Extracción por solventes
	Remoción de volátiles
	Bombeo

Al mencionar a las técnicas **biológicas** o de biorremediación se refiere a una variedad de sistemas que utilizan actividades metabólicas y catabólicas de algunos organismos (plantas, hongos, bacterias) para degradar, transformar o remover los contaminantes a productos metabólicos inoocuos o menos tóxicos, estas técnicas también pueden ser utilizadas de manera *in situ* o *ex situ* (Volke y Velasco, 2002) algunas de las más utilizadas se encuentran en la tabla No 2. Las rutas de biodegradación de los contaminantes orgánicos, varían en función de la estructura química del compuesto y de las especies microbianas degradadoras (Torres y Zuluaga, 2009).

Tabla 3 : Técnicas biológicas para remediación (Torres y Zuluaga, 2009; Volke y Velasco, 2002; Van Deuren *et. al*, 1997).

<i>Técnicas</i>	<i>ex situ</i>	<i>in situ</i>	
Biológica	Birreactores	Bioaumentación	
	Biopilas	Bioventeo	
	Composteo		Bioestimulación
			Biolabranza
			Fitorremediación
			Bioesparming

1.4.1.1 Fitorremediación

La fitorremediación es una técnica la cual aprovecha los procesos naturales de las plantas para remover, retener o eliminar los contaminantes en suelo o agua, teniendo un gran número de ventajas para al ambiente y la economía; se realizan de manera *in situ*, evitando los costos de transportación, no utiliza reactivos químicos ni peligrosos y no afecta la estructura del suelo ni su composición (Marrero-Coto *et. al*, 2012; Carpena y Bernal, 2007). Algunas especies de plantas utilizadas en la fitorremediación son gramíneas, como el maíz, el arroz y la caña de azúcar. El término general para las diferentes maneras en las que se emplean plantas para una remediación es fitorremediación, de forma particular estas utilizan métodos dependiendo del contaminante y de la misma planta, algunos ejemplos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4 Mecanismos de fitorremediación y su descripción (EPA, 2001; Lopez Martinez *et. al*, 2005)

MECANISMOS	DESCRIPCIÓN
Fitoextracción	Es la translocación de contaminantes orgánicos o inorgánicos por medio de raíces a las partes aéreas de la planta.
Fitoestabilización	Es el uso de plantas que desarrollan un denso sistema de raíces, reduciendo la biodisponibilidad de los contaminantes, por medio de la absorción y acumulación.
Fitodegradación	A través de procesos metabólicos y con ayuda de microorganismos en las raíces de la planta, esta puede degradar parcialmente o en su totalidad contaminantes para utilizarlos como nutrientes.
Fitoimmobilización	Esta es realizada en la zona suelo-raíz mediante la generación de químicos los cuales provocan la sujeción y reducción de la biodisponibilidad del contaminante.
Fitovolatilización	Es cuando algunas plantas pueden absorber, metabolizar y transportar contaminantes desde la raíz hasta su liberación a la atmósfera con menos toxicidad mediante la transpiración.
Rizofiltración	Es un método utilizado más en agua, en donde las plantas con crecimiento y área de raíces abundante puedan absorber o adsorber los contaminantes.
Rizoremediación	En este método la interacción raíz-microorganismo es el principal factor, los microorganismos se alimentan del contaminante degradándolo y ayudando a que la planta pueda tener una fácil asimilación.

1.4.1.2 Rizorremediación

El término rizosfera fue utilizado por primera vez en el año de 1904 por Hikner definiéndola como: “Es el volumen de suelo que recibe influencia de la raíz” (Pérez *et. al*, 2002). En esta zona se da una relación entre raíz-microorganismo, gracias a la que la presencia de la raíz modera la humedad y la aireación en el suelo, la actividad microbiana aumenta, mejorando la descomposición de contaminantes orgánicos como los hidrocarburos. Los exudados de la raíz como lo son azúcares, aminoácidos y otros compuestos pueden aumentar el crecimiento de los microorganismos, dando como resultado el cometabolismo de los contaminantes (EPA, 2000).

Actualmente se ha determinado que distintos tipos de cepas bacterianas que pueden degradar hidrocarburos y han sido aisladas de plantas con alto potencial degradador (Ochoa y Montoya, 2010; Alarcón y Ferrera, 2000). Ejemplos de bacterias utilizadas para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos son: *Pseudomonas sp*, *Pantoea sp*, *R. melitoli*, *Acinetobater sp*, *Azospirillum sp*.

Algunos microorganismos pueden favorecer el crecimiento de las plantas, a las bacterias que presentan esta capacidad se les conocen como: bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV), muchas de las cuales se encuentran colonizando la rizosfera de las plantas y pueden incrementar el crecimiento y la productividad de las plantas, algunas de las más estudiadas están las que pertenecen a los géneros de *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (de Bashan; *et. al*, 2007; Holguin *et. al*, 2003).

El género *Azospirillum* fue descrito en los años 70's, cuando se retomaron las investigaciones para *Spirillum lipoferum*, y estudios taxonómicos llegaron al resultado de su reclasificación en este género (Tarrand, J. *et. al*, 1978). Las primeras especies del género en ser definidas fueron *A. lipoferum* y *A. brasilense*; en la actualidad son 21 especies del género, aisladas de diferentes sitios como en plantas, suelos, agua, humus, suelo contaminado con hidrocarburos, como *A.*

rugosum (Young *et. al*, 2008) y *A. picis* (Lin *et. al*, 2009) y entre otros; no han sido reportadas como patógenas hacia animales y plantas.

La mayoría de las bacterias del género de *Azospirillum* son organismos capaces de fijar nitrógeno molecular (N₂) (Pazos, 2000). El nitrógeno es un elemento esencial para el desarrollo de las plantas; por lo que ha sido necesaria la aplicación en cultivos en forma de fertilizante (Rueda R. y Reyes J., 2009). Dentro del ciclo del nitrógeno los microorganismos juegan un papel muy importante ya que aproximadamente un 90% del nitrógeno total en suelos en forma orgánica no se encuentra disponible, convirtiéndolo a ion amonio quien a su vez es oxidado a nitritos y posteriormente a nitratos, estos últimos son utilizados por las plantas (Pacheco J. *et. al*, 2002).

Azospirillum es capaz de producir y excretar reguladores de crecimiento vegetal (fitohormonas) como auxinas, citocininas y giberelinas (de Bashan *et. al*, 2007; Bashan *et. al* 2010).

1.5 Bacterias productoras de biosurfactantes

La utilización de surfactantes en algunas técnicas fisicoquímicas de remediación de suelo han tenido éxito, ya que son capaces de movilizar contaminantes orgánicos como los hidrocarburos que están fuertemente adheridos al suelo (Riojas González *et. al*, 2011). Los surfactantes son moléculas anfifílicas únicas, con propiedades que han sido exploradas por sus aplicaciones en las tecnologías de biorremediación (Banat *et. al*, 2000). Las moléculas anfifílicas pueden dividirse en dos partes, una polar y una apolar o denominadas también como hidrofílica e hidrofóbica respectivamente (Salager y Fernandez, 2004)., debido a esto sus principales características son: disminuir la tensión superficial, reducir la tensión interfacial y aumentar la solubilidad (Eliora y Eugene, 2002).

Existen muchos compuestos sintéticos que se han ocupado en la industria, pero el daño que pueden ocasionar al ambiente es una problemática; por eso se ha optado

por la utilización de surfactantes generados por microorganismos (Kvesitadze *et. al*, 2001).

Los biosurfactantes son un grupo heterogéneo de compuestos químicos de superficie activa que pueden ser producidos por microorganismo como bacterias y hongos, al igual que los surfactantes químicos estas pueden reducir la tensión superficial, la tención interracial y la concentración crítica de micelas en soluciones acuosas y mezclas de hidrocarburos (Banat I.M., 1995; Nilanjana Das and Preethy Chandran, 2011)

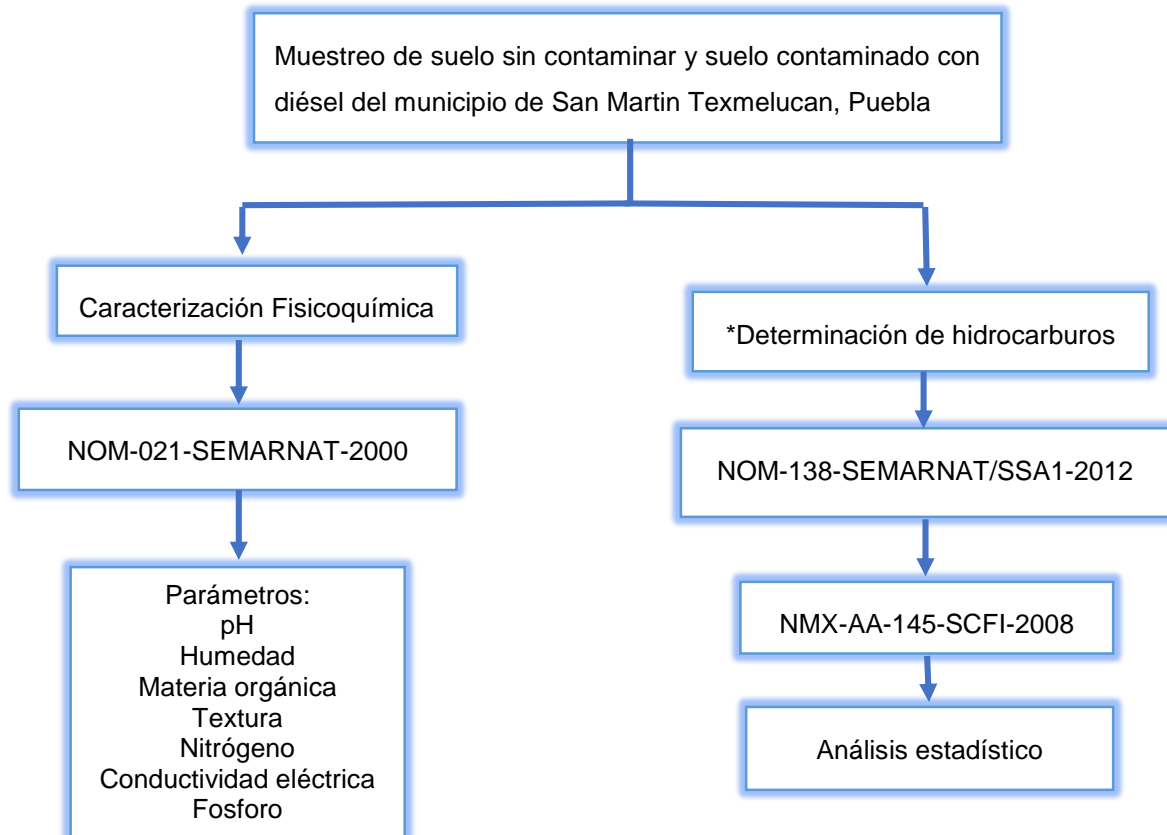
Las aplicaciones potenciales de los biosurfactantes incluye la acción como emulsificantes por la disminución de la tensión superficial y formar micelas; algunos tiene propiedades funcionales como la separación de fases, humectación y formación de espumas (Banat *et. al*, 2000; Ron y Rosenberg, 2001) así como actividad superficial y reducción de la viscosidad de aceites crudos(Nilanjana Das and Preethy Chandran, 2011) Estas propiedades los hacen útiles en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos, ya que los biosurfactantes incrementan su biodisponibilidad y biodegradabilidad para plantas y microorganismos (Ortiz *et. al*, 2001).

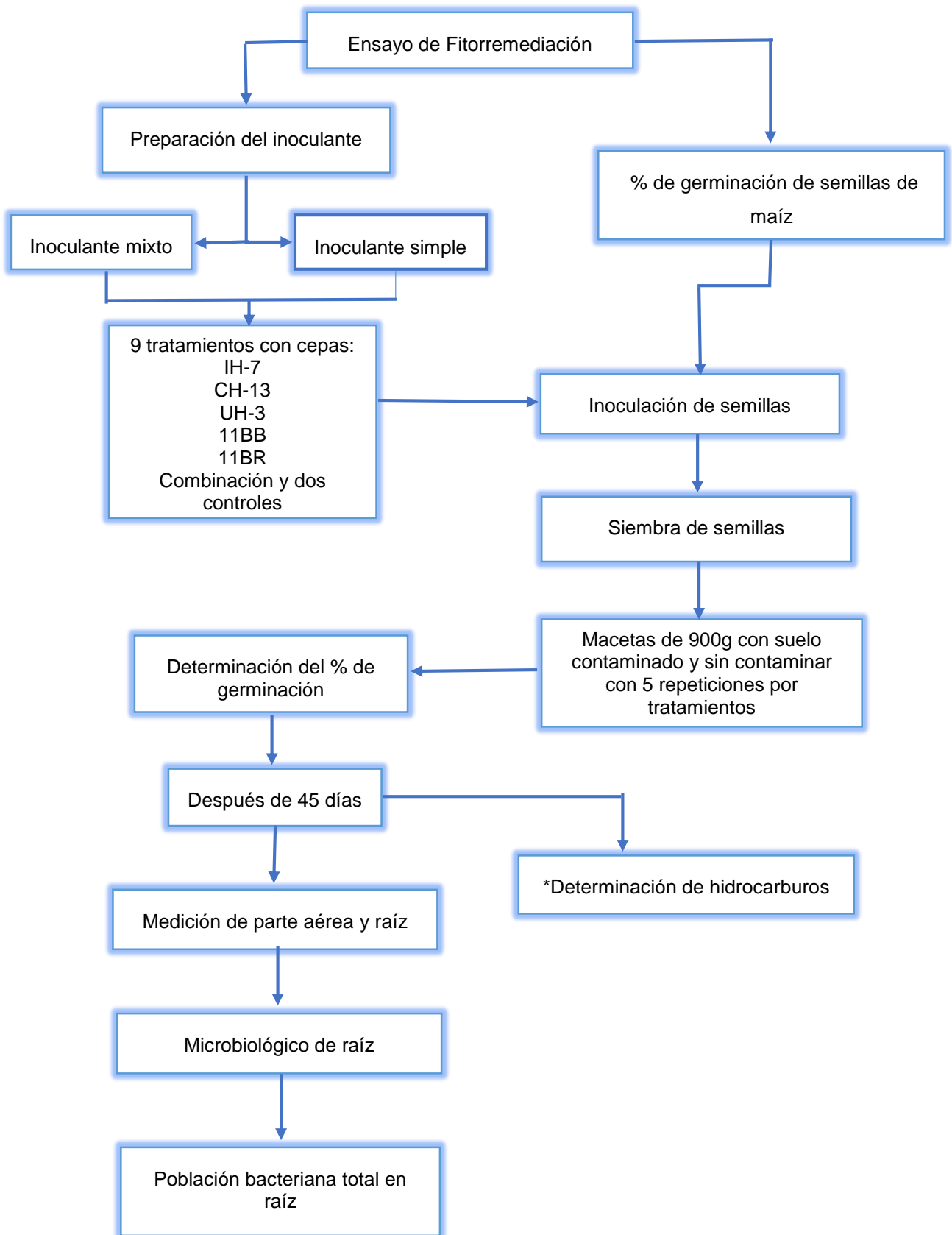
Tabla 5 clasificación y origen de algunos biosurfactantes

Organismo productor de biosurfactante	Tipo de surfactante
<i>Pseudomonas aeruginos</i>	Ranmnolipidos a
<i>Pseudomonas sp</i>	Ranmnolipidos a
<i>Serratia rubidea</i>	Ranmnolipidos a
<i>Arthrobacter paraffineus</i>	Trehalolipidos
<i>Arthrobacte sp.</i>	Trehalolipidos
<i>Candida apicola</i>	Soforolipidos
<i>Candida lipolitica</i>	Soforolipidos
<i>Bacillus licheniformis</i>	Lipopeptidos
Ustilago maydis	Celobiolipidos
<i>Lactobacillus fermentii</i>	Diglicosil diglicéridos

CAPITULO II METODOLOGÍA

Esquema de trabajo





2.1 Material biológico.

Para los ensayos se utilizaron tres cepas de *Azospirillum* sp. y dos cepas productoras de biosurfactantes (*Sterotrophomonas maltophilia* y *Aeromonas hydrophyla*) pertenecientes de la colección de los microorganismos del Laboratorio de microbiología de suelos ICUAP. Todas las cepas fueron aisladas de suelos contaminados con hidrocarburos, además las cepas de *Azospirillum* se seleccionaron por su capacidad para fijar nitrógeno y por su producción de fitohormonas.

2.2 Caracterización parcial del suelo.

Se caracterizó el suelo contaminado con hidrocarburos proveniente de un derrame causado por una toma clandestina en el municipio de San Martín Texmelucan delimitada por las siguientes coordenadas geográficas 19°15'42.71''N, 98°23'50.21'' O y 2241 MSNM, así como un suelo sin contaminar tomado pendiente arriba del punto de fuga fuera de la pluma de contaminación; las muestras fueron secadas a la sombra y tamizadas de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM 021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis, los parámetros determinados fueron: de pH, textura, contenido de materia orgánica, nitrógeno, fosforo y conductividad eléctrica

2.3 Estimación de la población bacteriana total en suelo contaminado

Para la estimación de la población total de bacterias cultivables se realizaron diluciones decimales seriadas que fueron por el método de extendido en placa, en medio Bushnell-Hass modificado (BHm) adicionando 100µl de diésel estéril, se sembrara una alícuota de 100µl por cada dilución y llevadas a incubación por 48h a 35°C.

2.4 Ensayo de fitorremediación

2.4.1 Preparación del inoculante

Las cepas de las bacterias fijadoras de nitrógeno y las productoras de biosurfactes se sembraron en caldo nutritivo y caldo HBm respectivamente, se incubaron a 32C° por 48h en agitación a 150 r/min. Para la inoculación de la semilla se ajustó la población de cada cepa a 0.05 densidad óptica a 610 nm, con buffer de fosfatos a 0.025M estéril; para preparar los inóculos mixtos las cepas fueron mezcladas en relación 1:1. Las semillas fueron desinfectadas como se describió en el apartado anterior, y sumergidas por completo en los cultivos por 30 minutos e inmediatamente sembradas en las macetas con 900 g de suelo limpio o contaminado según correspondiera.

El ensayo de fitorremediación fue realizado a nivel invernadero con luz natural, y a temperatura ambiente, siguiendo el diseño experimental con bloques aleatorios, con repeticiones de 5 macetas, colocando de forma inicial 5 semillas por maceta de cada tratamiento.

Se ensayó con 9 tratamientos, utilizando las bacterias UH-3, IH-7, CH-13, 11BB Y 11BR individualmente y en combinaciones, las cuales fueron CH-13+11BB y UH3+11BR; como testigo se tomó un suelo sin planta ni inoculación con bacterias y semillas sin inocular.

2.5 Determinación del % de germinación de las semillas de maíz

Las semillas de maíz (*Zea mays*) que se utilizaron para los ensayos de fitorremediación es de la variedad criolla de la población de San Nicolás de los Ranchos, Puebla, a las que se les determinó el porcentaje de germinación.

Las semillas fueron desinfectadas superficialmente sumergiéndolas en una solución de hipoclorito de sodio al 1% por 5 min y lavadas con agua destilada estéril, posteriormente colocadas en cajas estériles con tres repeticiones y diez semillas en cada una.

Después de la germinación de las semillas, se dejaron crecer 45 días. La humedad se mantuvo con riego de agua destilada al 60% de la capacidad de retención. Las plantas fueron retiradas del suelo, evaluando: tamaño de la raíz, grosor y altura del tallo. Seleccionando al azar tres plantas para determinar la población de bacterias en raíces y una muestra representativa de suelo para la determinación de hidrocarburos.

2.6 Población bacteriana rizosférica de plantas

Las raíces de las plantas se pesaron y se lavaron con agua destilada estéril para remover el suelo adherido. Moliéndolas con solución buffer de fosfato estéril, realizando diluciones decimales en tubos con la misma solución, utilizando la prueba del número más probable por gota (5µl) para sembrar en cajas Petri de 90x15 mm con medio BHm. Las cajas se incubaron a 30°C por 48 h para su conteo.

2.7 Determinación de la concentración de HTP fracción media

Se tomaron aproximadamente 150g de suelo por maceta de los diferentes tratamientos, almacenándolos en frascos de vidrio con rosca y tapa de plástico, manteniéndolos en refrigeración.

Para la extracción de los HC, en viales de 40 ml con tapa de rosca, se colocaron aproximadamente 2 g de suelo, adicionando sulfato de sodio anhidro hasta lograr una textura arenosa, posteriormente se agregaron 10 ml de diclorometano, las muestras con solvente fueron selladas y puestas en agitación por 1h y media a 200 r/min, después se colocaron en el baño ultrasónico por 10 minutos, se dejaron enfriar. El sobrenadante se filtró en papel filtro con sulfato de sodio anhidro y sílica gel, este procedimiento se realizó dos veces más, hasta obtener una cantidad de extracto aproximadamente de 30 ml, los viales con el extracto fueron etiquetados y sellados para almacenarlos en refrigeración.

Para la concentración de las muestras fue realizado con Rotavapor para recuperación de solvente y aforada a un volumen final de 1ml, almacenándolas en viales de 2 ml sellados y etiquetados, para su análisis en un cromatógrafo de gases.

2.8 Determinación de HC por cromatografía de gases.

La determinación de HC se realizó de acuerdo a la norma mexicana NMX-AA-145-SFI-2008 Suelos-Hidrocarburos fracción media por cromatografía de gases con detector de ionización de flama – método de prueba. Se empleó un cromatógrafo de gases Finnigan modelo Focus con detector de ionización de flama FID (por sus siglas en inglés) con una columna Aligent BD-THP de 30m, 0.320 mm de diámetro y 0.25 μm de película; las condiciones de corrimiento fueron las siguientes: temperatura inicial 40°C por minuto con incrementos de 15°C por minuto hasta 250°C. La temperatura del inyector, y la del detector fue 280°C; Se empleó nitrógeno como gas acarreador.

CAPITULO III RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

3.1 Caracterización de suelo sin contaminar y suelo contaminado con diésel.

Antes de realizar una remediación es importante conocer algunas características del sitio. En el presente estudio se determinaron algunos parámetros del suelo contaminado con diésel y del suelo no contaminado (Tabla 6). Se observó que el pH del suelo contaminado presentó un incremento de 0.3 unidades a comparación con el suelo sin contaminar. Bundy *et.al.* (2002) Observaron la afectación en pH por diésel en tres tipos de suelos, en dos de ellos hubo una disminución, mientras que el otro presentó un aumento respecto al suelo sin contaminar, cabe mencionar que la contaminación fue intencional con diésel; de igual manera, Zamora *et. al.* (2012) también reporta una disminución de pH entre el suelo sin contaminar y el suelo contaminado con crudo. En trabajos anteriores en el laboratorio de microbiología del suelo se ha encontrado que suelo contaminado petróleo crudo también incrementó el pH (Díaz T., 2013) esto pudo ser debido posiblemente al tipo de suelo y al contaminante, además de los microorganismos presentes.

Tabla 6 Análisis fisicoquímico de suelo sin contaminar y suelo contaminado con diésel/

PARAMETROS	SUELO SIN CONTAMINAR	INTERPRETACION	SUELO CONTAMINADO	INTERPRETACION
pH	6.33	Moderadamente acido	6.60	Neutro
Textura:				
Limo %	23.4	Franco Arcillo-arenoso	15.28	Franco Arcillo Arenoso
Arena%	55.32		64.04	
Arcilla %	21.24		20.68	
Materia Orgánica %	1.77	Medio	4.97	Alto
Conductividad eléctrica dS/m	0.83	Efectos despreciables de salinidad	0.38	Efectos despreciables de salinidad
% N	0.113	Medio	0.128	Medio
P mg/kg	43.2	Alto	33.5	Alto

El contenido de materia orgánica muestra un aumento significativo de 3.2 respecto al suelo sin contaminar. La conductividad del suelo contaminado es menor (0.38 dS/m) en comparación al suelo sin contaminar (0.83 dS/m). Ambos suelos presentan textura de franco arcilloso arenoso, sin embargo el suelo contaminado tiene diferencias en los porcentajes de arcilla, limo y arena. .E. Martínez y López S. en 2001 analizan los efectos de hidrocarburos en un suelo arcilloso a diferentes concentraciones, en donde el diésel provoca cambios significativos en donde la arena tiende a aumentar y la arcilla a disminuir; también menciona que existe un mayor aumento de la materia orgánica en presencia de diésel en concentraciones después de 20 000 mg/ kg

3.2 Población rizosférica en plantas de maíz

La estimación de la población bacteriana asociada a las raíces de plantas crecidas en suelo no contaminación y suelo contaminado con diésel se presentan en la tabla 7. El Tratamiento testigo (semillas no inoculadas) presentó una disminución en la estimación de la población bacteriana asociada a las raíces de las plantas de maíz crecidas en suelo contaminado, respecto a la población de las plantas que crecieron en suelo sin contaminar.

La población de bacterias estimada en la rizosfera de las plantas crecidas en suelo sin contaminar disminuye en la mayoría de los tratamientos en comparación con el testigo, solo el tratamiento 11BB presento población similar. Los tratamientos 11BR e IH-7 no muestran diferencia en la población en ambos suelos; mientras que en el tratamiento 11BB, CH-13 y CH-13+11BB en suelo contaminado las poblaciones de bacterias fueron mayores que para las plantas sin inocular.

Tabla 7. Población bacteriana estimada en la raíz de la planta después del ensayo de fitorremediación.

TRATAMIENTOS	Suelo contaminado NMP/g	Suelo sin contaminar NMP/g
semilla SI	3.91E+10	7.29E+10
11BB	6.39E+10	7.21E+10
11BR	3.23E+10	3.23E+10
IH-7	1.19E+10	1.99E+10
CH-13	9.44E+10	2.59E+10
UH-3	2.84E+10	4.42E+10
CH-13+11BB	7.91E+10	5.15E+09
UH-3+11BR	2.43E+10	6.76E+10

SI= sin inocular. Los valores son la media de 3 repeticiones.

Tesar *et.al*, (2002) encontró un decrecimiento microbiano en la rizosfera del álamo, en suelo contaminado, mientras que en el cultivo mixto de alfalfa y ballico contenía un número mayor de microorganismos en presencia de diésel como contaminante; esto debido a que las bacterias de la rizosfera del álamo pudieron ser superadas por poblaciones nuevas formadas y por la toxicidad de n-alcanos, iso-alcanos, cicloalcanos e hidrocarburos aromáticos con números de carbono por debajo de 10, penetrando en las membranas celulares. El aumento en la población bacteriana en los tratamientos CH-13 y CH13+11BB en suelo contaminado en comparación con el suelo sin contaminar del mismo tratamiento y la semilla sin inocular del contaminado, puede deberse a la adaptación de estas cepas en la rizosfera de la planta. La rizerremediación se lleva a cabo gracias a que las raíces de las plantas liberan exudados, los cuales son aprovechados por los microorganismos y así pueden incrementar su población y favorecer la degradación del contaminante; sin embargo las plantas al estar en contacto con los contaminantes es posible que no liberen la misma cantidad y composición de los exudados y así la población de microorganismos asociados a las raíces pueden cambiar (Kuiper et al 2004).

En el tratamiento UH-3 tanto en suelo sin contaminar como en suelo contaminado, las poblaciones son menores a las de plantas sin inoculo en ambos suelos, algunas bacterias son inhibidas por la competencia de nutrientes; se han reportado antagonismo en especies de *Azospirillum* por actinomicetos en la rizosfera del centeno, así como sinergia entre otros miembros de la comunidad rizosfera (Caballero Mellado, 2002),

3.3 Ensayo de fitorremediación

3.3.1 Determinación de germinación

La planta de maíz (*Z. mays*) es óptima para la fitorremediación en suelos contaminados con diésel, mostrando una alta tolerancia en distintas concentraciones de contaminante (Ogbo E. Magdalene, 2008).

Durante el ensayo de fitorremediación se determinó la germinación de las semillas de maíz inoculadas y no inoculadas con las bacterias tanto en suelo contaminado como en suelo sin contaminar. En el ensayo realizado se mostró que el porcentaje de germinación de la semilla utilizada para los ensayos fue del 96%. Los datos de germinación de las semillas en suelo sin contaminar y suelo contaminado con diésel se muestran en la tabla 8. Se presentó una diferencia entre las semillas sin inocular en los dos suelos, esto puede ser debido a la presencia del contaminante, Adam y Ducan (1999 y 2002) mencionan que el diésel afecta la germinación de semillas de diferentes especies de plantas, en niveles relativamente bajos retrasaron la aparición de semillas y la reducción de germinación.

El porcentaje de germinación en suelo sin contaminar se ve afectado en la mayoría de los tratamientos a excepción del tratamiento IH-7 comparándolo con el control, las cepas UH-3 y 11BB aumentan e igualan respectivamente, la germinación de semillas sin inocular en suelo contaminado mientras que los demás tratamientos disminuyen. La formación de compuestos polares disueltos en agua puede ser causante de la poca germinación ya que podrá penetrar en la cubierta de la semilla ejerciendo narcosis polar (Wang *et. al*, 2001; Adam y Duncan, 2002).

Tabla 8. Porcentaje de germinación de semillas maíz en suelo contaminado y no contaminado.

TRATAMIENTOS	Porcentaje de germinación											
	4 dds		5 dds		6 dds		7 dds		8 dds		9 dds	
	SC	SSC	SC	SSC	SC	SSC	SC	SSC	SC	SSC	SC	SSC
semilla sin inocular	20	36	28	40	32	60	50	80	60	100	92	100
IH-7	20	24	20	36	32	48	44	60	60	72	84	100
CH-13	16	20	24	32	36	42	40	48	52	68	80	84
UH-3	20	24	36	32	44	52	68	72	84	92	100	92
11BR	16	20	24	28	40	36	56	44	68	60	80	72
11BB	16	20	28	28	40	32	76	44	88	48	92	76
UH-3+11BR	16	20	28	32	48	56	60	72	68	76	84	88
CH-13+11BB	12	24	24	32	36	48	56	60	68	80	84	92

SC= suelo contaminado, **SSC**= suelo sin contaminar, **dds**= días después del sembrado. Los datos corresponden al porcentaje de semillas germinadas en cinco unidades experimentales con cinco semillas por tratamiento.

3.3.2 Evaluación del crecimiento de plantas de maíz

Las plantas de maíz fueron evaluadas después de los 45 días de desarrollo, tomando medidas de la parte aérea y la raíz para su comparación en suelo sin contaminar (tabla 9), en la altura de tallo no hay diferencias significativas estadísticamente pero visiblemente hay una diferencia en los tratamientos CH-13 y UH-3 con respecto al testigo; en el grosor de tallo el tratamiento UH-3 muestra una diferencia estadística mayor a los demás tratamientos y los tratamientos IH-7 y UH-3+11BR son de menor grosor que el testigo. Con respecto a la raíz, en longitud se muestran diferencias significativas siendo 11BB la más alta así como en peso seco.

Tabla 9 Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de biosurfactantes después de 45 días del crecimiento en plantas de maíz en suelo sin contaminar.

TRATAMIENTOS suelo sin contaminar	TALLO			RAÍZ		
	ALTURA (cm)	GROSOR (cm)	PESO SECO (g)	LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
semilla SI	59.4 ±9.45 a	0.46 ± 0.11 ab	0.77 ± 0.22 a	47.4 ± 7.51 bcd	8.12 ± 0.88 a	0.858 ± 0.28 a
11BB	57.4 ±9.68 a	0.65 ± 0.12 bc	0.96 ± 0.20 a	54.8 ± 15.2 d	5.14 ± 1.84 a	0.958 ± 0.278 a
11BR	54.5 ±14.5 a	0.5 ± 0.19 ab	0.76 ± 0.34 a	31.3 ± 8.04 a	5.01 ± 3.53 a	0.753 ± 0.274 a
IH-7	58.5 ±17.6 a	0.36 ± 0.41 a	0.81 ± 0.29 a	45.4 ± 10.1 bcd	6.5 ± 1.43 a	0.847 ± 0.304 a
CH-13	65 ± 13.5 a	0.58 ± 0.27 abc	0.86 ± 0.32 a	45.1 ± 9.19 bcd	6.78 ± 1.11 a	0.715 ± 0.679 a
UH-3	61.8 ± 13.2 a	0.73 ± 0.17 c	0.85 ± 0.52 a	51 ± 10.2 cd	6.62 ± 0.71 a	0.561 ± 0.184 a
CH-13 + 11BB	60.7 ± 7.77 a	0.53 ± 0.13 abc	0.83 ± 0.37 a	42.2 ± 12.8 abc	5.95 ± 2.56 a	0.511 ± 0.281 a
UH-3 + 11BR	54.3 ± 9.09 a	0.39 ± 0.06 a	0.64 ± 0.24 a	37.4 ± 13.5 ab	6.16 ± 1.51 a	0.651 ± 0.172 a

SI: sin inocular. Los valores son la media de 3 repeticiones seguido de su desviación estándar, valores con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Duncan (P=0.05).

Tabla 10 Efecto de la inoculación de bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de biosurfactantes después de 45 días del crecimiento en plantas de maíz en suelo contaminado.

TRATAMIENTOS suelo contaminado	TALLO			RAÍZ		
	ALTURA (cm)	GROSOR (cm)	PESO SECO (g)	LONGITUD (cm)	PESO FRESCO (g)	PESO SECO (g)
semilla SI	51.2 ± 12.7 c	0.39 ± 0.13 a	0.36 ± 0.25 a	39.4 ± 18.4 a	2.8 ± 1.11 a	0.22 ± 0.07 a
11BB	37.7 ± 10.8 a	0.35 ± 0.11 a	0.26 ± 0.12 a	41.7 ± 19.2 a	5.2 ± 2.12 b	0.27 ± 0.14 a
11BR	52.2 ± 16.7 c	0.47 ± 0.27 ab	0.39 ± 0.24 a	45.6 ± 14.4 a	2.9 ± 0.33 a	0.54 ± 0.27 b
IH-7	39.1 ± 6.7 ab	0.38 ± 0.08 a	0.28 ± 0.09 a	34.1 ± 11.3 a	3.2 ± 1.55 ab	0.37 ± 0.22 ab
CH-13	43.5 ± 9.4 abc	0.37 ± 0.09 a	0.28 ± 0.09 a	44.7 ± 22.4 a	3.7 ± 1.95 ab	0.28 ± 0.17 a
UH-3	44.6 ± 8.2 abc	0.37 ± 0.08 a	0.34 ± 0.08 a	33.8 ± 17.1 a	2.8 ± 1.11 a	0.36 ± 0.17 ab
CH-13+11BB	42.9 ± 4.2 abc	0.36 ± 0.1 a	0.31 ± 0.07 a	41.8 ± 11.8 a	3.2 ± 0.59 ab	0.38 ± 0.21 ab
UH-3+11BR	48 ± 11.7 bc	0.58 ± 0.2 b	0.34 ± 0.15 a	41.1 ± 18.9 a	2.1 ± 0.68 a	0.34 ± 0.15 ab

SI: sin inocular. Los valores son la media de 3 repeticiones seguido de su desviación estándar, valores con la misma letra son estadísticamente iguales según la prueba de Duncan (P=0.05).

Las plantas crecidas en suelo contaminado (tabla 10), muestran que en la altura de tallo el tratamiento con 11BB es mayor que el testigo por 1cm, mientras que 11BB e IH-7 son los de menor altura entre los tratamientos, también en peso seco aunque no se muestra diferencia estadística. En la parte terrestre en la longitud de la raíz, los tratamientos con UH-3 e IH-7 son menores al testigo, en peso seco 11BB y en peso seco 11BR son mayor que los demás tratamientos.

El desarrollo de plantas de maíz en suelo contaminado se redujo en comparación con las crecidas en suelo sin contaminar, esto se puede deber al estrés que sufrieron en presencia de hidrocarburos, el diésel mata las células de las plantas al contacto, dañando las raíces e impidiendo la absorción de nutrientes y agua (Ogbo E. Magdalene, 2008; Adams y Duncan, 2002) así como la obstrucción en poros en suelo interrumpiendo la relación agua y planta (McCown *et. al*, 1997)

3.4 Evaluación de degradación de hidrocarburos en suelo contaminado

En los resultados obtenidos al finalizar el ensayo de fitorremediación (tabla 11) se puede observar la concentración inicial de hidrocarburos fracción media en suelo contaminado. Los tratamientos T0 y planta sin inocular muestran una disminución significativa en la concentración de hidrocarburos, teniendo estas las concentraciones más altas con respecto a los demás tratamientos del suelo inicial (sc) tiene una concentración 26.95, los más bajos en concentración son UH-3 con 46.15 y el inoculo mixto CH-13+11BB con 50,04.

Tabla 11 concentración inicial y final de un suelo contaminado con hidrocarburos.

TRATAMIENTO	HIDROCARBUROS (mg/kg)	PORCENTAJE DE REMOCION
sc inicial	26953.13 ± 2.51E3 e	--
T ₀	14283.76 ± 855. d	47.0
planta sin inocular	16317.42 ± 2.45E3 d	39.5
IH-7	9031.00 ± 789. bc	66.5
CH-13	9775.54 ± 1.43E3 c	64.0
UH-3	4615.10 ± 707. a	83.0
11BR	6801.68 ± 605. ab	75.0
11BB	6686.07 ± 839. ab	75.1
UH-3+11BR	7968.12 ± 4.27E3 bc	70.4
CH-13+11BB	5004.03 ± 391 a	81.4

T₀= suelo sin planta ni inculo, **sc**= suelo contaminado.

La degradación en T₀ puede ser debido a que el ensayo se realizó en suelo sin esterilizar y que había sido contaminado hace 3 años aproximadamente, por lo que podemos otorgar la disminución a los microorganismos nativos. Estudios demuestran que la biota puede adaptarse a diésel utilizándolo como alimento en periodos de exposición largos (B. Sutton *et.al*, 2013).

El tratamiento CH-13+11BB fue utilizado en un ensayo de biorremediación (Martinez Carrera, 2016) en donde redujo un 94% con respecto a la concentración inicial

CONCLUSIONES

- Las propiedades fisicoquímicas del suelo presentaron alteraciones debido a la presencia del contaminante diésel.
- La población bacteriana rizosférica disminuyó en suelo contaminado en las plantas sin inoculación.
- En las plantas inoculadas con las cepas 11BB, CH-13 y CH-13+11BB la población bacteriana asociada a las raíces de las plantas se incrementó en suelo contaminado.
- Solo la cepa UH-3 favoreció la germinación de las semillas en suelo contaminado con diésel.
- La degradación del hidrocarburo se incrementó con presencia de las plantas inoculadas.
- La inoculación de las plantas con bacterias fijadoras de nitrógeno y productoras de biosurfactantes incrementó la biodegradación del hidrocarburo.

BIBLIOGRAFÍA

Adam G. and Duncan H.J. (1999). Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environ. Geochem. Health*. 21: 353-357

Adam G. y Duncan H., (2002). Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120 (2): 336-370

Alarcón, A. & Ferrera, R. (2000). Biofertilizantes: importancia y utilización en la agricultura. *Redaly.org*, 26 (2): 191-203

Anderson T. y Coats J (1995). Screening rhizosphere soil samples for the ability to mineralize elevated concentrations of atrazine and metolachlor. *J. Environ. Sci. Heal*. 30: 473-484.

Anderson T., Guthrie E. y Walton B., (1993). Bioremediation in the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol*. 27: 2630-2636.

Banat I.M. (1995). Biosurfactants production and possible uses in microbial enhanced oil recovery and oil pollution remediation: a review. *Bioresource Technology* 51: 1-12

Banat I.M., Mekkar R.S. y Cameotra S.S (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl. Microbial. Biotechnol* 53: 495-508

Caballero-Mellado Jesús, (2002). Microbios en línea: El género *azospirillum*. Cap. 10 Edit.: Dra. Esperanza Martínez Romero y Julio César Martínez Romero. Cuernavaca, Mor., México. Disponible en:
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/index.html>.

Cantú, M.A., CreamH.S., Sommer, C.I y Oropeza O.O., (2010). Atlas regional de impactos derivados de las actividades petroleras en Coatzacoalcos, Veracruz (1ra). México.

Carpena R.O. y Bernal Pilar M. (2007). Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas* 16(2):1-3

de-Bashan, L.E., Holguin, G., Glick, B.R. y Bashan, Y. (2007). Microbiología agrícola hongos bacterias micro y macrofauna control biológico y planta microorganismo. In: Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propósitos agrícolas y ambientales Cap. 8 (Ed.) Ferrera, R. & Alarcón, Public: Edit. Trillas, México city, México. 161-182.

Díaz Tapia A. Olivia (2013). Efecto de la rizodegradación de suelo agrícola contaminado por petróleo crudo usando plantas de maíz. [Tesis de licenciatura] Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Dionet A.D y Magalhaes A.C. (1997). Growth and nitrite production by *Azospirillum* strains subjected to different levels of dissolved oxygen in the medium. *Soil biology Biochemistry* 29 (11-12): 1743-1746.

Erute Magda Ogbo (2009). Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants- *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* 8 (2): 250-253

Fatima M. Bento a, Flávio A.O. Camargo a, Benedict C. Okeke b y William T. Frankenberger (2005). Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology* 96: 1049–1055.

Holguin G., Bashan Y., Puente E., Carrillo A., Bethlenfalvay G., Rojas A., Vázquez P., Toledo G., Bacilio Jiménez M. , Bernard R. Glick, Luz González de Bashan, Vladimir Lebsky , Manuel Moreno y Hernández Juan Pablo (2003). Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura técnica en México* vol 29 (2): 201-211.

Kechavarzi Cedric, Karin Pettersson, Peter Leeds-Harrison, Laurie Ritchie, Stig Ledin (2007). Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution* 145: 68-74.

Kucharski J. Wyszowska J Waidowska E. (2002). The influence of diesel oil contamination on soil enzymes activity. *Rostlinna Vyroba*; 48: 58-62.

Kuiper Irene, Ellen L. Lagendijk, Guido V. Bloemberg, y Ben J. J. Lugtenberg (2004). Rhizoremediation: A Beneficial Plant-Microbe Interaction. *MPMI*. 17 (1): 6–15.

Kvesitadze G., Gordeziani M., Khatisashvili G., Sadunishvili y Ramsden J. (2001). Some aspects of the enzymatic basic of phytoremediation. *J Biol Phys. Chen* 1: 49-57.

López Martínez S., Gallegos Martínez M.E., Pérez Flores L.J. y Gutiérrez Rojas M (2005). Mecanismos de fitorremediación en suelos contaminados con moléculas orgánicas Xenobioticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21 (2): 91-100.

Marrero Coto J., Amores Sánchez A. y Coto Pérez O. (2012) Fitorremediación, una tecnología que involucra plantas y microorganismos en el saneamiento ambiental. *ICIDCA. Sobre los derivados de la caña de azúcar* 46 (3): 52-61

Martínez Carrera Maribel (2016). Evaluación de inoculante mixto para la biorremediación en suelos contaminados con diésel. [Tesis de licenciatura] Facultad de Ingeniería Química, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Martinez M. Victor E.y Lopez S. Felipe (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelos arcillosos. *Terra* 19 (1): 9-17.

McCown B.H., Deneke F.J., Richard W. E. y Tierzen L. (1972). The response of Alaskan terrestrial plant communities to the presence of petroleum. *Environ. Pollut.* 1: 34-43

Muhammad Afzal, Sumia Khan, Samina Iqbal, Muhammad Sajjad Mirza y Qaiser M. Khan (2013): Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofirmans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated., *International Biodeterioration and biodegradation* 85: 331-336.

NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Que establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Publicado en el Diario Oficial de la Federación el 23 de agosto 2010

Ochoa, D. C. y Montoya, A. (2010). Consorcios microbianos: Una metáfora biológica aplicada a la sociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias. *Revista de la Facultad de Ciencias Económicas: Investigación y reflexión*, 28(2): 55-74

Ogbo Erute Magdalene (2009). Effects of Diesel fuel contamination on seed germination of four crops plants- *Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal of Biotechnology* .8 (2): 250-253.

Ortínez B.O. Lema I.I y Gavilán G.A (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta ecológica* 69: 83-92.

Ortíz, L., Monterrosas, M., Yañez, G. y Sanchez, E., (2001). Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Contaminación ambiental*, 17(3), pp. 147-155.

Pazos, M. (2000). Aislamiento e identificación de cepas nativas, pertenecientes al género *Azospirillum* mediante técnicas moleculares. [Tesis de Maestría]. Facultad de biología. Universidad de la Habana.

Perez Vargas J., García Esquivel G. y Esparza Garcia F. (2002). Papel ecológico de la flora rizosferica en fitorremediacion. *Avance y Perspectiva*, 21: 297-300.

Petenello María Cristina, Beltrán Celina y Feldman Susana Raquel (2014). Efecto del agregado de diésel-oil sobre algunos parámetros microbiológicos del suelo con y sin presencia de plantas. *Terra Latinoamericana*, 32 (4): 301-309

Ron E.Z. y Rosenberg E. (2001). Natural roles of biosurfactants. *Environ. Microbil.* 3: 229-236

Saval Susana (1999). Éxitos y fracasos de la remediación de los suelos en sitios contaminados con hidrocarburos. En conservación y restauración de suelos. Siebe C. Conservación y restauración México.

Sutton Nora B., Maphosa Farai, Morillo Jose A., Al-Sound Waleed Abu, Langenhoff Alette A. M. y Grotenhuls Tim (2013). Impact of long-term diesel contamination on soil microbial community structure. *Applied and Environmental Microbiology* 29 (2): 619-630.

Tarrand, J. J., N. R. Krieg, y J. Döbereiner. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov. and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* 24: 967-980

Telysheva G., Dizhbite T., Lebedeva G., Rossinskaja G., Jurkjane V., Treikale O., Yiesturs U. y Daugavietis M.(2002). Lignin- based products stimulating soil phytoremediation. *Acta Biotechnol.* 22: 167-173.

Tesar Maria, Reichenauer Thomas G. y Sessitsch Angela (2002). Bacterial rhizosphere populations of black poplar and herbal plants to be used for phytoremediation of diesel fuel, *Soil Biology & Biochemistry* 34: 1883–1892.

Torres Delgado K. y Zuluaga Montoya T. (2009) Biorremediación de suelos contaminados por Hidrocarburos.[Tesis de licenciatura] Facultad de Minas. Universidad Nacional de Colombia.

Vasudevan N. y P. Rajaram (2001). Biorremediation of soil sludge-contaminated soil. *Environment international* 26: 409-411.

Volke, T. y Velasco, J. (2002). Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Mexico. INE-SEMARNAT.: 27-54

Wang X., Sun C., Gao S., Wang L., Shuoki H. (2001). Validation of Germination Rate and Root Elongation as Indicator to Assess Phytotoxicity with *Cucumis sativus*. *Chemosphere*, 44: 1711-1721.

Zaalishvili G. V., Khatisashvili G. A., Ugrkheldze D. Sh., Gordeziani M. y Sh., Kvesitadze G. I. (2000). Plant potential for detoxification (Review). *Applied Biochemist O' and Microbiolog*; 36 (5): 443-451

Zamora Alejandra, Ramos Jesús y Arias Marianela (2012) Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 24 (1): 5-12.