



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL
TRÓPICO

LA ECOTOXICIDAD Y EL PASTO JAPONESA (*Leersia* sp.)
EN LA FITORREMEDIACIÓN DE UN GLEYSOL
CONTAMINADO CON PETRÓLEO FRESCO,
INTEMPERIZADO Y SULFATOS

ALFREDO ARIAS TRINIDAD

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2012

La presente tesis titulada: “La ecotoxicidad y el pasto japonesa (*Leersia* sp.) en la fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco, intemperizado y sulfatos”, realizada por el alumno Alfredo Arias Trinidad, bajo la dirección del Consejo Particular Indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejera de tesis:



Dra. María del C. Rivera Cruz

Asesor:



Dr. Lorenzo Armando Aceves Navarro

Asesor:



Dr. Roberto Quintero Lizaola

H. Cárdenas, Tabasco. 10 de Diciembre del 2012

La presente tesis titulada “**La ecotoxicidad y el pasto japonesa (*Leersia sp.*) en la fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco, intemperizado y sulfato**”, fue dirigida por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

Este estudio fue financiado por el “Fideicomiso revocable de administración e inversión No 167304 para el establecimiento y operación de los fondos para la investigación científica y desarrollo tecnológico del centro público Colegio de Postgraduados”, en la modalidad de tesis de maestría.

LA ECOTOXICIDAD Y EL PASTO JAPONESA (*Leersia* sp.) EN LA
FITORREMIEDIACIÓN DE UN GLEYSOL CONTAMINADO CON PETRÓLEO
FRESCO, INTEMPERIZADO Y SULFATOS

Alfredo Arias Trinidad

Colegio de Postgraduados, 2012

El estudio de ecotoxicidad y fitorremediación de un Gleysol (GL) contaminado con petróleo fresco (PF) e intemperizado (PI) y sulfatos solubles ($S-SO_4$), se realizó para seleccionar indicadores de toxicidad biológicos, evaluar el potencial del pasto japonesa (PJ) en la descontaminación de estos suelos, la presencia de $S-SO_4$ en su interacción con los hidrocarburos, las bacterias sulfato reductoras y actividad enzimática de la arilsulfatasa (ASA). Dos GLs se usaron para establecer los bioensayos (BIO). El BIO1 con nueve tratamientos [T1: 2 607 (biogénico), T2: 6 000, T3: 10 000, T4: 30 000, T5: 60 000, T6: 90 000, T7: 120 000, T8: 150 000 y T9: 180 000 $mg\ kg^{-1}$ suelo seco de hidrocarburos totales de petróleo fresco (HTPF)]. El BIO2 con seis tratamientos [T1: 2 607 (biogénico), T2: 14 173, T3: 28 400, T4: 50 598, T5: 75 492 y T6: 112 142 $mg\ kg^{-1}$ hidrocarburos totales del petróleo intemperizados (HTPI)]. Cada tratamiento con ocho repeticiones, un muestreo de cuatro a los tres y seis meses. En cada muestreo se evaluó; la longitud de estolones (LE), diámetro de hijuelos (DH), la producción de la biomasa seca (radical, foliar y total); la microflora rizosférica [densidad de bacterias fijadoras de N_2 de vida libre totales (BFN), grupo *Azospirillum* spp. (AZP), *Azotobacter* spp. (AZT), sulfato reductoras (BRS) y el grupo *Desulfuvibrio* (DSV)], la actividad enzimática ureasa (USA), ASA, la descontaminación de HTP (%DSC) y el contenido de $S-SO_4$. Se aplicó a cada variable análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $p \geq 0.05$) con SPSS versión 20 (SPSS, 2011). Los índices de toxicidad absolutos (fisiológicos, microbianos y enzimáticos), se calcularon con la sumatoria de $IRIA=1-[(Tp\ R1)/Tt]$. El crecimiento y desarrollo del PJ en los BIOS a los tres y seis meses manifestó estimulación positiva por las dosis de PF y PI, sin embargo los índices de toxicidad absoluto a los seis meses indican que la LE, AZP, AZT y la ASA son bioindicadoras de la ecotoxicidad de GLs con PF y PI. La % DSC de hidrocarburos en ambos tiempos fue localizada en el total de tratamientos de ambos BIOS, pero a los seis meses con una relación inversamente proporcional a la dosis de PF y PI, la mayor DSC 87 y 86% se localizó en suelos con 6 000 $mg\ kg^{-1}$ HTP (BIO1;T2) y 14 173 $mg\ kg^{-1}$ HTPI (BIO2;T2). Los $S-SO_4$ son directamente proporcional a las dosis de PF y PI. La producción de biomasa seca PJ fue estimulada por la presencia de ambos petróleos, en su rizósfera se establecen las BFN y las actividades enzimáticas de la ureasa y arilsulfatasa, por lo tanto este pasto es fitorremediador y puede contribuir a la sustentabilidad de humedales con uso forrajero y contaminados con petróleo.

Palabras clave: petróleo, sulfatos, bacterias, enzimas, degradación.

ECOTOXICITY AND JAPANESE GRASS (*Leersia* sp.) IN PHYTOREMEDIATION OF GLEYSOL CONTAMINATED A SULFATES, FRESH AND WEATHERED PETROLEUM

Alfredo Arias Trinidad
Colegio de Postgraduados, 2012

The study of ecotoxicity and phytoremediation of Gleysol (GL) contaminated with fresh petroleum (PF) and weathered petroleum (PI) and soluble sulfates (S-SO₄), was held to select biological indicators of toxicity, evaluate the potential of Japanese grass (PJ) in the decontamination of these soils, the presence of S-SO₄ in their interaction with hydrocarbons, sulfate-reducing bacteria and enzymatic activity of arylsulfatase (ASA). Two GLs were used to establish the bioassay (BIO). The BIO1 with nine treatments [T1: 2607 (biogenic), T2: 6000, T3: 10 000, T4: 30 000, T5: 60 000, T6: 90 000, T7: 120 000. T8: T9 150 000 and 180 000 mg kg⁻¹ dry soil total petroleum hydrocarbon fresh (HTPF)]. The BIO2 with six treatments [T1: 2607 (biogenic), T2: 14 173, T3: 28 400, T4: 50 598, T5: T6 75 492 and 112 142 mg kg⁻¹ total petroleum hydrocarbons weathered (HTPI)]. Each treatment with eight repetitions, a sample of four at three and six months. Each sample was evaluated, the length of stolons (LE), tiller diameter (DH), the production of dry biomass (stem, leaf and total), the rhizosphere microflora [density of N₂ fixing bacteria free-living total (BFN), group *Azospirillum* spp. (AZP), *Azotobacter* spp. (AZT), sulfate reducing (BRS) and the group *Desulfuvibrio* (DSV)], urease enzyme activity (USA), ASA, decontamination of HTP (% DSC) and the S-SO₄ content. Each variable was applied to analysis of variance and comparison of means (Tukey, p≤0.05) with SPSS version 20 (SPSS, 2011). Absolute toxicity indices (physiological, microbial and enzymatic) were calculated with the sum of IRIA=1-[(Tp R1)/Tt]. The growth and development of the PJ in the BIOS to the three and six months showed positive stimulation doses of PF and PI, however the absolute toxicity rates at six months indicate that the LE, AZP, AZT and ASA are bioindicators ecotoxicity of GLs with PF and PI. The % DSC of hydrocarbons in both halves was found in total BIOS both treatments, but at six months with an inverse relationship to the dose of PF and PI, most DSC 87 and 86 % was found in soils with 6 000 mg kg⁻¹ TPH (BIO1; T2) and 14 173 mg kg⁻¹ HTPI (BIO2; T2). The S-SO₄ are directly proportional to the dose of PF and PI. The PJ dry biomass production was stimulated by the presence of both oils in their rhizosphere down BFN and enzyme activities of urease and arylsulfatase, so the grass is phytoremediation and may contribute to the sustainability of wetland forage use and oiled.

Keywords: oil, sulfates, bacteria, enzymes, degradation.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico, la cual forma parte de mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por la oportunidad otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias y llevar a cabo la investigación en sus instalaciones.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, profesora investigadora del *Campus* Tabasco, encargada del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, quien dedicó su tiempo, paciencia, apoyo y sobre todo su valiosa enseñanza para dirigir desde el comienzo el proyecto de investigación hasta la culminación del mismo.

Al Dr. Lorenzo Armando Aceves Navarro por sus consejos, apoyo y sugerencias realizadas en cada etapa de la tesis y mi formación académica.

Al Dr. Roberto Quintero Lizaola por su apoyo, paciencia y su valiosa aportación para el desarrollo de la investigación y documentación de la tesis.

Al Dr. Antonio Roldan Carrillo por la confianza, disposición y sugerencias durante mi estancia en el Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), Murcia, España. A su equipo de trabajo Manolo J. Campoy, Asunción Molina, Carmen Mengual y Emma Torrecilla, María del Mar Alguacil y Pilar Torres, por su apoyo, paciencia y amistad.

A mis padrinos Lola López, Mauricio Schoebitz y Gustavo Curaqueo, por su comprensión, consejos y ayuda durante mi estancia en Murcia.

Al M.C. Antonio Trujillo Narcía por su valioso trabajo, motivación y apoyo durante mis dos años de maestría. Sus consejos nunca los olvidaré.

A la M.C. Ana Guadalupe Ramírez May, el Ing. Miguel Ángel Ble Romero y Pablo Chable Gómez por su apoyo valiosa ayuda durante el proyecto de investigación. A las chicas de servicio social Angélica Ramírez Broca, Adela Hernández Díaz, Cecilia Vázquez Cupido, Margarita Esmeralda Espindola Torres y Keyla Rodríguez López por su colaboración, trabajo y apoyo en las diferentes etapas de la investigación.

A dos grandes amigas, la Ing. Cristabel Zarate Gonzáles y Deysi Guadalupe Cornelio Fuentes por su amistad incondicional, valioso trabajo y apoyo moral, durante mi maestría y proyecto de investigación.

DEDICATORIA

Agradezco y dedico mi tesis de maestría a Dios, él me ha enseñado que no hay errores, no hay coincidencias. Todos los eventos son bendiciones que se nos dan para aprender de ellas.

A mis padres, Mayra Trinidad Ulín y Alfredo Arias Arias por su apoyo incondicional y consejos en cada momento de mi existir, su amor es algo que mantengo en mi corazón y cada día se refuerza más.

¡Papá te amo y recuerdo cada día de mi vida!

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	vi
DEDICATORIA	vii
CONTENIDO	viii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN	1
SECCIÓN II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. El ecosistema y ecotoxicidad del petróleo	3
2.2. Definición, tipo y composición química del petróleo	4
2.2.1. Petróleo fresco	4
2.2.2. Metales pesados y componentes inorgánicos del petróleo fresco	6
2.2.3. El petróleo intemperizado	7
2.3. Efectos de la contaminación del petróleo fresco e intemperizado en el ecosistema	8
2.3.1. Cambios físicos y químicos del suelo por la presencia del petróleo fresco	8
2.3.2. Efectos del petróleo sobre las plantas y la microflora del suelo	10
2.3.3. El petróleo y su efecto con la actividad enzimática del suelo	11
2.4. Efectos de la contaminación del petróleo intemperizado en el ecosistema	12
2.5. El azufre en el suelo	12
2.5.1. Sulfatos y su efecto en el suelo	13
2.6. Teoría de la toxicidad	13
2.7. Bioindicadores de toxicidad	15
2.7.1. Bioindicadores fisiológicos	15
2.7.2. Bioindicadores rizosféricos	18
2.7.2.1. Bioindicadores bacterianos en rizósfera	19
2.7.2.2. Bacterias y sus interacciones con la rizósfera	19
2.7.2.2.1. Bacterias fijadoras de Nitrógeno	19
2.7.2.2.2. Bacterias sulfato-reductoras	20
2.7.2.3. Bioindicadores enzimáticos	21
2.7.2.3.1. Actividad enzimática de la ureasa	22
2.7.2.3.2. Actividad enzimática de la arilsulfatasa	22
2.8. Técnicas de remediación biológica para suelos contaminados con petróleo.	23
2.8.1. Remediación biológica	24
2.8.2. Fitorremediación y mecanismos de degradación	25
2.8.2.1. Gramíneas y su actividad fitorremediadora	26
2.9. Reacciones de óxido-reducción en la biorremediación de hidrocarburos del petróleo y sulfatos	29
2.9.1. Óxido-reducción de hidrocarburos del petróleo	29
2.9.2. Reducción del sulfato	31
2.9.3. Oxidación del azufre reducido hasta sulfato	31
SECCIÓN III. OBJETIVOS	32
3.1. Objetivo general	32

3.1.1. Objetivos particulares _____	32
SECCIÓN IV. HIPÓTESIS _____	33
4.1. Hipótesis general _____	33
4.1.1. Hipótesis particulares _____	33
SECCIÓN V. MATERIALES Y MÉTODOS _____	34
5.1. Etapa I. Trabajo de campo e invernadero _____	35
5.1.1. Colecta de suelos _____	35
5.1.2. Análisis físicos y químicos del suelo _____	37
5.1.3. Preparación de materiales para las pruebas de fitotoxicidad y fitorremediación _____	39
5.1.3.1. Material vegetal _____	39
5.1.3.2. Características morfológicas _____	39
5.1.3.3. Propagación de material vegetal _____	40
5.1.3.4. Petróleo fresco y contenedores _____	40
5.1.4. Establecimiento de bioensayos de fitotoxicidad y fitorremediación de petróleo fresco e intemperizado _____	41
5.1.4.1. Preparación de unidades experimentales _____	43
5.4.1.2. Variables fisiológicas de pasto japonesa en invernadero _____	43
5.2. Etapa II. Trabajo de laboratorio _____	45
5.2.1. Materia seca de pasto japonesa _____	45
5.2.2. Variables microbiológicas en la rizósfera de pasto japonesa _____	45
5.2.2.1. Densidad de bacterias fijadoras de N ₂ de vida libre _____	45
5.2.2.2. Determinación de bacterias sulfato reductoras _____	46
5.2.3. Variables bioquímicas _____	48
5.2.3.1. Actividad enzimática ureasa _____	48
5.2.3.2. Actividad enzimática arilsulfatasa _____	50
5.2.4. Análisis químicos _____	53
5.2.4.1. Determinación turbidimétrica de sulfatos como BaSO ₄ _____	53
5.3. Etapa III. Análisis estadístico _____	55
5.3.1. Índices absolutos y relativos de impacto ambiental _____	55
SECCIÓN VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN _____	56
6.1. Crecimiento y biomasa vegetal del pasto japonesa _____	56
6.1.1. Longitud de estolones _____	56
6.1.2. Número de hijuelos _____	58
6.1.3. Diámetro de hijuelos _____	62
6.1.4. Producción de la biomasa _____	63
6.1.4.1. Biomasa seca radical _____	63
6.1.4.2. Biomasa seca foliar _____	65
6.1.4.3. Biomasa seca total _____	65
6.2. Población bacteriana de la rizósfera del pasto japonesa _____	66
6.2.1. Densidad de bacterias fijadoras de N ₂ de vida libre totales _____	66
6.2.2. Densidad de bacterias del grupo Azotobacter _____	68
6.2.3. Densidad de bacterias del grupo Azospirillum _____	68
6.3. Actividad enzimática _____	69
6.3.1. Actividad enzimática ureasa _____	69

6.3.2. Actividad enzimática arilsulfatasa	70
6.4. Índices de impacto ambiental toxicológico	71
6.4.1. Índices fisiológicos de toxicidad	71
6.4.1.1. Índices fisiológicos de toxicidad relativos	71
6.4.1.2. Índices fisiológicos de toxicidad absolutos	75
6.4.2. Índices de impacto bacteriano	77
6.4.2.1. Índices bacterianos de toxicidad relativos	77
6.4.2.2. Índices bacterianos de toxicidad absolutos	79
6.4.3. Índices de impacto enzimático	80
6.4.3.1. Índices enzimáticos de toxicidad relativa	80
6.4.3.2. Índices enzimáticos de toxicidad absoluto	81
6.5. Degradación de petróleo en suelo y rizósfera del pasto japonesa	83
6.5.1. Bacterias rizoféricas del pasto japonesa en la degradación de los hidrocarburos del petróleo	84
6.5.2. Actividad enzimática en rizósfera del pasto japonesa en la degradación de los hidrocarburos del petróleo	88
6.5.2.1. Actividad enzimática ureasa en la degradación de los hidrocarburos petróleo	88
6.5.2.2. Actividad enzimática arilsulfatasa en la degradación de petróleo crudo	91
6.5.3. Relación de la descontaminación de petróleo con parámetros fisiológicos, microbianos y enzimáticos.	94
6.6. Los sulfatos, bacterias sulfato reductoras y actividad enzimática en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado	97
6.6.1. Los sulfatos y su respuesta en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado	97
6.6.2. Relación de contenidos de sulfatos con la densidad de bacterias sulfato reductoras y la enzima arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado	100
6.6.3. La relación de sulfatos y la actividad enzimática en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado	103
SECCIÓN VII. CONCLUSIONES	106
7.1. Conclusión general	106
7.2. Conclusiones particulares	106
SECCIÓN VIII. APÉNDICES	108
8.1. Análisis de varianza de la respuesta de las variables fisiológicas, microbianas y bioquímicas del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco	108
8.2. Análisis de varianza de la respuesta de las variables fisiológicas, microbianas y bioquímicas del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado	119
SECCIÓN IX. LITERATURA CITADA	130

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Antecedentes del uso de gramíneas como bioindicadores_____	17
Cuadro 2.	Antecedentes del uso de gramíneas como especies fitorremediadoras_____	28
Cuadro 3.	Propiedades físicas y químicas del suelo testigo (sin petróleo) y de cinco suelos con petróleo intemperizado_____	38
Cuadro 4.	Tratamientos del bioensayo con petróleo fresco_____	42
Cuadro 5.	Tratamientos del bioensayo con petróleo intemperizado_____	42
Cuadro 6.	Producción de biomasa seca de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses_____	63
Cuadro 7.	Porcentaje de daño y estimulación de la producción de biomasa de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses_____	64
Cuadro 8.	Densidad de bacterias fijadoras de N ₂ de vida libre y grupos (<i>Azospirillum</i> y <i>Azotobacter</i>) de la rizósfera de pasto japonesa en suelos con hidrocarburos derivados del petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses_____	67
Cuadro 9.	Actividad enzimática de la rizósfera de pasto japonesa en suelo con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses_____	70
Cuadro 10.	Índices relativos de impacto ambiental fisiológicos del pasto japonesa expuestos a petróleo fresco e intemperizado a los tres meses de exposición_	72
Cuadro 11.	Índices relativos de impacto ambiental fisiológicos del pasto japonesa expuestas a petróleo fresco e intemperizado, a los seis meses de exposición_	73
Cuadro 12.	Índices bacterianos de toxicidad relativos del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses de exposición_____	78
Cuadro 13.	Índices enzimático de toxicidad relativa en la rizósfera del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses de exposición_____	81
Cuadro 14.	Descontaminación de petróleo fresco e intemperizado en suelo y rizósfera del pasto japonesa, a los tres y seis meses_____	83
Cuadro 15.	Correlación del porcentaje de descontaminación y las variables fisiológicas, microbianas y enzimáticas en suelos con petróleo fresco, a los tres y seis meses_____	95
Cuadro 16.	Correlación del porcentaje de descontaminación y las variables fisiológicas, microbianas y enzimáticas en suelos con petróleo intemperizado, a los tres y seis meses_____	96
Cuadro 17.	Contenidos de sulfatos en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses_____	97
Cuadro 18.	Correlación del contenido de sulfatos con bacterias reductoras de sulfatos y arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres y seis meses_____	98
Cuadro 19.	Correlación del contenido de sulfatos con bacterias reductoras de sulfatos y arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres y seis meses_____	99

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco_____	5
Figura 2. Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado_____	7
Figura 3. Esquema grafico de la relación dosis-respuesta_____	14
Figura 4. Influencia e interacción de la rizósfera en el suelo_____	18
Figura 5. Clasificación de tecnologías de remediación_____	23
Figura 6. Clasificación de tecnologías de remediación biológicas_____	24
Figura 7. Flujograma del proceso de investigación_____	34
Figura 8. Ubicación del sitio-1 y sitio-2 para la colecta de suelos_____	36
Figura 9. Ubicación de puntos de muestreo en el sitio-2, en el ejido José Narciso Rovirosa, La Venta, Huimanguillo, Tabasco_____	37
Figura 10. Morfología básica del pasto japonesa_____	40
Figura 11. Esquema de la propagación del pasto japonesa_____	41
Figura 12. Proceso de establecimiento de los bioensayos_____	44
Figura 13. Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar en rizósfera _____	46
Figura 14. Procedimiento para la determinación de las bacterias sulfato reductoras_____	48
Figura 15. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática ureasa_____	50
Figura 16. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática arilsulfatasa_____	52
Figura 17. Procedimiento para la determinación de S-SO ₄ _____	54
Figura 18a. Variación en el crecimiento del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, en tiempo sucesivos después del trasplante _____	57
Figura 18b. Variación en el crecimiento del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, a los seis meses_____	58
Figura 19a. Crecimiento del número de hijuelos del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, en tiempo sucesivo después del trasplante _____	60

Figura 19b. Crecimiento del número de hijuelos del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, a los seis meses_____	61
Figura 20. Diámetro de hijuelos de pasto japonesa en suelo con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses_____	62
Figura 21. Índice fisiológico de toxicidad absoluta del pasto japonesa a los tres y seis meses en suelos con petróleo fresco_____	76
Figura 22. Índice fisiológico de toxicidad absoluta del pasto japonesa a los tres y seis meses en suelos con petróleo intemperizado_____	77
Figura 23. Índice bacteriano de toxicidad absoluto a los tres y seis meses de exposición con petróleo fresco_____	79
Figura 24. Índice bacteriano de toxicidad absoluto a los tres y seis meses de exposición con petróleo intemperizado_____	80
Figura 25. Índice de impacto enzimático absoluto de suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres y seis meses_____	82
Figura 26. Índice de impacto enzimático absoluto de suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres y seis meses_____	82
Figura 27. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los tres meses_____	85
Figura 28. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses_____	86
Figura 29. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres meses_____	86
Figura 30. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses_____	87
Figura 31. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres meses_____	89
Figura 32. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los seis meses_____	89

Figura 33. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres meses _____	90
Figura 34. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses _____	91
Figura 35. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres meses _____	92
Figura 36. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los seis meses _____	92
Figura 37. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres meses _____	93
Figura 38. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses _____	93
Figura 39. La relación de sulfatos y bacterias sulfato reductoras totales en suelos contaminados con petróleo fresco, a los seis meses _____	100
Figura 40. La relación de sulfatos y bacterias del grupo <i>Desulfuvibrio</i> en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses _____	101
Figura 41. La relación de sulfatos y bacterias sulfato reductoras totales en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses _____	102
Figura 42. La relación de sulfatos y bacterias del grupo <i>Desulfuvibrio</i> en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses _____	102
Figura 43. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo fresco, a los tres meses _____	103
Figura 44. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo fresco, a los seis meses _____	104
Figura 45. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo intemperizado, a los tres meses _____	104
Figura 46. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo intemperizado a los seis meses _____	105

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN

El petróleo es una de las fuentes principales de energía a nivel mundial. Los combustibles derivados del petróleo son la base del desarrollo económico y social de un país. Para satisfacer las necesidades del desarrollo de un país, la industria extractiva del petróleo a establecido infraestructura que interactúa con los ecosistemas terrestres que conducen petróleo crudo de los pozos de perforación a las petroquímicas (PEMEX, 2009). Como consecuencia de la extracción, conducción, transporte del petróleo crudo y sus derivados han ocasionado la contaminación del suelo y agua (Banks *et al.*, 2003a). Los suelos con hidrocarburos del petróleo derivados del petróleo fresco y del petróleo intemperizado representan riesgos a la salud y al ambiente (Mohsenzade *et al.*, 2009; Diab, 2008).

La ecotoxicidad de los suelos con petróleo fresco e intemperizado ha sido reportado por diversos investigadores, se hace referencia a la respuesta de plantas, organismos y procesos bioquímicos de ecosistemas tropicales, entre las plantas que indican síntomas de toxicidad se localizan a las leguminosas y pastos (Rivera *et al.*, 2005; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía 2004), organismos como la microflora de la rizósfera; bacterias de los grupos fijador de N₂ de vida libre, *Azospirillum*, *Azotobacter* y hongos heterótrofos y procesos bioquímicos como la actividad enzimática de la ureasa (Ramírez, 2012).

Las manifestaciones toxicas de las plantas, microflora y actividad enzimática al petróleo fresco e intemperizado son distintivas. En planta el petróleo fresco ocasiona la muerte inmediata del follaje y tejidos, decremento en la producción de pigmentos fotosintéticos, reducción de la biomasa aérea y de la raíz, necrosis e incluso la muerte (Adam y Duncan, 2002; Flocco *et al.*, 2002; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda 2012), pero en petróleo intemperizado según Ramírez (2012); Maldonado *et al* (2010); Rivera *et al* (2005), el efecto es menos drástico debido a que disminuye la altura, biomasa aérea y nódulos, pero no ocasiona la muerte.

La microflora rizosférica de los grupos de bacterias; fijadoras de N₂ de vida libre, *Azospirillum* y *Azotobacter* son reportadas por Ramírez (2012) como indicadoras de la toxicidad del petróleo intemperizado, sin embargo Vázquez-Luna *et al.*, 2011, reporta que el grupo de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre, a las 72 horas de exposición al petróleo son indicadoras de la toxicidad, pero no a partir de las 144 horas. La actividad enzimática de la ureasa según Ramírez, 2012 es un proceso bioquímico estimulado por la presencia del petróleo en el suelo, por lo tanto no es un buen indicador de la toxicidad, posible contribuya en la fitorremediación de los contaminantes orgánicos.

Los pastos han sido seleccionados en diversos estudios por su respuesta fitotóxica, por los índices de toxicidad altos basados en la microflora rizosférica (Ramírez 2012) y por la capacidad de crecer y estimular la degradación de los contaminantes del suelo (Sangabriel *et al.*, 2006). Se han usado durante los últimos años en bioensayos para degradar hidrocarburos derivados del petróleo fresco e intemperizado (Maldonado *et al.*, 2010) lo que se conoce como fitorremediación (Cunningham *et al.*, 1996; Chaney *et al.*, 1997; Salt *et al.*, 1998). La fitorremediación se ha definido como una tecnología que usa plantas verdes, microorganismos asociados a la rizósfera y técnicas agronómicas para degradar, contener o transformar los contaminantes orgánicos e inorgánicos en compuestos menos tóxicos (Cunningham y Berti 1993; Cunningham *et al.*, 1996; Frick *et al.*, 1999; Pilon-Smits 2005; Robertson *et al.*, 2007).

Considerando la importancia de la generación de conocimiento ambiental con aplicación regional, nacional e internacional para zonas impactadas por las actividades industriales petroleras, se plantea esta investigación evaluar la ecotoxicidad y fitorremediación de suelos con petróleo fresco e intemperizado utilizando pastos nativos de ecosistemas inundados, su interacción con microflora rizosférica, con actividades enzimáticas y el depósito indirecto de sulfatos en el suelo derivados del petróleo crudo.

SECCIÓN II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El ecosistema y ecotoxicidad del petróleo

El ecosistema es una unidad estructural, de organización y funcional de organismos vivos en donde interactúan con factores bióticos y abióticos (Odum y Barrett, 2006), poseen un equilibrio en su funcionamiento con numerosos mecanismos homeostáticos que les permiten restablecer el equilibrio dinámico (Cerón y Melgarejo, 2005).

Los componentes bióticos del ecosistema son los productores, consumidores y descomponedores e interactúan entre ellos a través de la energía y con los factores abióticos como el aire, luz solar y temperatura en un espacio determinado. Este espacio puede ser terrestre, acuático y atmosférico (Odum y Barrett, 2006).

Un ecosistema es potencialmente amenazado por la irrupción no habitual de factores biológicos, químicos y físico (Capó, 2007). La toxicidad en el ecosistema se manifiesta en la alteración y/o reducción de la productividad del componente vivo; los organismos que habitan en el (Sánchez, 2003). Sin embargo, bajas concentraciones de ciertos contaminantes pueden producir un efecto de estimulación del organismo, este efecto es conocido como hórmesis (Calabrese y Baldwin, 1998; Bohórquez-Echeverry y Campos-Pinilla, 2007).

La ecotoxicología es una rama de la toxicología y es multidisciplinaria; se ocupa en establecer los principios y enfoques que permiten visualizar los efectos de los contaminantes desde el nivel subcelular hasta los niveles de organización biológica superior (ecosistemas); para hacer posible su interpretación en un contexto ecológico (Espina y Vanegas, 1996).

En la ecotoxicidad la materia fundamental es comprender y explicar la persistencia, degradación, potencial de bioacumulación, movilidad del contaminante en el ecosistema, profundizando en los tipos de toxicidad (aguda, crónica y letal) y estrés de los organismos en el ambiente (ONU, 2005).

La contaminación dentro del ecosistema por ejemplo en el suelo, agua y atmosfera es la introducción o incremento anormal de un agente físico y/o sustancias químicas que pueden ser nocivas y perjudiciales para los organismos que habitan un espacio determinado. El incremento de la sustancia es originada por la acción humana o procesos naturales temporales (Bautista, 1999; Capó, 2007).

Los hidrocarburos derivados del petróleo crudo son agentes abióticos que entran al ecosistema, pueden eliminarse sin causar daño alguno y/o dañar a algunos elementos del sistema. El ecosistema pueden recuperarse, adaptarse y/o mutar, sin embargo también después de un tiempo el efecto de la exposición prolongada al contaminante puede desaparecer (Repetto y Sanz, 1995).

2.2. Definición, tipo y composición química del petróleo

La palabra petróleo es una palabra castellana que viene del latín “petróleum” (petra: piedra y óleum: aceite), es decir aceite de piedra (Garritz, 2001; IMP, 2010). La identificación del petróleo crudo en el ecosistema, se propone considerar el tiempo de exposición a factores ambientales, por lo que se clasifica en petróleo fresco y petróleo intemperizado.

2.2.1. Petróleo fresco

El petróleo fresco es el crudo recién extraído de un yacimiento. Es una mezcla compleja que presenta carbono e hidrógeno en un porcentaje aproximado del 90% (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005), y cantidades significativas de nitrógeno (8%), azufre (6%) y oxígeno (1.8%), así como trazas de metales pesados (V, Ni, Pb, Fe) (Kirk-Othmer, 2001; Cuervo, 2001) (Figura 1). Con variación en la composición según la edad de su formación y el lugar de procedencia, puede manifestar cualquiera de los tres estados de la materia: sólido (asfalto), líquido (aceite) y gaseoso (Figueruelo y Marino, 2004).

El petróleo crudo contiene presenta cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados, aromáticos, asfáltenos y resinas (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Gary y Handwerk, 2003) (Figura 1).

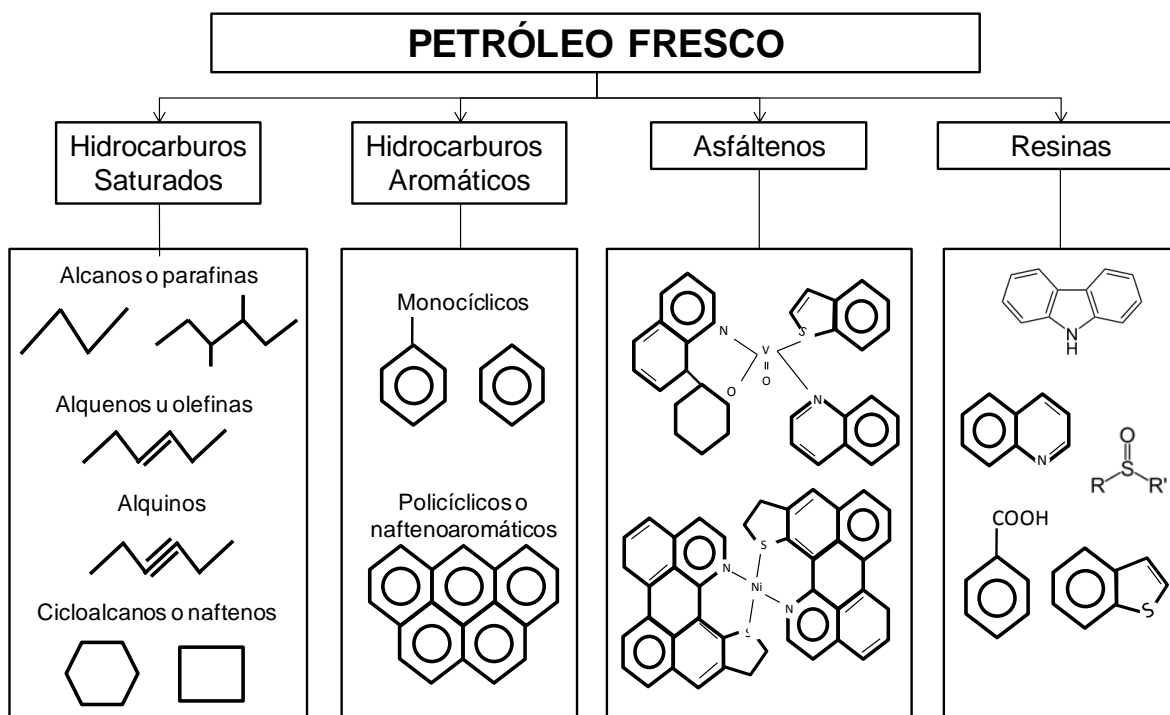


Figura 1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005; IMP, 2010)

Los hidrocarburos saturados (C_nH_{2n+2}) agrupan a los alcanos y cicloparafinas (Rivera-Cruz *et al.*, 2002); Pueden dividirse en parafinas normales (compuestos de cadena lineal, n -alcanos), saturados en cadenas ramificadas y saturados cíclicos (o naftenos o alicíclicos).

Los Hidrocarburos aromáticos (C_nH_{2n-6}) constituyen el mayor grupo de los hidrocarburos del petróleo. El compuesto aromático base es el benceno, el tiene la estructura de un anillo con tres dobles enlaces de carbono (C_6H_6). (Leung *et al.*, 2007). Además del benceno, existen los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que presentan propiedades aromáticas. En sus estructuras aparecen anillos bencénicos fusionados; algunos como el naftaleno, antraceno, fenantreno, el 1,2-benzopireno, el criseno y naftaceno se aíslan del alquitrán de hulla (Yúfera, 1996).

La fuente más importante de HAP en el ambiente es la combustión incompleta de cualquier material orgánico que contenga carbono e hidrógeno (Mastral y Callen, 2000). El conjunto de HAP muestra una composición molecular diferente, dependiendo de su origen, el cual puede ser diagénico (procesos de alteración química, física o biológica de los sedimentos o rocas sedimentarias a

temperaturas y presiones relativamente bajas), pirogénico (Procesos de quema de materia orgánica como carbón, crudo y madera), biogénico (resultado de la actividad microbiana y de animales y vegetales) o petrogénico (derivados del petróleo) (Ortiz *et al.*, 2007).

Los asfáltenos (laminas poliaromáticas condensadas) incluye en su estructura agregados poliaromáticos, fenoles, ácidos grasos y metaloporfirinas; las resinas se constituyen por compuestos piridínicos, quinolinas, tofenos, carbazoles, sulfoxidos y aminas (Fernández *et al.*, 2006b).

El estado gaseoso de los hidrocarburos depende del tamaño de sus moléculas, del punto de fusión y ebullición. Por ello, los primeros miembros son gaseosos a temperatura ambiente, mientras que los restantes son líquidos o sólidos (Garritz, 2001).

La mezcla gaseosa que se halla en los yacimientos de petróleo se denomina gas natural, está compuesta en un 70% por metano, además de hidrocarburos saturados como etano, propano, butano, pentano y pequeñas proporciones de gases inertes, tales como anhídrido carbónico, nitrógeno y, en algunos casos ácido sulfhídrico, vapor de agua y agua libre, aunque la proporción de estos componentes raras veces supera el 15% (Primo, 1995).

2.2.2. Metales pesados y componentes inorgánicos del petróleo fresco

Los metales pesados (Fe, Cr, Zn, Pb, Cu, Ni y V) se encuentran presente en el petróleo, al formar parte de compuestos orgánicos denominados organometálicos (Yúfera, 1994). El Ni y V, son los elementos metálicos más abundantes y en ocasiones pueden alcanzar altas concentraciones, pueden estar libres o en los núcleo de las porfirinas (Clark y Brown, 1977 cita Botello, 2005).

Los compuestos oxigenados del petróleo, se componen por alcoholes, esterés, éteres, cetonas y furanos, de los que destacan los fenoles y ácidos alifáticos, por sus funciones ácidas como los ácidos nafténicos (ácidos de alcohilcicloparafinas). El contenido de estos compuestos es superiores al 0.06% del petróleo crudo (Vian, 2006; IMP, 2011).

Los compuestos nitrogenados existen como máximo en proporción de un 0.5%. Se trata de bases orgánicas como pirrol, indol, carbazol, benzocarbazol, piridina, quinoleína, indolina y benzoquinoleina (Vian, 2006; IMP, 2011).

Los compuestos de azufre son de gran importancia, no sólo por su cantidad (0.5 a 5%), la corrosión, el olor y otras propiedades indeseables a las fracciones petrolíferas, que obligan a su depuración (Vian, 2006). EL azufre en el petróleo puede estar presente en forma inorgánica: S elemental, ácido sulfhídrico (H₂S), sulfuro de carbonilo (oxisulfuro de carbono) COS o formando parte de moléculas orgánicas tales como: sulfuros, disulfuros, mercaptanos, tiofenos, benzotiofenos y dibenzotiones (Wauquier, 2004), y hasta en fracciones sólidas como los asfaltos y compuestos resinosos de alto peso molecular disueltos en el aceite (Vian, 2006).

2.2.3. El petróleo intemperizado

El petróleo intemperizado, es un petróleo crudo (fresco) que es sometido en la superficie del suelo a un proceso de meteorización al menos durante 20 años (Botello, 1996; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004). Constituido sólo de hidrocarburos saturados ramificados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, asfáltenos y resinas (Figura 2).

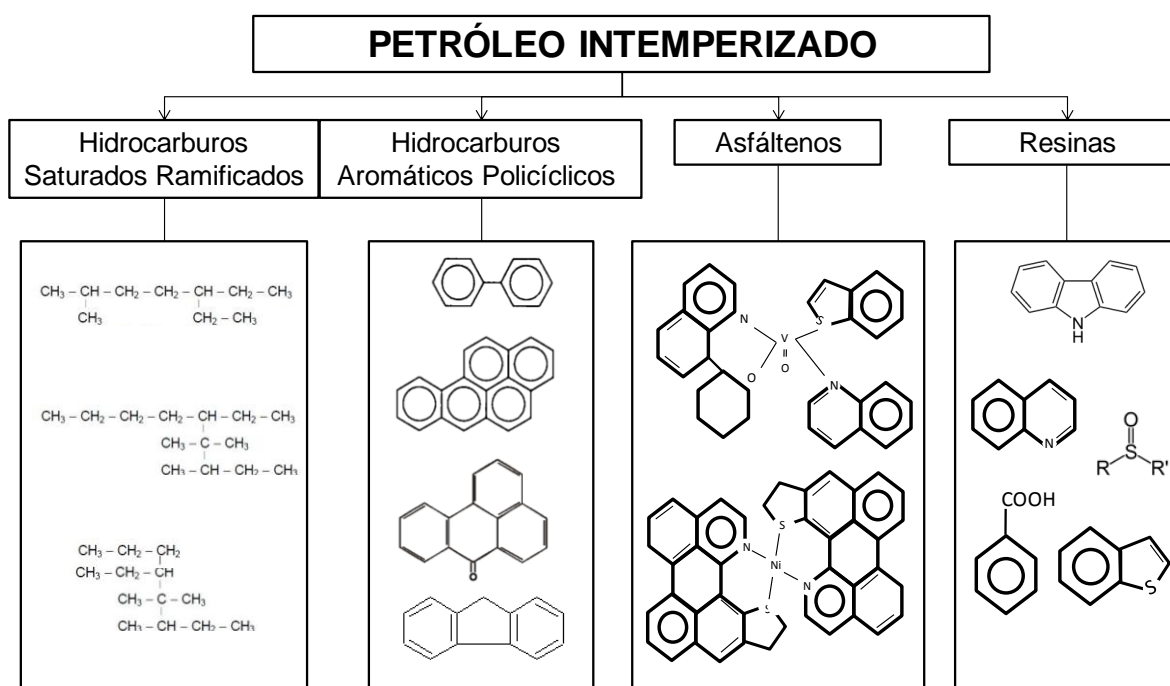


Figura 2 Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado.

La OMI (2005), indica que el petróleo fresco al estar en la atmosfera de manera accidental o premeditada, da lugar a las siguientes fases:

i) Fase de expansión que tiene lugar tanto en superficie como en profundidad; en esta fase se produce una gran mortandad de organismos vivos; ii) Fase de estabilización de los contaminantes que puede durar entre seis meses y un año dependiendo de la naturaleza de los contaminantes, de los ecosistemas y de las condiciones meteorológicas; iii) Fase de reconstitución que es la más larga, y que en climas templados dura más de 10 años y iv) El tiempo de duración de una mancha de petróleo dependerá de la proporción de los componentes volátiles que tenga y de la temperatura (Capó, 2007).

El petróleo intemperizado (PI), es una mezcla de compuestos recalcitrantes (resistencia a la degradación) del petróleo fresco (Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005). Se compone principalmente de: hidrocarburos saturados de cadena larga, compuestos cíclicos y policíclicos (OMI, 2005); hidrocarburos aromáticos (> 5 anillos) e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Rivera-Cruz *et al.*, 2002); asfáltenos y resinas son mezclas de hidrocarburos que se encuentran en las fracciones pesadas (compuestos de elevado peso molecular) de los crudos y de los productos refinados pesados (Fernández *et al.*, 2006b).

La naturaleza hidrófoba de los hidrocarburos recalcitrantes (compuestos cíclicos, aromáticos, asfaltos y resinas) del petróleo intemperizado, complican su degradación, debido a la absorción de los hidrocarburos a la matriz del suelo y así, disminuye la velocidad y el grado de degradación de los hidrocarburos (Chi-Yuan y Krishnamurthy, 1995; Maletic *et al.*, 2011).

2.3. Efectos de la contaminación del petróleo fresco e intemperizado en el ecosistema

2.3.1. Cambios físicos y químicos del suelo por la presencia del petróleo fresco

El petróleo fresco al entrar en contacto con los componentes del suelo ocasiona cambios en los procesos físicos, químicos y biológicos (López *et al.*, 2006). Esto puede dirigir al deterioro de la estructura del suelo, pérdida de la materia orgánica y minerales (Akubugwo *et al.*, 2009), Además, de afectar las cadenas alimentarias y diversas actividades humanas (Annunciado *et al.*, 2005), así como su latente toxicidad y cualidades cancerígenas y mutagénicas (Caravaca y Roldán, 2003).

Entre los cambios físicos se reporta son:

Las películas de petróleo existentes en la superficie del suelo, reducen la transmisión de luz. Igual que retardan la adsorción y reducen el contenido de oxígeno (López *et al.*, 2006).

Cuando los hidrocarburos se acumulan o son absorbidos por la matriz del suelo, ocasionan la ruptura de los agregados del suelo, modifican su estructura (Ortíz *et al.*, 2003). El contenido de arena aumenta y disminuye el de arcillas, esto en función del tipo y densidad del petróleo. Lo que aumenta la porosidad del suelo (Martínez y López, 2001).

La retención del agua disminuye a causa de las características no polares y la baja polaridad de los hidrocarburos, que al cubrir la superficie del suelos interrumpen la interacción electrostática entre las partículas del suelo y el agua (Adams *et al.*, 2008). Por lo que se genera una retención de agua en la capa superficial del suelo (Ortíz *et al.*, 2003).

Cambios químicos:

La materia orgánica al igual que el contenido de carbón orgánico, se incrementa al retener hidrocarburos totales del petróleo (Zavala *et al.*, 2005). Los contenidos de carbón orgánico del suelo se incrementan por la presencia de los hidrocarburos (Okolo *et al.*, 2005), ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable (Ortíz *et al.*, 2003).

El pH disminuye debido a la acumulación de carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos que provienen del petróleo (Seoáñez, 2000; Manahan, 2007).

Los contenidos de nitrógeno total pueden variar en relación al tipo de petróleo, en suelos contaminados con petróleo intemperizado es bajo, este efecto se atribuye al aumento de las poblaciones microbianas (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Pathak *et al.*, 2011). Sin embargo en suelos con petróleo fresco, puede haber un aumento del N total al modificar la relación C:N propiciando la inmovilización de N, lo que limita el uso para los microorganismos como sustrato (Solís y López, 2003; Agbogidi y Enujike, 2012).

El contenido de fósforo (P) en suelos contaminados con petróleo puede variar en relación al tipo de petróleo y contenido de la humedad (Dorantes, 2010). Caravaca y Roldán (2003) indican que la presencia del petróleo disminuye el contenido de P. sin embargo, Wyszkowski y Wyszowska (2005) observaron un aumento en los contenidos de fósforo en suelos con hidrocarburos de un derrame reciente.

El incremento de la salinidad, aunque no es directamente por los hidrocarburos se atribuye al agua de formación o producción de alto contenido de sales disueltas proveniente de las formaciones geológicas. Esta agua puede alterar la conductividad eléctrica y a veces el pH con mas gravedad en zonas áridas o no húmedas (Adams *et al.*, 2008).

2.3.2. Efectos del petróleo sobre las plantas y la microflora del suelo

Los efectos nocivos de los hidrocarburos sobre las plantas y microflora pueden ser indirectos o directos, por su interacción con los componentes abióticos y microbianos del suelo (Wang y Bartha, 1994). Los efectos

Efectos tóxicos en plantas. Las plantas son vulnerables a la presencia del petróleo fresco por los cambios físicos y químicos que suceden en el suelo. Los hidrocarburos del petróleo inhiben la germinación y crecimiento de las plantas (López *et al.*, 2006), quemaduras en las hojas, defoliación, caída de frutos (Herrera, 1961), necrosis vegetal por intoxicación de los compuestos aromáticos de bajo peso molecular, cuando estos dañan las membranas celulares de las raíces (Olguín *et al.*, 2007). Quiñones-Aguilar *et al.* (2003) atribuyen este efecto a la capa hidrofóbico de petróleo que cubre la raíz, la cual limita la absorción de agua y nutrimentos.

La toxicidad de los hidrocarburos en la vegetación, no sólo es condición de los factores abióticos o bióticos del ecosistema, sino de las características morfológicas y fisiológicas de la especie vegetal (Tang *et al.*, 2011). La altura, germinación, número de nódulos y producción de la biomasa (radical y foliar) son características fisiológicas sensibles a la toxicidad de los hidrocarburos (Ramírez, 2012).

El nivel de toxicidad de los hidrocarburos en las plantas, sigue un orden descendente y el cual inicia con los monoaromáticos >olefinas >naftalenos >parafinas. La toxicidad se correlaciona de forma directa al aumentar la polaridad del compuesto e inversa a mayor peso molecular (Wang y Bartha, 1994).

Efectos tóxicos en la microflora del suelo. El efecto general de los hidrocarburos del petróleo en la comunidad microbiana han sido reportados por diferentes investigadores, e indican un efecto de aumento y/o disminución de microorganismos según el tipo de petróleo y el tiempo de derrame en el sitio. Al respecto Wang y Bartha, (1994) indica que los compuestos del petróleo influyen en el número, composición, biomasa y actividad microbiana existente en el suelo.

Los hidrocarburos del petróleo pueden aumentar la permeabilidad de la membrana celular, al acumularse en las capas lipofílicas. De este modo los asfáltenos y compuestos alifáticos de alto peso molecular e hidrofóbicos no son perjudiciales. Por el contrario, compuestos aromáticos y alifáticos de bajo peso molecular y alta solubilidad en agua son asociados a una toxicidad aguda (Maier *et al.*, 2000). Sin embargo existen microorganismos que se adaptan y utilizan como fuente de carbono los hidrocarburos y, así incrementar su actividad metabólica bajo estas condiciones (Labud *et al.*, 2007).

La degradación microbiana de los componentes del petróleo, puede ocasionar daños potencialmente tóxicos (Trindade *et al.*, 2005). La biodegradación de los compuestos deja productos intermedios que pueden poseer un alto grado de toxicidad y provocar un daño a la biota microbiana del suelo (Chirinos *et al.*, 2010) e incluso a las plantas; ya que los productos como los ácidos grasos, materiales fenólicos y terpenoides son fitotóxicos (Wang y Bartha, 1994).

2.3.3. El petróleo y su efecto con la actividad enzimática del suelo

La actividad enzimática puede ser reducida o inhibida tras un derrame de petróleo, sin embargo, después de un periodo de estrés, hay un incremento en la intensidad de la respiración, la actividad enzimática, el desarrollo de los microorganismos y la gradual descomposición de los contaminantes (Baran *et al.*, 2004).

Los contenidos de metales pesados pueden inhibir la actividad enzimática del suelo, al cubrir los grupos catalíticos activos, desnaturalizar las conformaciones de proteínas, o competencia con iones metálicos involucrados en la formación de complejos enzima-sustrato (Gianfreda y Bollag, 1996 cita Gianfreda *et al.*, 2005). El grado de inhibición de los metales pesados (Cd, Zn, Pb) puede relacionarse con su interacción con los HAP (fenantreno, fluorantreno y benzo(a)pireno), los cuales pueden ser en mayor o menor grado dependiendo del tipo de metal (Shen *et al.*, 2005).

Los contenidos de hidrocarburos no siempre son desfavorables para la actividad enzimática en el suelo, según indican Garza *et al.* (2008) estimulan la actividad biológica del suelo (actividad de ureasa, fosfatasa y producción de ATP), directamente proporcional a la concentración de hidrocarburos. Este efecto resulta de la adaptación de los microorganismos y de utilizar como fuente de carbono a los hidrocarburos.

2.4. Efectos de la contaminación del petróleo intemperizado en el ecosistema

El petróleo intemperizado es considerado como el contenidos de hidrocarburos (hidrocarburos saturados de cadena larga, ciclo alcanos, compuestos aromáticos, asfáltenos y resinas) que resisten a la biodegradación en el suelo tras su derrame (Leung *et al.*, 2007). Los efectos de los contaminantes orgánicos persistentes pueden ser sutiles y desencadenarse a bajas concentraciones, se presenta después de varios años de exposición. Esto hace que su diagnostico sea difícil de realizar y dificulta la evaluación de los problemas tóxicos potenciales (Yarco, 2005).

El impacto de los suelos con petróleo intemperizado (SPI) en la vegetación, se observa en la diversidad y el cambio de la vegetal, dependiendo de la zona Fisiográfica (Zavala, 1996). Dorantes (2010), explica que los cambios en la vegetación dependen igual de los factores ambientales, y menciona que ciertas gramíneas y ciperáceas pueden adaptarse en SPI. Sin embargo, la toxicidad de las leguminosas son susceptibles tanto al petróleo fresco como intemperizado (Ramírez, 2012). Los hidrocarburos no saturados parafínicos y nafténicos con enlaces dobles o triples, se oxidan y transforman en ácidos grasos, que son tóxicos para las plantas e insectos (Carrero y Planes, 2008).

Rivera-Cruz (2011) explica que en humedales con petróleo intemperizado, existen poblaciones adaptadas de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, solubilizadoras de potasio y fósforo que permiten a la vegetación disponer de nutrientes en el suelo para su desarrollo y crecimiento.

2.5. El azufre en el suelo

El azufre es un macronutriente indispensable en una variedad de reacciones en las células. Además de su papel clave en la nutrición de plantas y animales (Brady y Weil, 2002). Oliviera *et al.* (2006) explican que la dinámica del azufre en el suelo comprende:

- Mineralización: el azufre orgánico se transforma en primer lugar en sulfuro, que en condiciones aerobias se oxida a sulfato.
- Desulfuración: en condiciones anaerobias los sulfuros no se oxidan y pueden volatizarse a la atmósfera. Los sulfatos también pueden ser reducidos a sulfuros por ciertos microorganismos.

- Adsorción: el ion sulfato puede ser muy débilmente adsorbido por el complejo aniónico con pH inferior a 6 (ciertas arcillas y óxidos de hierro y aluminio).
- Inmovilización: por las plantas y microorganismos.
- Lixiviación: el ión sulfato en la solución del suelo se puede perder por el agua de percolación.

El sulfato es la principal forma inorgánica de azufre en la mayoría de los suelos, aunque pueden estar presentes las formas elementales y en sulfuro bajo condiciones predominantemente anaerobias (Ingraham e Ingraham, 1998). Son directamente absorbidos por las plantas a través de las raíces, transformando el azufre para formar aminoácidos azufrados o enlaces sulfhídrico (R-SH) (Seoáñez, 2000). Pueden estar presentes en formas solubles, adsorbidos en la superficie del suelo o como sales insolubles (yeso o asociados con carbonato de calcio). Teóricamente el sulfato biodisponible en fertilidad de suelos es el adsorbido y el soluble, mientras que el insoluble no se considera directamente disponible (Fernández *et al.*, 2006a).

2.5.1. Sulfatos y su efecto en el suelo

El azufre es responsable de varios tipos de contaminación del suelo, agua y aire. El problema ambiental asociado al azufre incluye la precipitación ácida, deposición de petróleo crudo, ciertos tipos de deterioro de los bosques, el drenaje ácido de minas, los suelos ácidos sulfatados e incluso algunos efectos tóxicos en el agua potable utilizada por los seres humanos y el ganado (Brady y Weil, 2002).

En fosas de residuos de perforación existen grandes concentraciones de sulfatos (Fernández *et al.*, 2006a), En los drenajes ácidos de minas las altas concentraciones de metales pesados y sulfatos afectan el medio ambiente al incrementar el pH del suelo, lo que limita la diversidad de plantas y microbios (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007). Sin embargo, no existe en la legislación mexicana un nivel o concentración límite de sulfatos en suelos contaminados con petróleo.

2.6. Teoría de la toxicidad

La toxicidad de un compuesto es definida genéricamente como su capacidad para infligir lesiones o muerte a un organismo. La toxicidad puede ser aguda, cuando los efectos se manifiestan inmediatamente, o crónica si esos efectos se

manifiestan después de varias exposiciones y, por consiguiente, tras un período de tiempo más largo (Caneva *et al.*, 2000).

Una misma sustancia puede dar lugar a efectos muy diversos, desde inapreciables hasta mortales, siempre en función de la dosis a las que actué, se distinguen dos tipos de efectos: adversos, que provocan una disminución en los niveles normales de las funciones anatómicas, fisiológicas o conductistas del organismos; y tóxicas, que resultan nocivos consecuentes a la acción del tóxico, una alteración del equilibrio fisiológico (Bello y De Cerain, 2001).

La relación entre la concentración de un contaminante y el porcentaje de respuesta de un grupo de organismos de igual especie al que se le ha suministrado o ha sido expuesto a él, se conoce relación dosis-respuesta (Ramírez, 2005). La representación grafica ideal de esta relación puede ser una curva hipérbola, aunque algunas relaciones de efecto dosis-respuesta presentan una forma sigmoide (Figura 3).

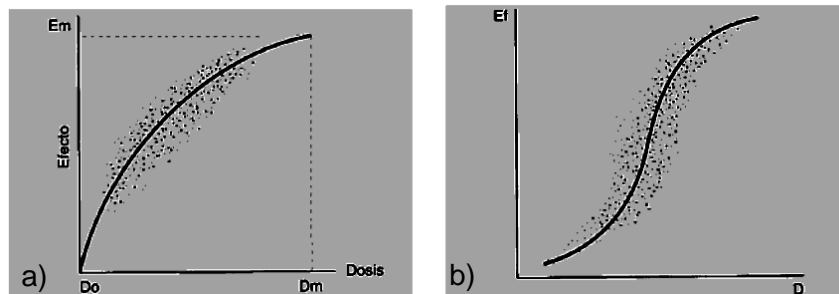


Figura 3. Esquema grafico de la relación dosis respuesta: a) hipérbola y b) sigmoide (Repetto y Repetto, 2009).

En la actualidad la toxicidad se evalúa mediante bioensayos o pruebas de toxicidad, que exponen a un organismo vivo a diferentes concentraciones de una sustancia tóxica, y se registran los efectos. Se considera la sensibilidad de los organismos y las características ecológicas en que se desarrolla el bioensayo (Bello y De Cerain, 2001). De este modo se determina los parámetros de toxicidad pertinentes (Fernández *et al.*, 2006a):

-NISEO o NOEL (Dosis o niveles sin efecto observable): ya que muchas veces las consecuencias de una o repetidas exposiciones no se manifiestan exteriormente o sólo lo hacen después de cierto tiempo.

-LOEC (Concentración más baja donde el efecto es observable): mínima concentración de tóxico en la cual se observan efectos sobre los organismos.

-CL₅₀ (Concentración letal media): concentración de tóxico que mata un 50% de los organismos ensayados.

-CE₅₀ (Concentración efectiva media): concentración de tóxico que produce el 50% del efecto tomado como indicador de toxicidad.

-Concentración inhibitoria: concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico, tal como la reproducción en un determinado porcentaje.

2.7. Bioindicadores de toxicidad

El estado toxico de una situación ambiental requiere de la medición de una multiplicidad de parámetros tomados de manera y en cantidad suficiente para que permitan extraer conclusiones sobre el impacto del contaminante (Carballeira, 2003). Los organismos vivos pueden servir como indicadores de varios tipos de ambientes (Manahan, 2007).

Los bioindicadores se clasifican en indicadores de exposición a contaminantes ambientales, indicadores de efectos producidos por estos e indicadores de susceptibilidad a los compuestos tóxicos. Entre los primeros se incluyen el daño e interferencia provocado por los contaminantes, en procesos mediados por enzimas, así como los cambios a nivel genético, sobre el DNA, así efectos negativos en parámetros del desarrollo y crecimiento de organismos (Espina y Vanegas, 1996). Los marcadores de susceptibilidad indican diferencias individuales o poblaciones que afectan las respuestas ante los factores del medio independiente de la exposición a los contaminantes en estudios (Koeman, 1991 cita Botello, 2005). Es importante para estos indicadores conocer los compuestos (o sus metabolitos) responsables y los órganos que se acumulan y actúan (órganos diana) durante los ensayos de toxicidad (Carballeira, 2003).

2.7.1. Bioindicadores fisiológicos

Las plantas según Parra *et al.* (2002), son organismos sensibles a las alteraciones que se presentan en el ecosistema, por ejemplo cuando un elemento químico supera un umbral de concentración produce daños o alteraciones fisiológicas por toxicidad. El papel de las plantas como indicadores de toxicidad es excelente, debido a la sensibilidad de algunas especies frente a sustancias toxicas. El grado de respuesta depende de las condiciones ambientales. La luz, el agua, la temperatura y la nutrición son quizás los principales factores que deben ser considerados la variación cuantitativa y cualitativa de la especie vegetal (López *et al.*, 2006). Los síntomas en hoja producidos por estados carenciales y toxicidades

de distintos elementos son con mucha frecuencia, parecidos y difíciles de diferenciar. Asimismo, son fácilmente confundibles con síntomas provocadas por causas no nutricionales (plagas o enfermedades). Por estas razones, no es recomendable hacer diagnósticos basados exclusivamente en síntomas visuales (Parra *et al.*, 2002).

Las gramíneas son herramientas biológicas de gran aplicación en suelos, ya sea como bioindicadores de calidad o especies fitorremediadoras en suelos, tras un derrame de petróleo o por concentraciones elevadas de metales pesados (Pastor *et al.*, 2003; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Larenas y Viana, 2005). Su rápida germinación, crecimiento, baja relación vástago/raíz, un sistema radical fasciculado que favorece la creación de una rizósfera extendida con potencial para catalizar la descontaminación del suelo, así como requerimientos agronómicos amplios y su fácil comercialización de propágulos que facilita su aplicación a gran escala, son características que apoyan su uso (Hernández-Valencia y Mager, 2003). El Cuadro 1, son antecedentes del uso de gramíneas como bioindicadores de toxicidad.

Cuadro 1. Antecedentes del uso de gramíneas como bioindicadores.

Gramínea	Contaminante	Referencia
- <i>Brachiaria brizantha</i> <i>Brachiaria decumbens</i> <i>Panicum notatum</i>	2.5, 5.0 y 10.0 g kg ⁻¹ Diesel	Mezzari <i>et al.</i> (2011).
- <i>Zea mays</i> L. <i>Triticum aestivum</i> <i>Festuca arundinacea</i> <i>Euchlaena mexicana</i>	100, 500, 1 000, 2 000 y 3 000 mg kg ⁻¹ HTPF	Tang <i>et al.</i> (2011).
- <i>Poacea</i> sp.(nueve especies)	7,381-124 134 mg kg ⁻¹ HTPI	Dorantes (2010).
- <i>Dactylis glomerata</i> <i>Festuca rubra</i>	0.027, 0.046, 0.058. 0.063, 0.077, 0.110, 0.17, 0.18 mg kg ⁻¹ PCBs	Petrik <i>et al.</i> (2009).
- <i>Echinochloa polystachya</i>	0.25, 1, 2, 10, 50 y 100 mg L ⁻¹ Cd ²⁺	Solís-Domínguez <i>et al.</i> (2007).
- <i>Panicum</i> sp. <i>Cynodon</i> sp. <i>Andropogon</i> sp.	400 a 367 000 mg kg ⁻¹ HTPI	Hernández-Acosta <i>et al.</i> (2006).
- <i>Brachiaria híbrido</i> <i>Brachiaria brizantha</i> <i>Panicum maximum</i>	50 000 mg kg ⁻¹ HTPI	Sangabriel <i>et al.</i> (2006).
- <i>Panicum miliaceum</i> <i>Triticum aestivum</i>	24 000 mg kg ⁻¹ HTPI	Banks y Schultz (2005)
- <i>Brachiaria humidicola</i> <i>Brachiaria mutica</i> <i>Echinochloa polystachya</i>	5 000, 10 000 y 15 000 mg kg ⁻¹ HTPI	Zavala-Cruz <i>et al.</i> (2005)
- <i>Echinochloa polystachya</i> <i>Brachiaria mutica</i>	550 a 35 108 mg kg ⁻¹ HTPF y 79 457 mg kg ⁻¹ HTPI	Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004).
- <i>Zea mays</i> subsp.	15 000, 25 000, 35 000 mg kg ⁻¹ HTPF	Quiñones-Aguilar <i>et al.</i> (2003).

PCBs: bifenilos policlorados; HTPF: Hidrocarburos totales del petróleo fresco; HTPI: Hidrocarburos totales del petróleo intemperizado.

2.7.2. Bioindicadores rizosféricos

La raíz es el órgano subterráneo de las plantas vasculares. Sus principales funciones consisten en fijar la planta al suelo y absorber el agua y las sales minerales contenidas en la solución del suelo. (Fuentes, 2006). La rizósfera, se define como la cantidad de suelo cercana a las raíces de la planta (2 mm), es la zona donde predominan las interacciones comensales y mutualistas entre los microorganismos y plantas, a causa de la abundante cantidad de nutrientes debido a la influencia de la planta. (Maier *et al.*, 2000).

Las raíces, liberan exudados pueden ser de dos tipos; ya sea inorgánicos (ácidos grasos, azúcares, ácidos orgánicos y fenólicos) u orgánicos (polisacáridos y ácidos poligalácticos) (Shann, 1995). Componentes orgánicos solubles (exudados de raíz) (Figura 4). Los exudados genera cambios en el pH, la estructura del suelo rizosférico, la viabilidad de nutrientes inorgánicos y, por consiguiente inducir negativa o positivamente en la comunidad microbiana. Por lo cual, la composición y funcionamiento de la rizósfera pueden considerarse como un bioindicador de toxicidad el suelo (Sørense y Sessitsch, 2007).

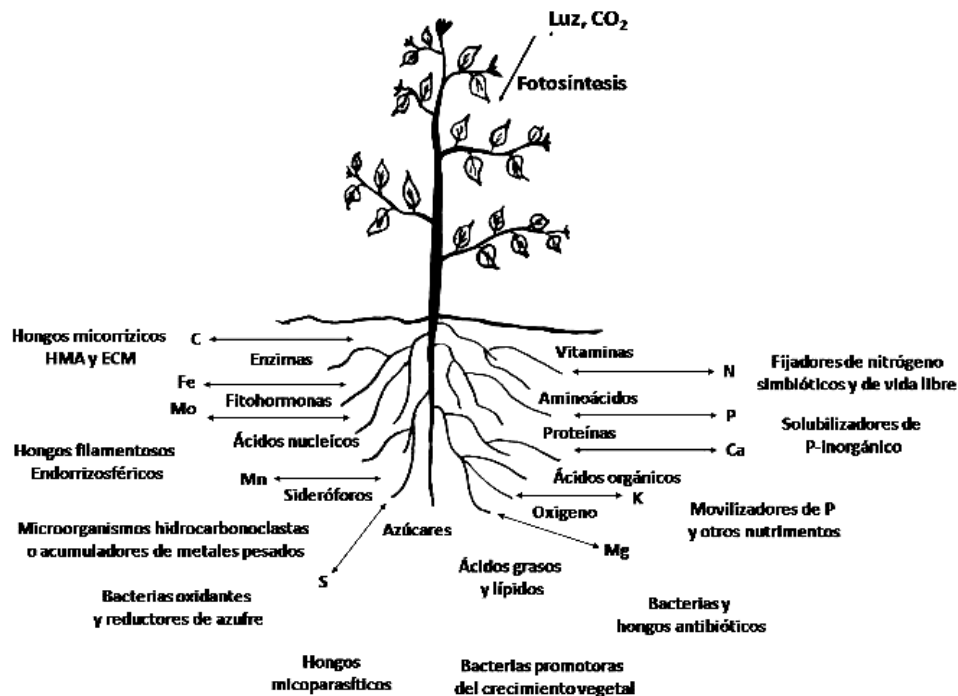


Figura 4. Influencia e interacción de la rizósfera en el suelo (Ferrera-Cerrato y Alarcon, 2007).

2.7.2.1. Bioindicadores bacterianos en rizósfera

Los microorganismos simbioses o de vida libre pueden ser una herramienta de monitoreo excelente para evaluar los daños toxicológicos de un derrame (Hernández, 1997; Arias-Trinidad, 2008; Vázquez-Luna, 2010), debido a su implicación en variados procesos bioquímicos del suelo y para el seguimiento de un proceso de restauración en el suelo y la calidad biológica del ecosistema (González-Chávez, 2005; Akpor *et al.*, 2007; León-García *et al.*, 2007). Dorantes (2010) concluyó que los organismos del suelo pueden ser indicadores de la alteración de suelo por factores climáticos y antropogénicos. Poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno, solubilizadoras de fósforo y potasio son sensibles al contenido de hidrocarburos del petróleo, factores climáticos y la acumulación de precipitación. Ferrera-Cerrato *et al.* (2007) explica que las poblaciones rizosféricas se inhiben conforme el aumento de las concentraciones de los hidrocarburos del petróleo, lo cual promueve su aplicación como biomarcadores.

2.7.2.2. Bacterias y sus interacciones con la rizósfera

La nutrición de las plantas depende de la composición de la flora del suelo en la rizósfera, para lo cual las plantas tienen tendencia de atraer microorganismos benéficos por sus excreciones o exudados radicales (Hiltner, 1904, citado por Sánchez y Gómez, 2007). La principal manifestación de esta influencia son las complejas asociaciones que se desarrollan entre las raíces y los microorganismos del suelo, especialmente las bacterias y hongos, que invaden la raíz huésped o permanecer libre en el suelo. Dejando claro que las simbiosis pueden ser tanto benéficas o patógenas, ya que las raíces afectan la nutrición mineral de los microbios del suelo tanto como los microbios afectan los nutrientes disponibles para las raíces de las plantas. (Brady y Weil, 2002; Hopkins y Hüner, 2004).

2.7.2.2.1. Bacterias fijadoras de Nitrógeno

El nitrógeno es parte integral de componentes esenciales de las plantas (aminoácidos, enzimas, ácidos nucleídos, clorofila y algunos carbohidratos). Un aporte adecuado de nitrógeno estimulara el crecimiento y desarrollo de la raíz, así como, también la captación de otros nutrientes (Brady y Weil, 2002).

La fijación biológica de nitrógeno es el proceso en el que ciertos organismos captan el nitrógeno atmosférico (N_2), el cual es transformado en compuestos orgánicos (NH_4^+ , NH_3 y NO_3^-). Esta fijación biológica puede ser realizada por dos tipos de microorganismos: los organismos de vida libre como bacterias

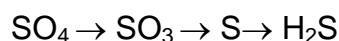
(*Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia* y *Clostridium*), actinomicetos y cianobacterias o por simbiosis entre la raíz de la planta y un microorganismo (*Rhizobium* y *Bradyrhizobium*) (Alexander, 1977; Maier *et al.*, 2000; Brandy y Weil, 2002).

Las bacterias fijadoras de N₂ vida libre (BFN) en la rizósfera y suelo han sido evaluadas como indicadores de la toxicidad del petróleo en suelos (Vallejo *et al.*, 2008; Mantilla-Paredes *et al.*, 2009). Vázquez-Luna *et al.* (2011) explican que las BFN de vida libre se incrementaron en suelos contaminados con petróleo (1 200, 3 500, 10 000, 20 000y 40 000 mg kg⁻¹ HTPF), Contrario a este comportamiento, Miranda-Martínez *et al.* (2007) reportaron una disminución en las densidades de *Azospirillum brasilense* y *Azospirillum halopreferens* en suelos contaminados con fenantreno, se atribuye esta respuesta a efectos tóxicos de compuestos intermedios de la degradación del fenantreno y, al crecimiento de microorganismos con funciones distintas a la degradación del fenantreno que se favorecen con la reducción de la concentración del contaminante en el sustrato. Pérez *et al.* (2010), demostraron la capacidad de BFN de vida libre de utilizar queroseno como fuente de carbono y producir biosurfactantes semejante a los que producen las *Pseudomonas*, lo que indica la viabilidad y participación en procesos de biorremediación.

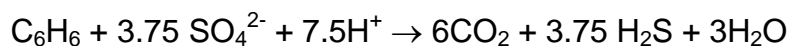
2.7.2.2.2. Bacterias sulfato-reductoras

Las bacterias sulfato reductoras (BRS) viven en ambientes anaeróbicos ricos en sulfato, son versátiles y capaces de crecer utilizando sulfato u oxianiones de sulfuro como aceptor; y acetato, lactato y glucosa como donadores de electrones. El H₂S que producen origina el olor a huevos podridos de estos lugares y el color negro del lodo. Los sulfuros metálicos negros, como el sulfuro de hierro, se forman como resultado de la reacción entre H₂S producido por las bacterias y los iones metálicos presentes en el lodo (Ingraham e Ingraham, 1998).

El proceso general de sulfato reducción y oxidación de benceno con sulfato como aceptor de electrones se muestran a continuación (Suthersan, 1999, citado por Fernández *et al.*, 2006a)



Proceso de sulfato-reducción



Oxidación de benceno con sulfato.

Las BRS reducen sulfatos oxidando la materia orgánica para la producción de sulfuro de hidrogeno y bicarbonato (Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007). Estos microorganismos son capaces de modificar las reacciones de reducción de oxígeno debido al consumo del mismo para sus actividades metabólicas, las cuales se desarrollan en ausencia de oxígeno libre (condiciones anaerobias) (Figuroa *et al.*, 2008). Las bacterias *Desulfovibro* (cinco especies) y *Desulfotomaculum* (tres especies) son los únicos géneros reductores de sulfatos (Maier *et al.*, 2000). El sulfuro producido por *Desulfovibrio spp.* reacciona con el hierro que se encuentra como fosfato de hierro, lo precipita como sulfuro de hierro y libera el fosfato al agua como fosfato iónico, interactuando de esta manera con otros ciclos biogeoquímicos (Flores *et al.*, 2007).

Se ha encontrado la presencia de BSR en ambientes contaminados con petróleo y sus constituyentes (benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, naftalenos, fenantrenos y alcanos), así como de compuestos halogenados. Debido a que la degradación de hidrocarburos de bajo peso molecular, ácidos orgánicos (acetato, propionato y butirato son intermediarios) fungen como fuente de carbonos para las bacterias (Kleikemper *et al.*, 2002). A nivel industrial su aplicación es enfocada en diversas áreas como la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo y metales pesados (Fernández *et al.*, 2006b; Gutiérrez-Ruiz *et al.*, 2007; León-García *et al.*, 2007); el desarrollo de técnicas para evitar la corrosión que ejercen sobre las tuberías (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2006; Figuroa *et al.*, 2008); la producción de hidrogeno por hidrólisis de materia orgánica utilizando este tipo de bacterias (Buitrón y Carvajal, 2009) y el tratamiento de hidrosulfuración utilizando especies sulforeductora y desulfurizadora (Valbuena *et al.*, 2010).

2.7.2.3. Bioindicadores enzimáticos

Las enzimas son proteínas especializadas que combinan un sustrato específico para catalizar una reacción bioquímica, son parte esencial en la transformación de energía y las reacciones en el ciclo de nutrientes; (Maier *et al.*, 2000; Brady y Weil, 2002). Las reacciones bioquímicas y enzimáticas tanto del suelo como de la vegetación son afectadas por la falta de micronutrientes o presencia de un xenobiótico (Brady y Weil, 2002). Los contaminantes en el suelo ejercen una influencia sobre la microbiota, la cual se manifiesta en cambios en la actividad enzimática, respiración del suelo biomasa y cuenta microbiana (Baran *et al.*, 2004).

La caracterización y cuantificación de la actividad enzimática puede ser útil para medir la fertilidad; el nivel tóxico de xenobiótico (de la Garza *et al.*, 2008) y analizar el comportamiento de procesos de biorremediación en el suelo (Pérez *et al.*, 2008). En suelos con hidrocarburos, la actividad enzimática y la biomasa microbiana son alteradas de manera significativa. Wyszowska *et al.* (2006), Achuba y Peretiemo (2008) y Akubugwo *et al.* (2009) mencionan que la actividad enzimática de la deshidrogenasa, proteasa, ureasa, catalasa, fosfatasa alcalina y acida son estimuladas durante derrames de petróleo en suelos. Baran *et al.* (2004) observaron que la influencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos sobre la actividad enzimática (deshidrogenasa, fosfatasa, ureasa y proteasa) se relaciona con las propiedades físico-químicas del suelo, tales como el carbón orgánico y pH.

2.7.2.3.1. Actividad enzimática de la ureasa

La ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea con un mecanismo de reacción basado en la formación de carbamato como intermediario. La urea adicionada a suelos como fertilizantes o la orina de animales es hidrolizada enzimáticamente por la ureasa ($\text{NH}_2\text{CONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$), lo que resulta en la liberación de amonio y eleva el pH de los suelos (Tabatabai y Bremner, 1972a). Está relacionada con la mineralización del nitrógeno orgánico, que se refiere a la degradación de proteínas, amino azúcares y ácidos nucleicos a NH_4^+ (España *et al.*, 2001).

La actividad de la ureasa en suelo, es un indicador de toxicidad viable en ensayos de toxicidad y calidad (Baran *et al.*, 2004; Fonturbel, 2004), tanto por su sensibilidad como para comprender las interacciones entre los metales pesados y los HAP del petróleo (Shen *et al.*, 2005).

2.7.2.3.2. Actividad enzimática de la arilsulfatasa

Las arilsulfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un anión arilsulfato ($\text{R-O-SO}_3^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{ROH} + \text{H}^+ + \text{SO}_4^{2-}$) por rotura del enlace O-S (González *et al.*, 2003). La arilsulfatasa participa en el proceso de hidrólisis del éster sulfato de la materia orgánica del suelo liberando azufre, como ion sulfato [SO_4^{2-}] (Reyes *et al.*, 2011). Esta enzima indica la deficiencia y mineralización de los compuestos del sulfuro en el suelo, o para el monitoreo de la calidad del suelo por actividades industriales, pecuarias y agrícolas (Tischer, 2005; Acosta-Martínez, 2007).

Gianfreda *et al.* (2005), observaron la sensibilidad de la arilsulfatasa en suelos a condiciones limitantes de fertilización y riego, así como a la presencia de

xenobioticos en el ecosistema (HTPS y HAP). Su actividad se ve relacionada a la actividad de la enzima Ureasa, al contenido del carbón orgánico (Contreras *et al.*, 2005), Ntotal, Cu, Ni, Fe y pH del suelo (Gianfreda *et al.*, 2005).

2.8. Técnicas de remediación biológica para suelos contaminados con petróleo.

Una técnica de remediación tienen la finalidad de extraer, destruir o modificar los contaminantes del suelo, a modo que dejen de ser peligroso para el medio ambiente y reducir sus concentraciones (Zamudio, 2010).

Los métodos y procedimientos que se seleccionan dependen del sitio (topografía, acceso, cercanía a cuencas hidrográficas, entre otros) y las condiciones ambientales; también se deben tener en cuenta el esparcimiento y movimiento de la mancha para el caso del petróleo crudo (Ecopetrol, 1996 cita Ortiz-González *et al.* 2006). Las técnicas de remediación de suelo con petróleo se pueden clasificar por: el tipo de estrategia, el lugar donde se realice la remediación o el tipo de tratamiento (Figura 5).

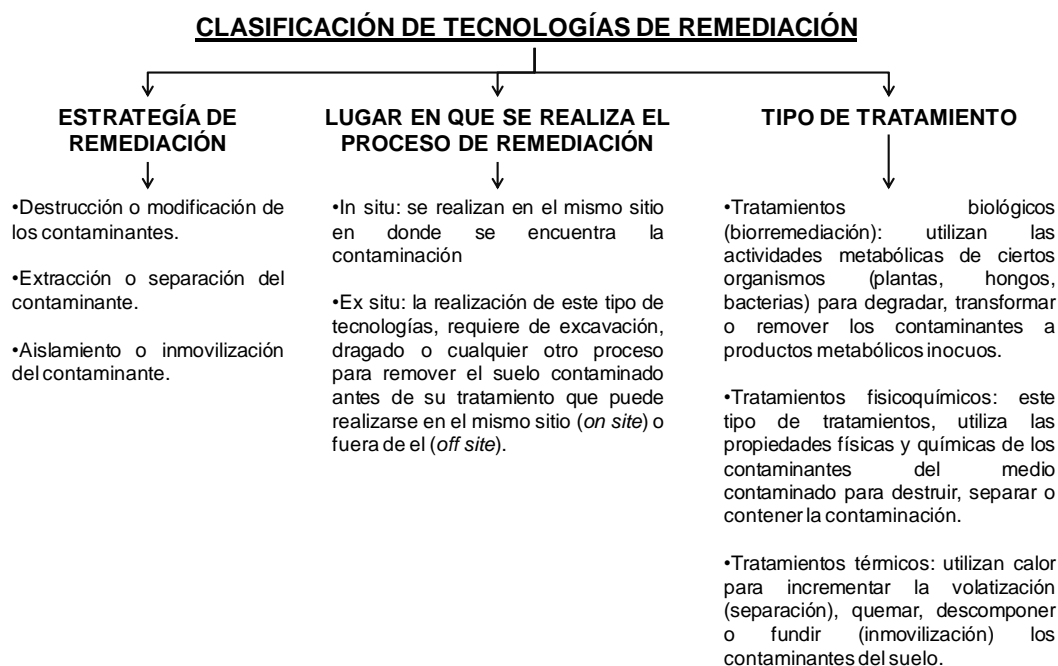


Figura 5. Clasificación de tecnologías de remediación (Velazco y Volke, 2003).

2.8.1. Remediación biológica

Las técnicas biológicas, hasta la fecha se han subestimado para la remediación de sitios contaminados con hidrocarburos y metales pesados. Su potencial en cuanto a costos y combinación de mecanismos biológicos de oxidación-reducción, así como de procesos fisicoquímicos-biológicos que representan una opción prometedora para la remediación de suelos contaminados (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005). La Figura 6, indica la clasificación de las tecnologías de remediación biológicas.

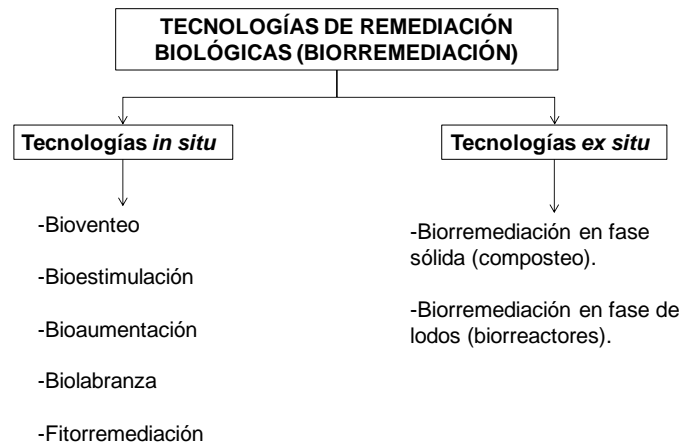


Figura 6. Clasificación de tecnologías de remediación biológicas (INE, 2007).

Tecnologías *in situ*

Bioventeo: consiste en estimular la biodegradación aerobia de un contaminante por medio del suministro de aire en el sitio contaminado (INE, 2007).

Bioestimulación: consiste en proveer las condiciones adecuadas a los organismos autóctonos para acelerar el proceso biodegradativo, al adicionar nutrientes para equilibrar el medio y en el control de variables físico-químicas claves, como humedad, la concentración de oxígeno o la temperatura (INE, 2007).

Bioaumentación: es la adición de microorganismos vivos, que tengan la capacidad para degradar el contaminante en cuestión, para promover su biodegradación o su biotransformación (Velasco y Volke, 2003).

Biolabranza: proceso en el que la superficie del suelos contaminado es tratado en el mismo sitio por medio del arado. El suelo contaminado se mezcla con agentes de volumen y nutrientes, y se remueve periódicamente para favorecer su aireación. La diferencia con respecto al composteo, es que en la biolabranza se

mezcla el suelo contaminado con suelo limpio, mientras que en el composteo generalmente se realiza sobre el suelo (Velasco y Volke, 2003).

Fitorremediación: es la aplicación de las especies vegetales para inducir algunos procesos de eliminación de los contaminantes (degradación, extracción y estabilización). Los contaminantes se incorporan a la planta en su forma disuelta y se someten a la acción de las raíces a partir de sus exudados que modifican las condiciones del ambiente en la rizósfera, como el pH y el potencial de redox y la actividad microbiológica (Domènech y Peral, 2006).

Tecnología *ex situ*

Biorremediación en fase sólida (composteo): se basa en la adición y mezclado de los componentes primarios de una composta (agentes de volumen) con el suelo contaminado, de manera que conforme la composta madura, los contaminantes son degradados por la microflora activa dentro de la mezcla (Velasco y Volke, 2003).

Biorremediación en fase de lodos (biorreactores): tecnología más adecuada para casos en que los peligros potenciales de descargas y emisiones sean serios. Permite la combinación controlada y eficiente de procesos químicos, físicos y biológicos, que mejoran y aceleran la biodegradación (Velasco y Volke, 2003).

2.8.2. Fitorremediación y mecanismos de degradación

La fitorremediación aprovecha la capacidad de ciertas plantas para absorber, acumular, metabolizar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el suelo, aire, agua o sedimentos como: metales pesados, radioactivo, compuestos orgánicos y compuestos derivados del petróleo (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Es una tecnología amigable, de bajo costo y efectiva, que utiliza plantas con capacidad para crecer en suelo contaminados con petróleo y bioestimular la degradación de moléculas orgánicas en la zona radical (Robertson *et al.*, 2007), a partir de mecanismo como fitoextracción, rizofiltración, rizodegradación, fitoestimulación, fitoestabilización, fitovolatilización y fitodegradación (López-Martínez *et al.*, 2005), los cuales se definen:

En la fitoextracción, los contaminantes son captados por las raíces (fitoacumulación), y posteriormente éstos son traslocados y acumulados hacia los tallos y hojas (fitoextracción) (Sellers, 1999 cita Velasco y Volke, 2003).

En la rizofiltración, se utilizan plantas para eliminar del medio hídrico contaminantes a través de la raíz (Dushenkov *et al.*, 1995)

En la fitoestimulación o rizodegradación las plantas generan los exudados radiculares que estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos capaces de degradar compuesto orgánicos xenobióticos (López-Martínez *et al.*, 2005)

En la fitovolatilización, se produce a medida que los árboles y otras plantas en crecimiento absorben agua junto con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Algunos de estos pueden llegar hasta las hojas y evaporarse o volatizarse en la atmosfera (Prasad y Freitas, 2003).

En la fitoestabilización, las plantas limitan la movilidad y biodisponibilidad de los contaminantes en el suelo, debido a la producción en las raíces de compuestos químicos que pueden adsorber y formar complejos con los contaminantes, inmovilizándolos así en la interface raíz-suelo (Delgadillo-López *et al.*, 2011).

La fitodegradación consiste en el metabolismo de contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Sellers, 1999 cita Velazco y Volke, 2003).

Existen varias limitaciones que deben considerarse para su aplicación (Velazco y Volke, 2003): El tipo de plantas, la profundidad, las altas concentraciones de contaminantes que pueden resultar tóxicas, influencia de la estación del año, la toxicidad y biodisponibilidad de los productos de la degradación no siempre se conocen y pueden movilizarse o bioacumularse en animales. Sin embargo, la fitorremediación ofrece entre otros atractivos: una reducción significativa de los costos, una aceptación social prácticamente garantizada, y la recuperación o restauración de los ecosistemas (Espí, 2006).

2.8.2.1. Gramíneas y su actividad fitorremediadora

Las gramíneas, han sido seleccionadas en diversos estudios por su potencial para favorecer la disminución de los contaminantes (Sangabriel *et al.*, 2006, Maldonado-Chávez *et al.*, 2010) (Cuadro 2). Los pastos son el género más adecuado para la fitorremediación, por su hábitat de crecimiento y adaptabilidad a una variedad de condiciones edáficas y climáticas (Singh *et al.*, 2003 cita Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005); además, de su rápido desarrollo, gran producción de biomasa, fuerte resistencia y eficaz estabilización de los suelos. Por lo que son excelentes restauradores de tierras en degradación o contaminadas,

especialmente en los trópicos y subtropicos con altas temperaturas y precipitaciones (Xia, 2004),

Las gramíneas se plantan a menudo en conjunto con los árboles en sitios con contaminantes orgánicos o como método de reparación primaria. Ellos proporcionan una enorme cantidad de raíces finas en la superficie del suelo que es eficaz en la unión y la transformación de los contaminantes hidrófobos tales como TPH, BTEX y PAH. Proporcionar la estabilización de suelos y protección contra el viento polvo que puede mover los contaminantes fuera del sitio (Schnoor, 1997). Además, el ecosistema cuentan con una flora microbiana propia, la cual dependiendo de su actividad metabólica pueden contribuir a la remediación de los sitios contaminados (Fernández *et al.*, 2006b), y que es estimulada por la presencia de las plantas fitorremediadoras. Dentro de esta flora microbiana, las bacterias se destacan por su densidad, versatilidad y variedad de capacidades enzimáticas que pueden mejora la actividad metabólica durante la remediación en suelos contaminados con petróleo, pesticidas y otras toxinas orgánicas (Brady y Weil, 2002).

Cuadro 2. Antecedentes del uso de gramíneas como especies fitorremdiadoras.

Gramínea	Contaminante	Referencia
- <i>Axonopus compressus</i>	60 000 mg kg ⁻¹ HTPF	Bordoloi <i>et al.</i> (2012).
- <i>Festuca arundinacea</i> <i>Festuca rubra</i> <i>Lolium perenne</i>	10 000 mg kg ⁻¹ HAP (HTPI) y 10 000 mg kg ⁻¹ HPAs (HTPF).	Smith <i>et al.</i> (2011).
- <i>Zea mays</i> L.	100, 500 y 1000 mg.kg ⁻¹ APF	Galazka <i>et al.</i> (2010).
- <i>Festuca arundinacea</i> Schreb. <i>Festuca pratensis</i> Huds.	4 7000±2 100 mg kg ⁻¹ HTPI y 8.5±0.9 mg kg ⁻¹ HPAs.	Soleimani <i>et al.</i> (2010).
- <i>Brachiaria mutica</i>	50 000 HTPF, 78 000 HTPF, y 79 457 mg kg ⁻¹ HTPI	Maldonado-Chávez <i>et al.</i> (2008).
- <i>Echinochloa polystachya</i>	9 175 mg kg ⁻¹ HTPI	Miranda-Martínez <i>et al.</i> (2007).
- <i>Cynodon dactylon</i>	5 000 mg kg ⁻¹ HTPF	White <i>et al.</i> (2006).
- <i>Brachiaria brizantha</i> <i>Cyperus aggregatus</i> <i>Eleusine indica</i>	Fenantreno 30 mg kg ⁻¹	Merkl <i>et al.</i> (2005).
- <i>Echinochloa polystachya</i>	50 000, 10 000 mg kg ⁻¹ HTPI	Rivera-Cruz (2004).
- <i>Festuca arundinacea</i> <i>Poa pratensis</i> <i>Elymus canadensis</i>	0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 g kg ⁻¹ creosota	Huang <i>et al.</i> (2004).

APF: Antraceno, Pireno, fenantreno; HTPF: Hidrocarburos totales del petróleo fresco; HTPI: Hidrocarburos totales del petróleo intemperizado; HPAs: Hidrocarburos policíclicos aromáticos.

2.9. Reacciones de óxido-reducción en la biorremediación de hidrocarburos del petróleo y sulfatos

2.9.1 Óxido-reducción de hidrocarburos del petróleo

La biorremediación utiliza microorganismos para degradar el contaminante a un producto menos tóxico, los hidrocarburos del petróleo son utilizados por los microorganismos como fuente de energía y carbono por diferentes vías metabólicas para su crecimiento, este proceso biológico se denomina mineralización ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{sales inorgánicas}$) (Leung *et al.*, 2007). La respiración aeróbica, anaeróbica, fermentación, co-metabolismo y dehalogenización reductiva son algunos mecanismos que utilizan los microorganismos (Chávez-Crooker *et al.*, 2005).

La degradación de los hidrocarburos del petróleo puede ser mediada por el sistema específico de enzimas (peroxidasas y oxidasas), la unión de células microbianas a los sustratos y la producción de biosurfactantes (López *et al.*, 2006; Das y Chandran, 2011). Esta degradación puede ser principalmente aeróbica y anaeróbica, en ambas se requiere un comburente para oxidar los hidrocarburos. Este es el oxígeno en aerobiosis y nitrato, sulfato o Fe (III) en anaerobiosis (Castillo y Roldán, 2005).

Degradación aeróbica de hidrocarburos

La degradación de parafinas es un proceso que ocurre preferentemente en condiciones de aerobiosis, que puede ser asimilado por β -oxidación. Los alcanos por su estructura similar a los ácidos grasos y parafinas de origen vegetal, las cuales son de origen natural. Son degradados por los microorganismos con mayor facilidad (Maier *et al.*, 2000). Este proceso es catalizado por las enzimas monooxigenasa y dioxygenasa que oxidan el grupo metilo terminal de los hidrocarburos alifáticos pasando a alcohol, luego aldehído y finalmente a un ácido graso que es activado en forma de acil-coenzima A (acetil-CoA), para ser asimilado por β -oxidación en un ácido grado de siete carbonos a cinco y posteriormente ingresar al Ciclo de Krebs para su completa mineralización. Los microorganismos capaces de llevar a cabo estas reacciones son *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* (Castillo y Roldán, 2005).

Los alquenos aunque con un similar proceso de degradación que los alcanos, estos producen un alcohol primario, secundario o un epóxido, estos productos iniciales son oxidados posteriormente a un ácido graso primario, el cual es degradado por β -oxidación (Maier *et al.*, 2000).

Las cicloparafinas al igual que los alcanos, están presentes de forma natural en aceites y parafinas de plantas, lípidos microbianos y pesticidas (Maier *et al.*, 2000). La degradación de los compuestos cíclicos es a partir de un proceso comensalístico y cometabólico. Que tienen como finalidad la oxidación del cicloalcano a un componente alifático para su mineralización (Leung *et al.*, 2007).

Los compuestos aromáticos son productos naturales, son parte de la lignina y se forma por combustión de materiales orgánicos, las bacterias y hongos pueden llevar a cabo una transformación completa e incompleta, en varias condiciones ambientales (Maier *et al.*, 2000). El proceso de degradación inicia con la hidroxilación que involucra la incorporación de oxígeno (monoxigenasas y dioxigenasas), y que es intermediaria por catecol y protocatecuato. De esta forma se generan productos intermedios del Ciclo de Krebs tales como succinato, acetil-CoA y piruvato (Castillo y Roldán, 2005; Leung *et al.*, 2007).

Los compuestos heterocíclicos que comprenden a los asfáltenos y resinas, son más difíciles de degradar por la vía de los compuestos aromáticos, ya que su biodegradabilidad disminuye conforme aumenta el número de heteroátomos en la molécula (nitrógeno, azufre y oxígeno). Sin embargo, compuestos de cinco anillos y un heteroátomo son fáciles de degradar por hidroxilación biológica (Maier *et al.*, 2000).

La degradación anaeróbica de hidrocarburos

Aunque la degradación anaeróbica en las parafinas y compuesto aromáticos (oxigenados) es lenta, estos contienen oxígeno que los hace de fácil biodegradación en condiciones anaerobias. A partir de la hidratación de un alcano a un alqueno y posteriormente una cetona o aldehído para finalizar en un ácido graso que será asimilado por β -oxidación (Leung *et al.*, 2007).

La degradación anaeróbica de hidrocarburos saturados lineales requieren de un paso de activación, las bacterias utilizan el fumarato como oxidante para activar los hidrocarburos. Una vez activado el alcano, una serie de oxidaciones, deshidrataciones e hidrataciones permiten a las bacterias utilizar el hidrocarburo como fuente de carbono y de energía (Castillo y Roldán, 2005). Aunque los compuestos aromáticos siguen la igual vía de degradación anaeróbica que los hidrocarburos saturados, la mineralización anaeróbica de los aromáticos frecuentemente requiere de una mezcla microbiana y diferentes potenciales de redox (Maier *et al.*, 2000).

2.9.2. Reducción del sulfato

La mayoría de los microorganismos y plantas obtienen el azufre a partir de los iones sulfato (SO_4^{2-}), que son abundantes en el ambiente; reducen el sulfato hasta sulfuro (S^{2-}) por el proceso de desulfurilación. Las BSR intervienen en la reducción de sulfato, además de utilizar el sulfato como nutriente, intervienen como aceptores terminales de electrones de la cadena de transporte de electrones en proceso de respiración anaeróbica, para generar ATP (Ingraham e Ingraham, 1998).

La reducción asimilatoria del sulfato la realizan todas las plantas y microorganismos, reduciendo el sulfato e incorporándolo como aminoácidos tales como la cisteína, cistina y metionina. La reducción disimilatoria del sulfato viene a ser la respiración anaeróbica, donde el aceptor de electrones es el sulfato (Stainier y Villanueva, 2005), proceso que llevan a cabo bacterias como *Desulfovibrio desulfuricans*, *Clostridium spp.* y *Desulfotomaculum nigrificans*, las cuales son en general heterótrofas y liberan sulfuro (Flores *et al.*, 2007).

2.9.3. Oxidación del azufre reducido hasta sulfato

El H_2S puede reaccionar espontáneamente con O_2 para dar $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_4^{2-} y S^0 , existe una variedad de proteobacterias que pueden utilizar diversos compuestos reducidos de azufre para crecer quimiolitotróficamente. Estos procesos de oxidación pueden llevarse a cabo tanto en condiciones óxicas, donde compiten con la reacción exclusivamente química, como en condiciones anóxicas (Castillo y Roldán, 2005).

Cuando los desechos de las plantas y de los animales son degradados por los microorganismos, la mayor parte de su azufre es convertido en H_2S , el cual se oxida para producir sulfato. La conversión esta medida por dos tipos de bacterias. Las bacterias quimioautótrofas generan ATP oxidando los compuestos que contienen azufre, el producto final de la oxidación es el sulfato, pero también se acumula como intermediario el azufre elemental (Ingraham e Ingraham, 1998). Las bacterias fotótrofas anoxigénicas realizan las mismas reacciones anaeróbicamente, utilizan el H_2S como donador de electrones para la reducción fotosintética del CO_2 , oxidando a S^0 , donde más tarde es oxidado hasta sulfato (Castillo y Roldán, 2005).

SECCIÓN III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Realizar el estudio de ecotoxicidad y fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco e intemperizado y sulfatos para seleccionar indicadores de toxicidad biológicos, el potencial del pasto japonesa en la descontaminación de estos suelos, la presencia de sulfatos en su interacción con los hidrocarburos y las bacterias sulfato reductoras.

3.1.1. Objetivos particulares

1. Determinar a los tres y seis meses el efecto de los hidrocarburos del petróleo fresco e intemperizado en la densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre, bacterias reductoras de sulfatos, actividad enzimática de la ureasa y arilsulfatasa, así como en los parámetros de crecimiento del pasto japonesa.
2. Seleccionar parámetros biológicos representativos de la ecotoxicidad del petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses, que permitan obtener índices fisiológicos de toxicidad, índices de impacto bacteriano e índice enzimático de toxicidad.
3. Evaluar el porcentaje de degradación a los tres y seis meses de diferentes dosis de hidrocarburos totales del petróleo en el Gleysol contaminado con petróleo fresco e intemperizado y plantado con pasto japonesa.
4. Establecer y analizar a los tres y seis meses la relación del porcentaje de degradación de hidrocarburos totales del petróleo fresco e intemperizado con parámetros de crecimiento y producción del pasto japonesa, microflora rizosferica y actividad enzimática, para demostrar el potencial fitorremediador del pasto japonesa.
5. Medir y explicar la presencia de sulfatos solubles y su relación con bacterias reductoras de sulfatos y la actividad enzimática de la arilsulfatasa. en suelos con petróleo fresco e intemperizadola.

SECCIÓN IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

La selección de parámetros biológicos de ecotoxicidad, la fitorremediación y los contenidos de sulfatos en un Gleysol contaminado con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses depende del crecimiento y producción del pasto japonesa, de la densidad de bacterias en la rizósfera, de la actividad enzimática en la rizósfera y de la dosis de hidrocarburos del petróleo.

4.1.1. Hipótesis particulares

1. El crecimiento y producción del pasto japonesa, densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre, bacterias reductoras de sulfatos, actividad enzimática de la ureasa y arilsulfatasa a los tres y seis meses son afectados por el tipo y dosis de petróleo.
2. La ecotoxicidad del petróleo fresco e intemperizado en el microcosmo planta-rizosfera-suelo está directamente relacionada con los índices fisiológicos de toxicidad, índices de impacto bacteriano e índice enzimático de toxicidad.
3. La descontaminación a los tres y seis meses del Gleysol con hidrocarburos del petróleo fresco e intemperizado, se estimulan por la presencia de la rizósfera del pasto japonesa en el microcosmo y según la dosis de hidrocarburos totales del petróleo.
5. El porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales del petróleo a los tres y seis meses se relaciona con la densidad de bacterias en la rizósfera, actividad enzimática y crecimiento del pasto japonesa.
6. La presencia de sulfatos en el suelo a los tres y seis meses dependen de los contenidos de hidrocarburos del petróleo, el tipo de petróleo, las bacterias sulfato reductoras y la actividad enzimática de la arilsulfatasa.

SECCIÓN V. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada del Colegio de Postgraduados - Campus Tabasco, que se localiza en el municipio de Huimanguillo, Tabasco, México. El experimento se desarrolló en tres etapas secuenciales: Etapa I. Trabajo en campo e invernadero, Etapa II. Laboratorio y Etapa III. Análisis estadístico (Figura 7).

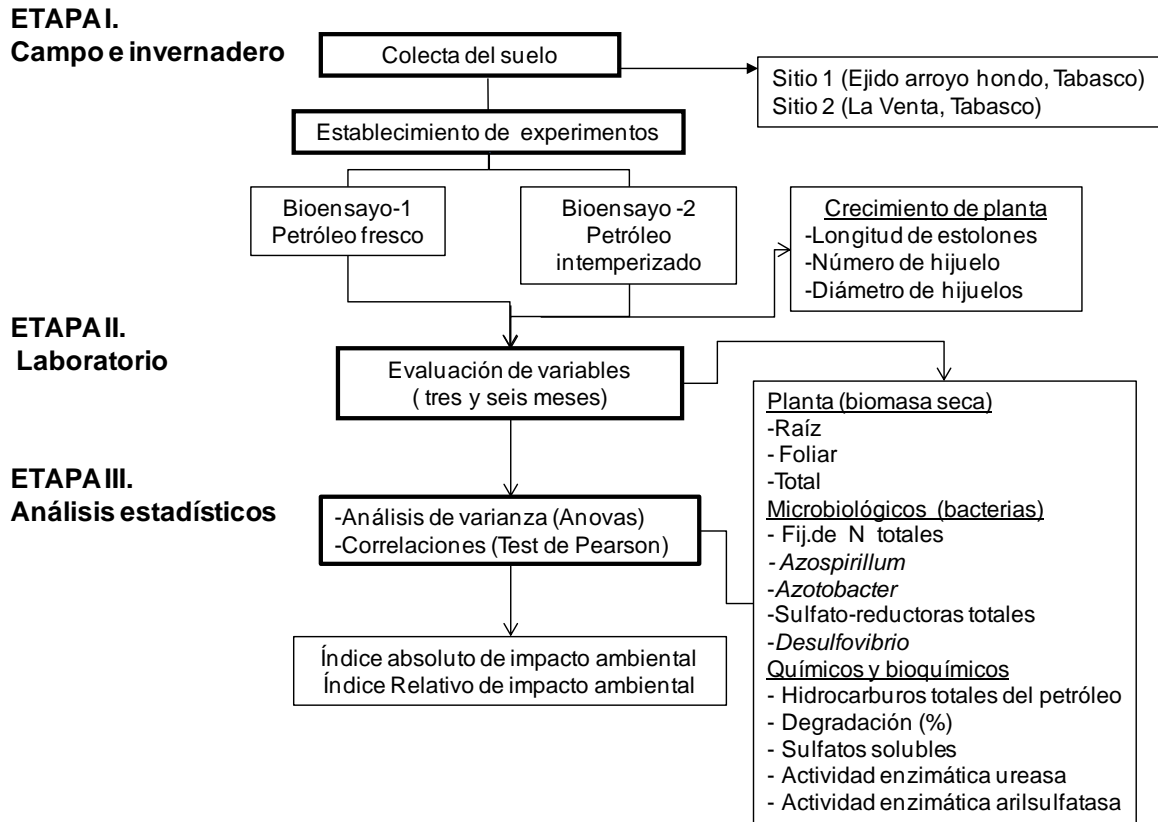


Figura 7. Flujograma del proceso de investigación.

5.1. Etapa I. Trabajo de campo e invernadero

5.1.1. Colecta de suelos

Los suelos se colectaron del horizonte superficial (0-20/25 cm) de dos Gleysoles de diferente ubicación. El Gleysol mólico (Sitio-1) suelo testigo tiene 2 607 mg kg⁻¹ base seca HTP de origen biogénico, se localiza en el suroeste del área urbana del ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, H. Cárdenas, Tabasco en las coordenadas geográficas 17° 59' 53.0" latitud Norte y 93° 25' 01.3" longitud Oeste (Figura 8).

El Gleysol antráquico (Sitio-2) se ubica en el ejido José Narciso Roviroza, Huimanguillo, Tabasco, a dos kilómetros al suroeste del Procesador de Gas La Villa La Venta (PEMEX). Las coordenadas geográficas del sitio son 18° 4' 37.05" latitud Norte y 94° 2' 28.28" longitud Oeste (Figura 8 y 9). La superficie del sitio de estudio cuenta con una extensión de 44, 321.199 m² (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004). Contiene diferentes contenidos de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) base seca, es petróleo intemperizado que procede de derrames crónicos de petróleo desde hace 20 años. Este petróleo ha sido influenciado por incendios, inundaciones y por la foto-oxidación.

En el sitio-2 se colectaron cinco suelos con diferentes contenidos de HTP. La ubicación geográfica de los suelos son; suelo-1 (S1) [18° 4' 40.5" N; 94° 2' 40.1" O], suelo-2 (S2) [18° 4' 39.5" N; 94° 2' 39" O], suelo-3 (S3) [18° 4' 41" N; 94° 2' 38.7" O], suelo-4(S4)[18° 4' 39.5" N; 94° 2' 37.1" O] y suelo-5 (S5) [18° 4' 41.5" N; 94° 2' 43.2" O] (Figura 9).

Se colectaron 200 kg de suelo del sitio-1 (testigo) y 50 kg de cada uno de los cinco suelos del sitio-2. El suelo se introdujo en bolsas de plásticos negro y se transportaron a las instalaciones laboratorio de Microbiología Ambiental del Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. El suelo se extendió sobre un plástico ubicado bajo sombra a temperatura ambiente, una vez seco el suelo en forma manual se elimino con la mano las raíces, y se fragmento con un mazo de madera. El suelo se tamizó en una malla metálica inoxidable de 5 milímetros de abertura.

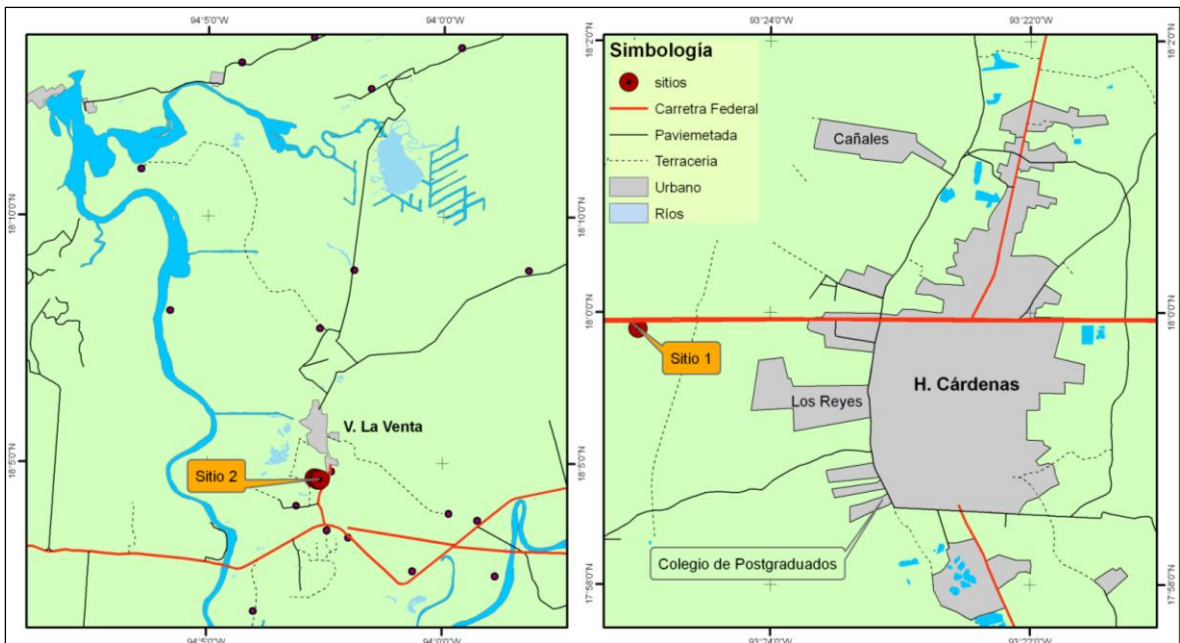


Figura 8. Ubicación del sitio-1 y sitio-2 para la colecta de suelos.

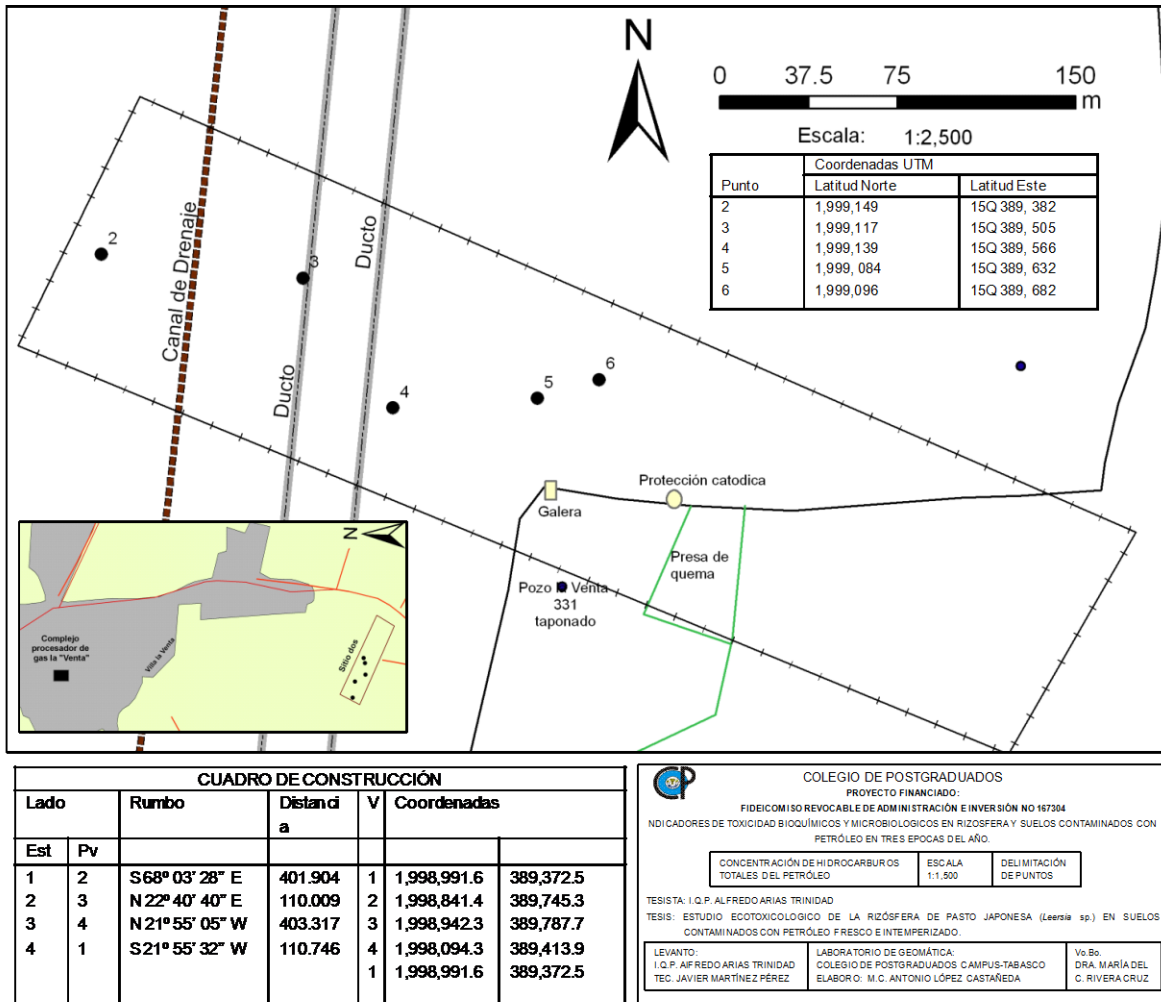


Figura 9. Ubicación de puntos de muestreo en el Sitio 2, en el ejido José Narciso Roviroso, La Venta, Huimanguillo, Tabasco.

5.1.2. Análisis físicos y químicos del suelo

Los seis suelo de los sitios uno y dos se les determino el pH en agua relación 2:1, el por ciento de carbón orgánico (Walkley y Black, 1934), N total (micro Kjeldhal) y la textura (método hidrométrico de Bouyoucos). Los métodos analíticos utilizados son los indicados en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). El análisis se realizó en el Laboratorio de químico del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícola y pecuario (INIFAP) de Huimanguillo, Tabasco. La extracción y cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se realizó mediante el método analítico 418.1 modificado para suelos y sedimentos (EPA, 1986). La

extracción de los hidrocarburos se realizó con diclorometano en equipo Soxhlet y la cuantificación de éstos se calculó por métodos gravimétricos con el procedimiento adaptado de la NMX-AA-134-SCFI-2006 (Consuegra, 2006).

El Cuadro 3 muestra las propiedades físicas y químicas del suelo testigo y de los cinco suelos contaminados con petróleo intemperizado. La interpretación de los resultados del análisis se realizó con referencia en los rangos indicados en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). El suelo sin petróleo tiene textura arcillosa, con un pH neutro, los contenidos de materia orgánica y el N total con índice de la reserva orgánica del suelo son muy altos.

Los suelos contaminados con petróleo intemperizado son: los dos primeros con textura franco arcillo-arenosa y los tres últimos arcillosa, el pH de los cinco suelos es moderadamente ácido debido a que se localizan en rango de 5.1-6.5, los contenidos de materia orgánica y N total son muy altos en los cinco suelos.

Cuadro 3. Propiedades físicas y químicas del suelo testigo (sin petróleo) y de cinco suelos con petróleo intemperizado.

Suelo	Textura	pH (H ₂ O _{1:2})	CO (%)	MO (%)	N _{total} (%)	HTP (mg kg ⁻¹ s.s.)
1 [†]	Arcillosas (testigo)	6.98	5.92	10.18	0.6	2, 607 (biogénico)
2 [‡]	Franco arcillo-arenosa	6.09	12.75	21.93	0.7	14, 173
3 [‡]	Franco arcillo-arenosa	5.71	13.42	23.08	0.6	28, 400
4 [‡]	Arcillosa	5.36	9.53	16.39	0.8	50, 598
5 [‡]	Arcillosa	6.49	13.72	23.59	0.7	75, 492
6 [‡]	Arcillosa	6.14	9.53	16.39	0.6	112,142

[†]Suelo del Gleysol 1; [‡]Suelo del Gleysol 2.
 Datos obtenidos de Trujillo-Narcía *et al.* (2006).

5.1.3. Preparación de materiales para las pruebas de fitotoxicidad y fitorremediación

5.1.3.1. Material vegetal

El material vegetal utilizado en la prueba de toxicidad y fitorremediación fue el pasto japonesa (*Leersia* sp.). Esta especie fue localizada en el suelo dos con petróleo intemperizado y en condiciones de anegamiento. La cobertura del pasto japonesa en el suelo al momento del muestreo fue 98%. Esta especie se identificó con las claves taxonómicas para gramíneas (Herrera *et al.*, 2010) en el Laboratorio de Química de usos múltiple de la Universidad Popular de la Chontalpa y con la colaboración del M.C. Antonio Trujillo Narcía.

5.1.3.2. Características morfológicas

El pasto japonesa es una gramínea que pertenece al género *Leersia* (Figura 10). Este género está constituido de unas 16 especies que se distribuyen alrededor del mundo tanto en regiones templadas como tropicales, apropiada para zonas húmedas en tierras bajas (Steinmann, 2008). El hábitat general son las selvas bajas de inundación y vegetación acuática (agrupaciones de hidrófitos) (CICY, 2012).

Son plantas herbáceas, anuales o perennes, cespitosas o rizomatosas, acuáticas o palustres. Su morfología comprende láminas usualmente lineares, sin falso pecíolo. Lígulas membranáceas. Inflorescencia en panoja. Espiguillas 1-3 flores, los antecios inferiores reducidos a lemmas estériles, sin extensión de la raquilla; generalmente comprimidas lateralmente, desarticulándose por encima de las glumas éstas ausentes o apenas discernibles. Lemma fértil membranácea a coriácea, 5-10 nervada, entera con o sin arista, pálea similar a la lemma, 3-7 nervada. Estambres usualmente 6 (Rosa *et al.*, 2005). Los periodos de floración y fructificación comprenden entre los meses de Junio hasta septiembre (CICY, 2012).



Figura 10. Morfología básica del pasto japonesa

5.1.3.3. Propagación de material vegetal

Se utilizó material vegetativo (yemas maduras) de pasto japonesa colectado durante el mes de mayo del 2012 en los suelos del sitio-2, un día después de la colectas se selecciono vástagos de 5 cm de longitud con yemas maduras y con esta material se estableció un almácigo en charolas de plástico de forma cónica (35 cm largo, 21 cm ancho y 15 cm altura) por un tiempo de un mes hasta alcanzar una altura de 12 ± 3.7 cm (Figura 11).

5.1.3.4. Petróleo fresco y contenedores

Se utilizaron dos tipos de petróleos; petróleo fresco recién extraído de un yacimiento del campo petrolero Cinco Presidentes, se obtuvo de la Batería No.5 de éste campo petrolero. El segundo es el petróleo intemperizado, se encuentra en los cinco suelos del sitio-2, el cual se ha depositado desde hace 22 años debido a las fugas de los ductos que conducen el petróleo crudo a las instalaciones del complejo Procesador de Gas La Venta, Tabasco. Para las pruebas de toxicidad y fitorremediación se utilizaron contenedores de vidrio cilíndricos de color blancos con capacidad de 2 000 mL, de 17.5 cm de diámetro y 22.3 cm de altura.

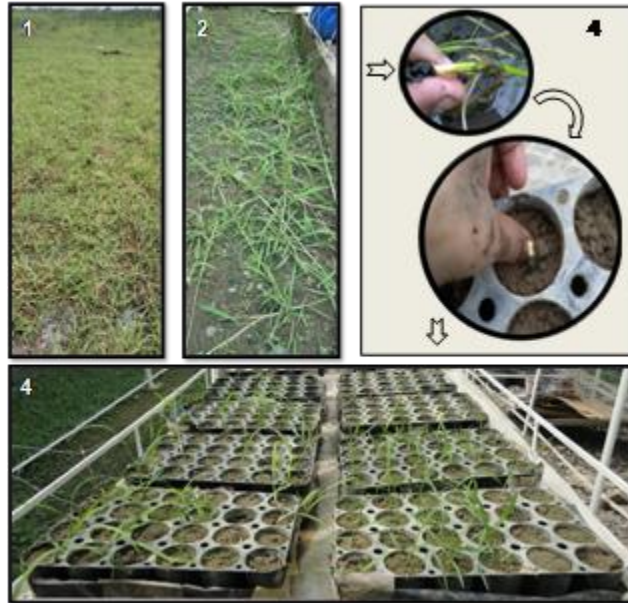


Figura 11. Esquema de la propagación del pasto japonesa: 1 y 2) traslado y siembra del pasto en invernadero; 3) selección de rizomas para reproducción en almácigos y 4) rizomas de pasto a los 30 días.

5.1.4. Establecimiento de bioensayos de fitotóxicidad y fitorremediación de petróleo fresco e intemperizado

Los bioensayos de fitotóxicidad y fitorremediación se realizaron sobre mesas metálicas instaladas bajo un túnel invernadero de plástico del área de Ciencia Ambiental. Se establecieron dos bioensayos de acuerdo con los criterios indicados en el protocolo para la evaluación del crecimiento de plantas terrestres No 208 de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE, 1984) modificado por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004). El bioensayo uno y dos se realizaron por un tiempo de seis meses, el proceso fisiológico se interrumpió a los tres y seis meses.

Se estableció los bioensayos: BIO1 con petróleo fresco (ocho concentraciones) y BIO2 con petróleo intemperizado (cinco concentraciones), bajo un diseño completamente al azar y con un solo factor de dosis de hidrocarburos totales del petróleo. Para ambos bioensayos se utilizó el tratamiento uno, como testigo con 2

607 mg kg⁻¹ de hidrocarburos de origen biogénico. En todos los tratamientos se sembró plántulas de pasto japonesa.

El BIO1 se estableció con las concentraciones; 6 000, 10 000, 30 000, 60 000, 90 000, 120 000, 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ HTPF base seca con ocho repeticiones por dosis, 64 unidades experimentales (Cuadro 4); y el BIO2 con 40 unidades experimentales (Cuadro 5), lo que hace un total de 112 unidades experimentales.

Cuadro 4. Tratamientos del bioensayo con petróleo fresco

Tratamiento	Tipo de suelo	Dosis de HTPF	Evaluación de las unidades experimentales	
		mg kg ⁻¹ s.s.	Tres meses	Seis meses
1	Suelo 1 [†]	2 607 (biogénico)	11,13,15,17	12,14,16,18
2	Suelo 1+PF	6 000	21,22,23,25	24,26,27,28
3	Suelo 1+PF	10 000	31,33,34,35	34,36,37,38
4	Suelo 1+PF	30 000	41,43,46,48	42,44,45,47
5	Suelo 1+PF	60 000	52,53,55,57	51,54,56,58
6	Suelo 1+PF	90 000	61,63,64,65	63,66,67,68
7	Suelo 1+PF	120 000	71,72,73,77	74,75,76,78
8	Suelo 1+PF	150 000	84,85,86,88	81,82,83,87
9	Suelo 1+PF	180 000	92,93,97,98	91,94,95,96

[†]Suelo 1. Ejido Arrollo Hondo. H. Cárdenas, Tabasco; HTPF: hidrocarburos totales de petróleo fresco; s.s.: suelo seco; PF: adición de petróleo fresco.

Cuadro 5. Tratamientos del bioensayo con petróleo intemperizado

Tratamiento	Tipo de suelo	Dosis de HTPI	Evaluación de las unidades experimentales	
		mg kg ⁻¹ s.s.	Tres meses	Seis meses
10	Suelo 2 [†]	14 173	101,103,106,107	102,104,105,108
11	Suelo 3 [†]	28 400	111,112,115,117	113,114,116,118
12	Suelo 4 [†]	50 598	122,123,125,128	121,124,126,127
13	Suelo 5 [†]	75 492	133,134,135,136	131,132,137,138
14	Suelo 6 [†]	112 142	142,143,144,146	141,144,145,148

[†]Ejido José Narciso Roviroza, Huimanguillo, Tabasco; HTPI: hidrocarburos totales de petróleo intemperizado; s.s.: suelo seco.

5.1.4.1. Preparación de unidades experimentales

Cada maceta de vidrio se consideró como una unidad experimental, se introdujo 1.5 kg de suelo en cada maceta y se preparó la concentración de petróleo fresco según tratamiento. Para las concentraciones de 6 000, 10 000, 30 000, 60 000, 90 000, 120 000, 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP, se pesaron respectivamente 12, 15, 45, 90, 108, 144, 210 y 252 g de petróleo fresco una balanza digital marca Ohaus (200g de capacidad). El petróleo se adicionó en el suelo dentro de una charola de aluminio, con una varilla de vidrio se mezcló hasta lograr una mezcla homogénea. Los suelos con petróleo intemperizado y el testigo se depositaron directamente en las macetas de vidrio. Se aplicó riego a las con agua potable hasta un 35% de la humedad de campo y a las 48 h se sembraron las plántulas de pasto japonesa. Se regó diariamente para mantener condiciones de anegamiento (Figura 12)

5.4.1.2. Variables fisiológicas de pasto japonesa en invernadero

Al mes después de establecidos los bioensayos y cada mes hasta los seis meses se determinaron las variables; longitud de estolones (cm) y número de hijuelos (no). A los tres meses y seis meses se evaluó diámetro del estolón (mm). La longitud de estolón (LE) de la planta, se midió con una regla graduada en centímetros de la parte basal del pasto hasta el ápice de la última hoja de los estolones. El diámetro de estolones (DH) se midió en la parte basal del pasto y se utilizó un vernier digital marca Multutoya.

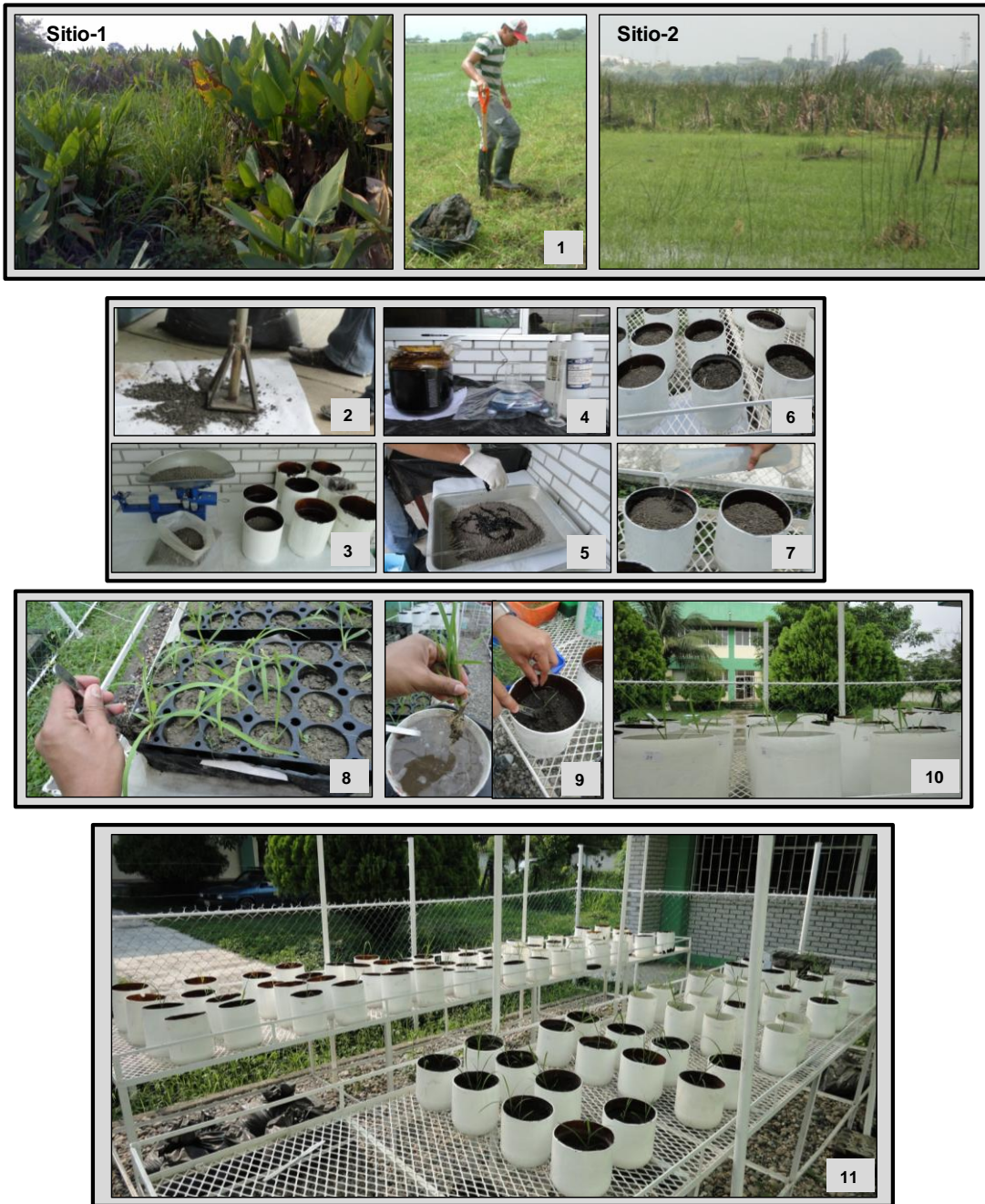


Figura12. Proceso del establecimiento de los bioensayos: 1) colecta del suelo; 2, 3) el suelo se seca, criba, tamiza y pesa; 4, 5,) se pesa petróleo fresco y se mezcla con suelo testigo (bioensayo 1); 6 y 7) se riega al 35% de la capacidad de campo y se deja reposar por 48 h; 8, 9, 10) se selecciona y lava las plántulas de pasto japonesa para su traspaso a las unidades experimentales con petróleo fresco e intemperizado y 11) Bioensayos a los 10 días.

5.2. Etapa II. Trabajo de laboratorio

5.2.1. Materia seca de pasto japonesa

A los tres meses y seis meses se determinó la biomasa radical (g), foliar (g) y total (g de materia seca) del pasto japonesa. La determinación de biomasa radical (BR), foliar (BF) y total (BT) se realizó conforme las recomendaciones de Alcántar *et al.* (1992), es decir se separo la parte aérea y radical de la planta, se coloco en bolsas de papel previamente etiquetadas, el material se seco en una estufa a 75° C durante 48 h, después el material se pesa en una balanza semianalítica.

5.2.2. Variables microbiológicas en la rizósfera de pasto japonesa

5.2.2.1. Densidad de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre

La determinación de la densidad de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre totales (BFN) y los generos *Azospirillum* sp. (AZOP) y *Azotobacter* sp. (AZOT) en rizósfera y rizoplano, se realizó con el método de cuenta viable por dilución seriada (Figura 13) en medios de cultivos específicos (Madigan *et al.*, 2009). Los medios de cultivos utilizados fueron:

Medio de cultivo carbón combinado para BFN: Solución A [0.8 g de K₂HPO₄, 0.2 g de KH₂PO₄, 0.1 g de NaCl, 0.025 de Na₂MoO₄.2H₂O, 4.9 g de Na₂FeEDTA, 15 g de agar y 900 ml de agua destilada], y solución B [0.2 g de MgSO₄.7H₂O, 0.06 g de CaCl₂.H₂O, 100 ml agua destilada] (Rennie, 1981).

Medio de cultivo rojo congo para AZOP: [5 g de ácido málico, 0.5 g de K₂HPO, 0.2 g de MgSO₄.7H₂O, 0.1 g de NaCl, 0.5 g de extracto de levadura, 0.015 g de FeCl₃.6H₂O, 4.8 g de KOH, 15 ml de rojo congo, 20 g de agar y 1000 ml de agua destilada, pH 7.0] (Reinhold *et al.*, 1987).

Medio de cultivo Ashby [20 g de manitol, 0.2 g de K₂HPO₄, 0.2 g de MgSO₄.7H₂O, 0.2 g de NaCl, 0.1g de K₂SO₄, 5 g de CaCO₃, 15 g de agar y 1000 mL de agua destilada, pH 7.0] (Döbereiner, 1976).

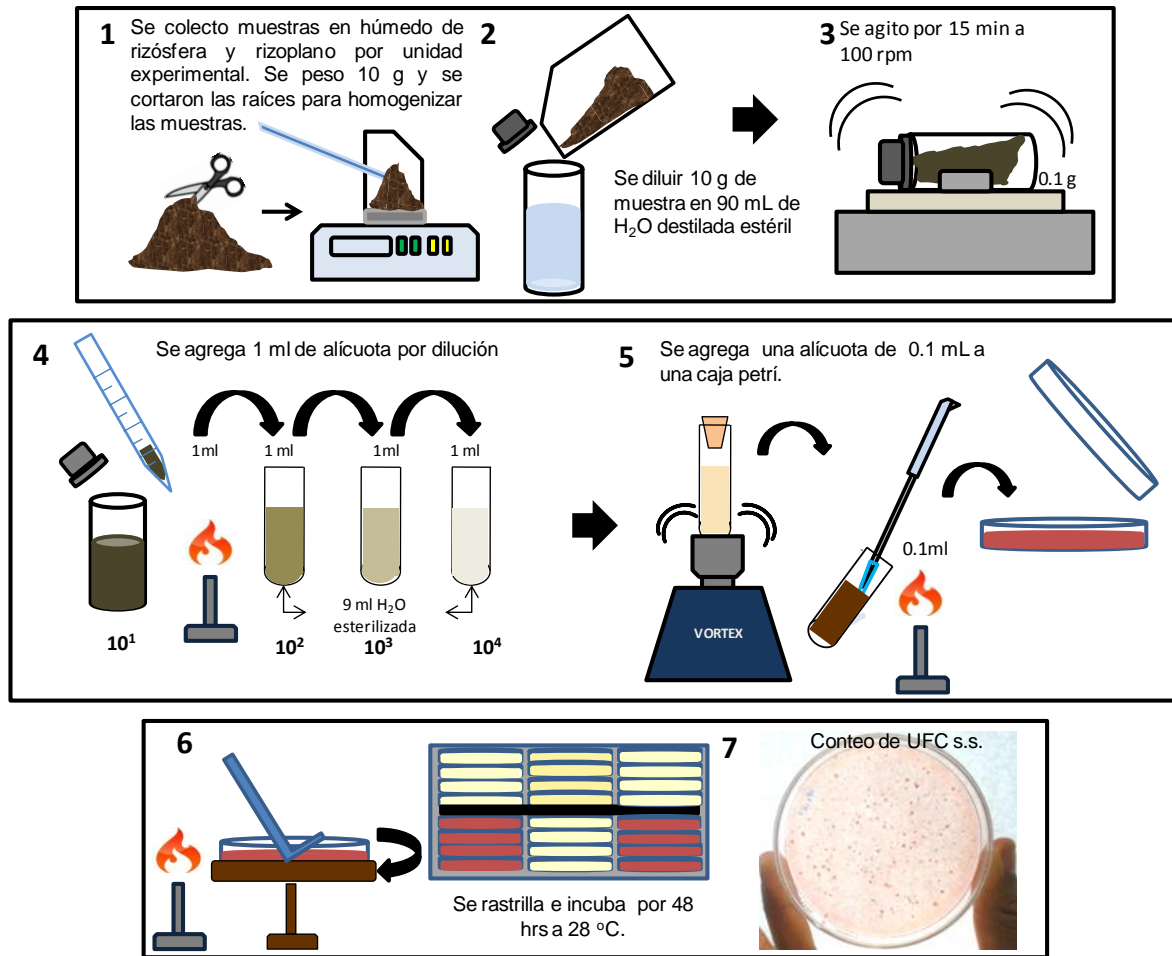


Figura 13. Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar en rizósfera.

5.2.2.2. Determinación de bacterias sulfato reductoras

La estimación de bacterias sulfato-reductoras (BSR) y el grupo Desulfuvibrio se determino por el método del Número Más Probable (NMP) (Madigan et al., 2009). Este método asume que en las series de diluciones los microorganismos se encuentran distribuidos al azar y que al menos un microorganismo generará crecimiento, produciendo una respuesta positiva (turbidez, cambio de color del medio, producción de algún metabolito específico). Esta técnica se basa en la estimación de la densidad bacteriana por el método estadístico de máxima probabilidad, utilizando la teoría de las diluciones (Fernández et al., 2006).

Los medios de cultivos utilizados fueron:

El medio de cultivo agar BTA para BSR (Fernández et al., 2006), compuesto por: 20 g L-1 bacto agar, 10 g L-1 bactotripton, sulfito de sodio 1 g L-1, 10 mL citrato férrico 5% y 1000 mL de agua destilada (pH 7).

El medio de cultivo Postgate C modificado para bacterias del grupo Desulfuvibrio, constituido de tres soluciones: i) 2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 3 g de NaCl, 1 g Na_2CO_3 , 1 g de $NH_4Cl \cdot 6H_2O$, 0.1 g de ascorbato de sodio ($C_6H_7NaO_6$), 0.1 g de tioglicolato de sodio y 400 mL de agua destilada; ii) 0.5 g de K_2HPO_4 , 25 g de agar nutritivo y 200 mL de agua destilada y iii) 3 g de Lactato de sodio, 1 g extracto de levadura y 400 mL de agua destilada, ajustar el pH a 7.5. Rellenar con 9 mL tubos de ensayo y esterilizar en autoclave durante 20 min a 15 lb/pulg² de presión y 121° C. Las tres soluciones se mezclan y se agrega 0.1 mL de sulfato ferroso amónico ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) al 1% (1g de sulfato ferroso amoniaco en 100 mL de agua destilada, pH 7) (Postgate, 1963).

Para ambos medios, los tubos de dilución (1/10) se rellenaron con 9 mL de solución fisiológica salina anóxica (8.5 g de NaCl, 0.5 g de cisteína-HCl y 1 mL de solución de resazurina en matraz Erlenmeyer y disolver en 1000 mL de agua destilada, ajusta pH a 7). Posteriormente esterilizar los tubos en autoclave durante 20 min a 15 lb/pulg² de presión y 121° C. El proceso de la evaluación de las bacterias se describe a continuación (Figura 14).

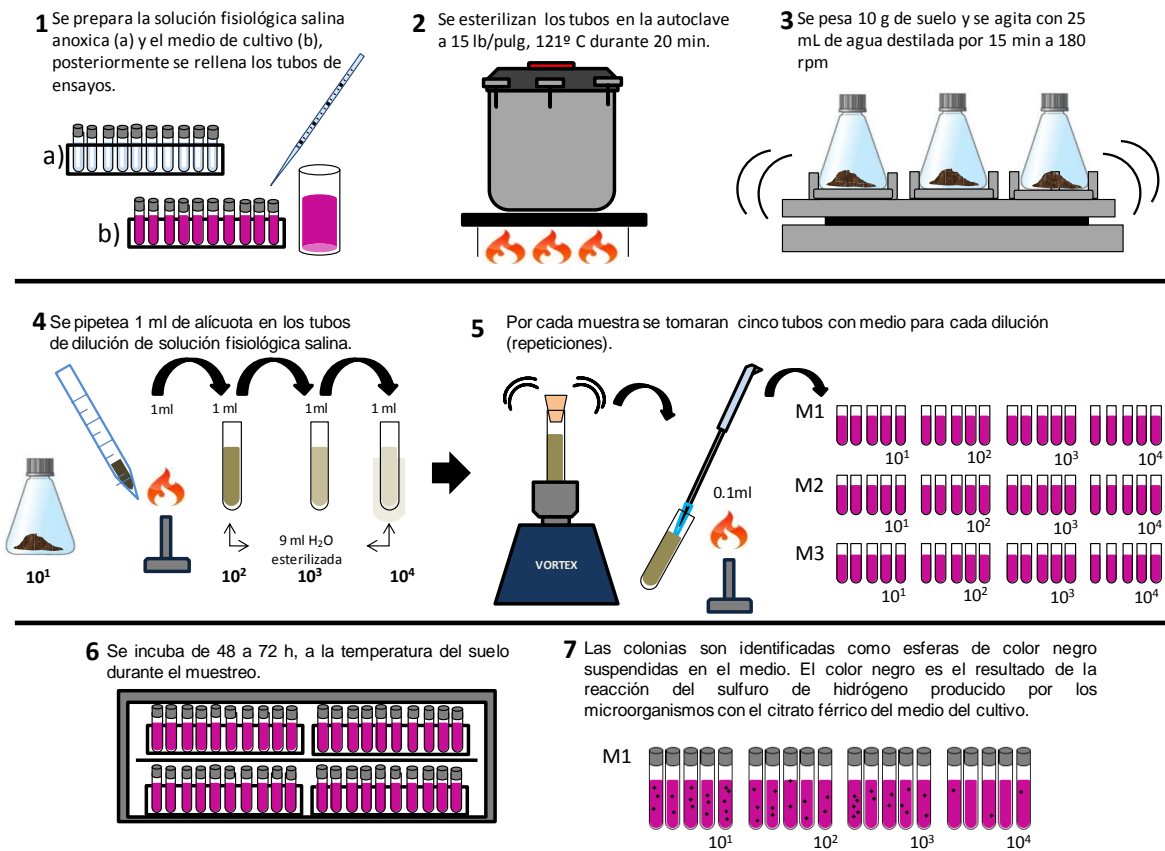


Figura 14. Procedimiento para la determinación de las bacterias sulfato reductoras.

5.2.3. Variables bioquímicas

5.2.3.1. Actividad enzimática ureasa

La ureasa es una enzima que cataliza la hidrólisis de urea con un mecanismo de reacción basado en la formación de carbamato como intermediario. La urea adicionada a suelos como fertilizantes o la orina de animales es hidrolizada enzimáticamente por la ureasa ($\text{NH}_2\text{CONH}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2$), lo que resulta en la liberación de amonio y eleva el pH de los suelos (Tabatabai y Bremner, 1972a). La actividad enzimática de la ureasa se determinó de acuerdo con el método colorimétrico de Kandeler y Gerber (1988). Por cada muestra a analizar se elaboró un control y, a su vez, se realizaron dos blancos por lote de muestras y control para medir la absorbancia en el espectrofotómetro a 690 nm.

Se realizó una curva de calibración. Como solución patrón se utilizó NH_4Cl 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se dispuso de cinco matraces los cuales contenían 0, 1, 1.5, 2 y 2.5 mL

respectivamente de la solución patrón y se aforo a 100 mL con KCl 1M acidulada. A continuación, de cada matraz se extrajo 1 mL y se depositó matraces de 10 mL, a los cuales se agregó 1.6 mL de la disolución de Salicilato-Na/NaOH (0.3 M) y 0.8 mL de la solución dicloro-isocianida de sodio 0.1% y se aforo con agua destilada. Se agitan en vortex y se deja en oscuridad por 45 min, posteriormente se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a 660 nm (color verde azulado).

Para evaluar la ureasa, el suelo se pasó por tamiz de 2mm, tomando 0.5 g y se agregó 2 ml de tampón fosfato 0.1 y pH 7, a las muestras se les agregó 0.5 mL de urea (99.7% de pureza, marca J.T. Baker), los controles no contenían urea, y se colocaron en baño maría durante 1.30 h a 30° C (Figura 19a). Transcurrido ese tiempo se sacaron del baño maría agregando 7.5 ml de agua destilada estéril a las muestras y 8 mL a los controles (Figura 8). Se centrifugaron durante 8 min a 3 400 rpm posteriormente se agregó 5.8 mL de agua destilada estéril más 0.8 mL de citrato sódico (99% de pureza, marca Merck), 1.6 mL de mezcla de salicilato sódico (99.5% de pureza, marca Meyer) con nitroprusiato sódico (99% de pureza, marca Fluka Analytical) y 0.8 mL de mezcla de dicloro isocianomurato (98% de pureza, marca Aldrich Chemistry) con hidróxido de sodio (97.4% de pureza, marca J.T. Baker). Las muestras y los controles se dejaron duran 45 min en oscuridad y finalmente se midió la absorbancia de las muestras, controles y blancos en un espectrofotómetro a 690 nm (Figura 15).

Para determinar la actividad de la ureasa (AE, $\mu\text{moles de N-NH}_4^+ \text{ g}^{-1} \text{ s.s. h}^{-1}$) y se calcula usando la siguiente expresión:

$$AE = [(S-B) \cdot V] / [G \cdot T \cdot P_m \cdot 1000]$$

Donde:

S=Cantidad de N-NH_4^+ en las muestras ($\mu\text{g de N-NH}_4^+$) obtenida de la curva estándar utilizando como coordenadas las cantidades totales de N en cada una de las disoluciones patrón e indicadas más arriba.

B=Cantidad de N-NH_4^+ para los blancos

V=Volumen total del extracto de incubación (en este caso 10 mL)

G=Factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizada en el ensayo.

T=Factor relativo al tiempo de incubación, en horas (en este caso, 1,5 h)

P_m = Peso atómico del nitrógeno (14)

1000= Factor de transformación para expresar en milimoles.

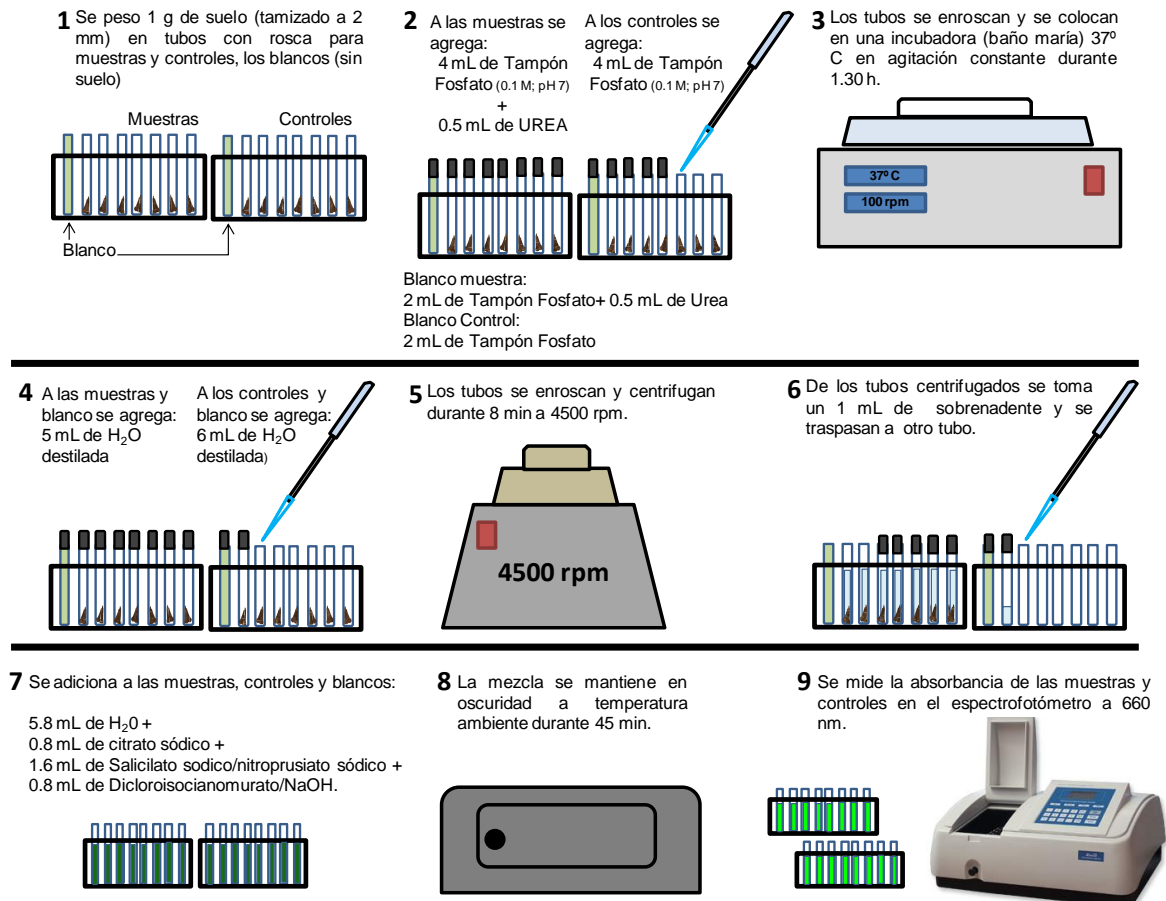


Figura 15. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática ureasa.

5.2.3.2. Actividad enzimática arilsulfatasa

Las arilsulfatasas son enzimas que catalizan la hidrólisis de un anión arilsulfato ($R-O-SO_3^- + H_2O \rightarrow ROH + H^+ + SO_4^{2-}$) por rotura del enlace O-S (González *et al.*, 2003). La arilsulfatasa participa en el proceso de hidrólisis del éster sulfato de la materia orgánica del suelo liberando azufre, como ion sulfato [SO_4^{2-}] (Reyes *et al.*, 2011).

La actividad de la arilsulfatasa se determinó según el método de Tabatabai y Bremner (1970), que está basado en la estimación colorimétrica del p-Nitrofenol liberado por la actividad sulfatasa cuando el suelo es incubado con p-Nitrofenil Sulfato. Para cada muestras a analizar se elaboro un control y, a su vez se realizaron dos blancos por lote de muestras y control para medición en el espectrofotómetro.

La curva de calibración que permite determinar correctamente la actividad enzimática, se prepara con una solución madre de p-Nitrofenol ($C_6H_5NO_3$)(pNP) 0.1% [1 g de p-Nitrofenol (marca Fluka) en agua destilada y se afora a 100 mL], de esta solución se toman 5 mL y se afora a 100 mL con agua destilada, así se obtiene una disolución patrón de 50 μg de p-Nitrofenol mL^{-1} . Se pipetea alícuotas de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mL en matraces de 50 mL, se adiciona 4 mL de NaOH (2M) y 1 mL CaCl_2 0.2M y se afora con agua destilada. Se dejan reposar a temperatura ambiente 20 min y se mide la absorbancia a 410 nm (color amarillo intenso).

El procedimiento para determinar la actividad enzimática, es el siguiente (Figura 16): Se pesa 1.5 g de suelo húmedo a los que se añaden 4 mL solución amortiguadora acetato de amonio 0,5 M pH 5.8 y 1 mL de potasio 4-Nitrofenil sulfato ($C_6H_4KNO_6S$, marca Sigma); se incuba a 37° C durante 1 hora. A continuación se enfría en un baño de agua/hielo y se añaden 1 mL de CaCl_2 2M y 4 mL de NaOH 0.2 M. Posteriormente se filtra y se mide la absorbancia a 400 nm. Los blancos se preparan de forma análoga a las muestras, pero el substrato se añade inmediatamente antes de filtrar. Es preciso preparar 4 patrones por suelo. Los patrones se preparan del mismo modo que los blancos, pero empleando 1 mL de disoluciones 25, 50, 100 y 200 μg mL^{-1} en lugar de 1 mL de agua. Las determinaciones se efectuaron por triplicado. Los resultados se expresan en μmoles de p-nitrofenol $\text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$].

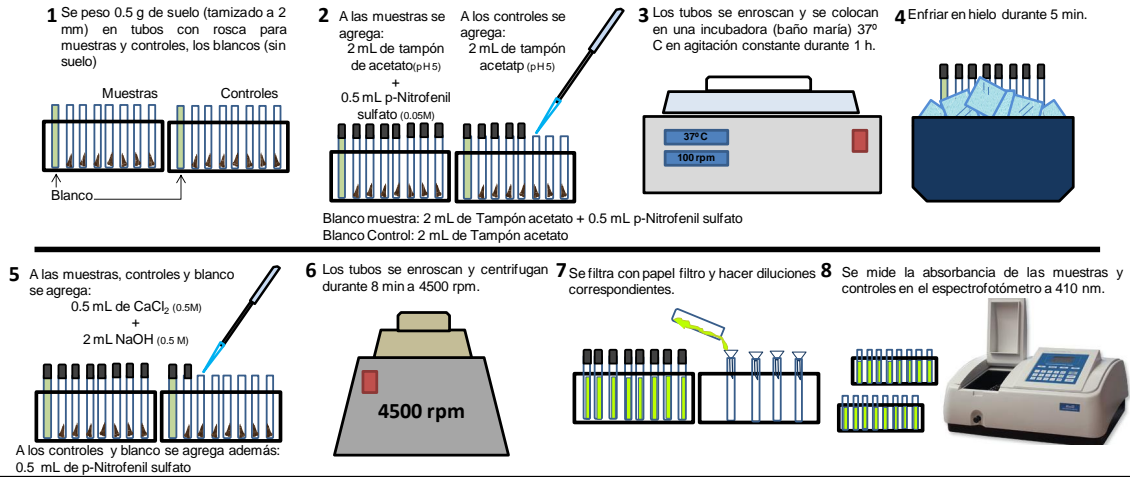


Figura 16. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática arilsulfatasa.

Para determinar la actividad enzimática de la arilsulfatasa (AE, $\mu\text{moles de pNP g}^{-1} \text{min}^{-1}$) y se calcula usando la siguiente expresión:

$$AE = \frac{(C \cdot V \cdot V')}{(G \cdot T \cdot P_m)}$$

C= Cantidad de pNP en la muestra ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

V=Factor de dilución utilizado

V'= Factor de dilución de la muestra incubada (si es necesario realizar dicha dilución).

P_m= Peso molecular del pNP (139).

G= Factor relativo a la cantidad de suelo seco utilizado (g)

T=Factor de tiempo de incubación (60 min)

5.2.4. Análisis químicos

Los análisis de las variables químicas del suelo pH, hidrocarburos totales del petróleo (HTP) y sulfatos se determinaron a los tres y seis meses. pH y los contenidos de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) se evaluaron con los métodos mencionados en el apartado 2.1.2.

5.2.4.1. Determinación turbidimétrica de sulfatos como BaSO₄

La concentración de sulfatos se valoró espectrofotométricamente a 670 nm utilizando el método de precipitados de sulfatos por cloruro de bario (Alcantar *et al.* 1992; Tabatabai y Bremner, 1972b). A pesar de que el S en forma de SO₄²⁻ sólo representa el 3% del S total del suelo, en esta práctica se determinara la concentración de sulfato por ser ésta la forma de azufre asimilable por las plantas. La determinación de la concentración de SO₄²⁻ se realizara por turbidimetría. Este tipo de espectrofotometría se basa en la medida de la cantidad de luz dispersada por partículas en suspensión. En este caso el ion SO₄²⁻ precipita por adición de Ba²⁺ como BaSO₄ en forma de cristales de tamaño uniforme. Estos cristales permanecen en suspensión homogénea durante un período de tiempo suficiente como para medir la cantidad de luz dispersada.

Las soluciones y disoluciones utilizados en el procedimiento de cuantificación fueron: la solución de BaCl₂-Goma arábica-CH₃COOH [5 g de goma arábica en 500 mL de agua caliente, se adiciona 50 g de BaCl₂·2H₂O y 450 mL de CH₃COOH glacial 2N, y se afora a 1 L]; Solución estándar de 100 ppm de S [0.5435 g de K₂SO₄ en 500 mL de agua destilada, se adiciono 10 mL de CH₃COOH glacial 2N y se afora a 1L]; la solución extractora 500 ppm P en CH₃COOH 2N [2.03 g de Ca(H₂PO₄)₂·H₂O se diluye en 800 mL de agua destilada, se adiciona 115 mL de CH₃COOH 2N y se afora a 1L]; Solución de 2000 ppm P [Se diluye 8.12 g de Ca(H₂PO₄)₂·H₂O en 300 mL de agua destilada, se adiciona 460 mL de CH₃COOH 8N y se afora a 1L].

Para la curva estándar se prepararon soluciones estándares de 0, 2, 4, 8, 10, 15 y 20 mg L⁻¹ de S, transfiriendo 0, 2, 4, 8, 10, 15 y 20 mL de la solución de 100 ppm de S a matraces de 100 mL. Se adicionó, 25 mL de la solución de 2000 ppm de P, y se afóro con solución extractora. Posteriormente en tubos de ensayos se adiciona 10 mL de cada solución estándar y se agrega 2 mL de la solución BaCl₂-Goma arábica-CH₃COOH, se agita 5 min en vortex y se deja reposar 20 min. Posteriormente se lee la absorbancia a 670 nm. Se obtuvo una curva de calibración con R²=0.985.

El proceso de las muestras para su evaluación es el siguiente (Figura 17): Se pesa 10 g de suelo y se transfieren a un matraz Erlenmeyer de 50 mL, se adiciona 25 mL de la solución extractora y se enrosacan. Posteriormente se agitan durante 15 min a 180 rpm. Se filtra el sobrenadante con papel Whatman 2. Se toma 10 mL del filtrado y se agrega 2 mL de BaCl₂-Goma arábica-CH₃COOH, se agita por 5 min en vortex y se deja reposar 20 min, posteriormente se lee su absorbancia a 670.

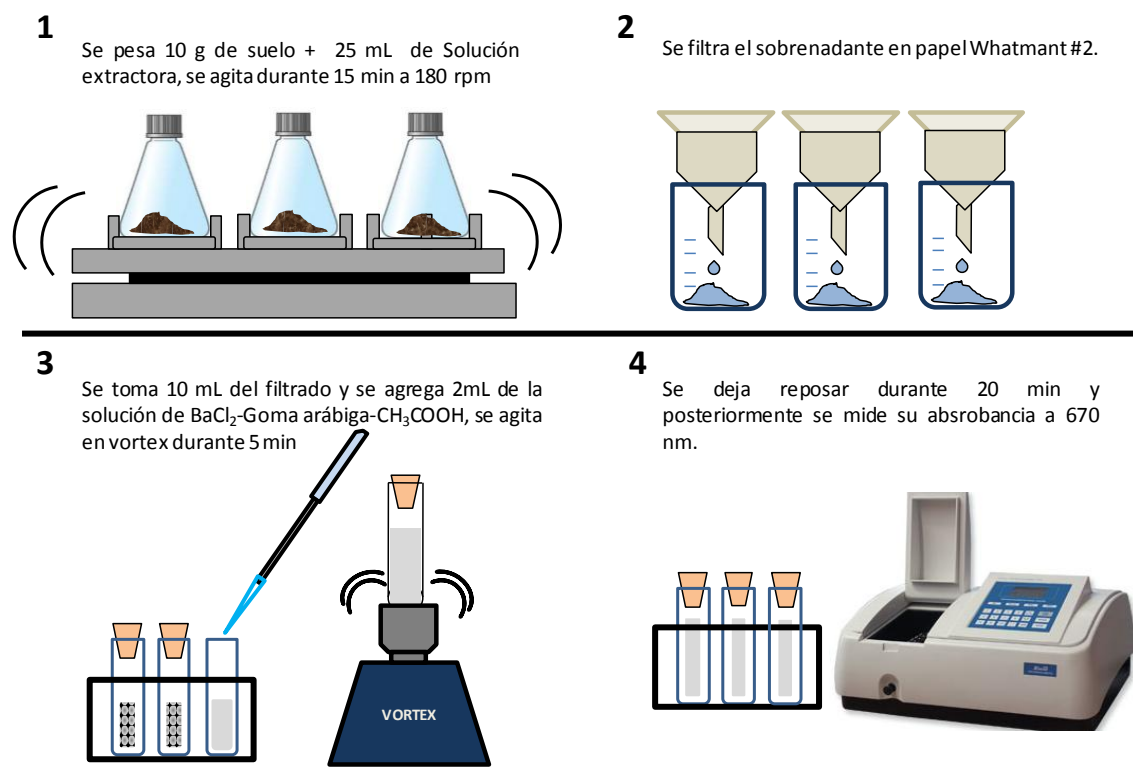


Figura 17. Procedimiento para la determinación S-SO₄.

Para calcular S-SO₄ (ppm), se utilizo la siguiente fórmula:

$$S-SO_4 \text{ (ppm)} = \text{ppm en CC} \times Dv$$

Donde

CC= curva de calibración de las soluciones estándar

Dv= Dilución de la muestra al leer en el espectrofotómetro

5.3. Etapa III. Análisis estadístico

El programa SPSS se usó para realizar el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables evaluadas, de acuerdo al modelo lineal del diseño experimental propuesto como diseño completamente al azar. La comparación de medias se realizó de acuerdo con la prueba de Tukey, ($p \leq 0.05$). Los datos se procesaron en el programa SPSS versión 20 para el análisis de varianza.

5.3.1. Índices absolutos y relativos de impacto ambiental

Los índices relativos y absolutos de impacto ambiental de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado se determinaron para observar la sensibilidad de los parámetros fisiológicos, bioquímicos y químicos de los bioensayos. Su determinación se basó con respecto a las siguientes ecuaciones (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004):

$$IRIA = 1 - [(T_p R_1) / T_t]$$

$$IAIA = [(\sum_{i=1}^n IRIA) / n] \quad i = 1, 2, \dots, t$$

Donde:

$IRIA_{(x)}$ = índice relativo de impacto ambiental

$IAIA$ = índice absoluto de impacto ambiental

T_p = tratamiento con HTP

T_t = tratamiento testigo

R_1 : repetición 1...n

n = número de variables

Los resultados se interpretaron en criterios a:

si $IRIA$ o $IAIA_{(x)} = 0$; el efecto es neutro (no se afectó a la variable)

si $IRIA$ o $IAIA_{(x)} > 0$; el efecto es negativo (inhibición)

si $IRIA$ o $IAIA_{(x)} < 0$; el efecto es positivo (estimulación) sobre la variable.

SECCIÓN VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Crecimiento y biomasa vegetal del pasto japonesa

El crecimiento fue medido por la longitud de estolones (LE), el número de hijuelos (NH) y el diámetro de hijuelos (DH). La LE se midió a partir del mes uno y cada mes hasta los seis meses. El DH a los tres y seis meses.

6.1.1. Longitud de estolones

La prueba de medias de la LE tuvieron diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) por efecto de la concentración de petróleo fresco (Figura 18a; Apéndices, Cuadro 1) e intemperizado (Figura 18b; Apéndices, Cuadro 16). La LE presentó la fase logarítmica y lineal de crecimiento constante a través del tiempo en cada uno de los nueve tratamientos del BIO1 y en los seis del BIO2.

La mayor LE (299 cm) a los tres meses y (504 cm) a los seis meses de PJ en suelo con petróleo fresco, se presentó en el tratamiento dos con $6\,000\text{ mg kg}^{-1}$ de HTPF, pero la menor en ambos tiempos respectivamente fue de 157 y 368 cm. En suelo con $120\,000\text{ mg kg}^{-1}$ (tratamiento siete), sobresale que el PJ en suelo con $150\,000$ y $180\,000\text{ mg kg}^{-1}$ de HTPF presentó mayor LE respecto al tratamiento siete (Figura 18a). Esto refleja que la tendencia de la LE respecto a la dosis de petróleo fresco en el suelo es irregular, debido a que dosis de 6000 mg kg^{-1} estimulan su desarrollo y con dosis superiores de hasta $180\,000\text{ mg kg}^{-1}$ HTPF la planta mantiene su crecimiento y únicamente disminuye a los tres y seis meses un 4.96 y 12.89% respecto al tratamiento testigo (TT). Sin embargo, una respuesta similar pero con dosis de HTP inferiores a los límites máximos permisibles en el suelo, Basumatary *et al.* (2012) reportó un crecimiento exponencial en la altura *Cyperus rotundus*, en cinco dosis de PF que van de 205 a $1\,020\text{ mg kg}^{-1}$ de HTP.

La LE a los tres meses, en suelo con petróleo intemperizado (BIO2), presentó una tendencia irregular respecto a la dosis de HTPI, pero a los seis meses esta fue inversamente proporcional respecto a la dosis de HTPI. A los tres y seis meses la mayor LE se presentó en TT, pero a los tres meses la menor (175 cm) en suelo con $50\,598\text{ mg kg}^{-1}$ y en el segundo tiempo de evaluación la menor con 303 cm en suelo con $112\,142\text{ mg kg}^{-1}$ HTPI (Figura 18b). La reducción de la LE a los seis meses por efecto de la dosis mayor de petróleo intemperizado ($112\,142\text{ mg kg}^{-1}$) utilizada en el BIO2, fue de 35.94%. Resultados diferentes pero con *Vigna unguiculata* expuestas a ocho dosis desde 5 822 hasta $50\,297\text{ mg kg}^{-1}$ de HTPI presentan un comportamiento irregular en su altura (Ramírez, 2012).

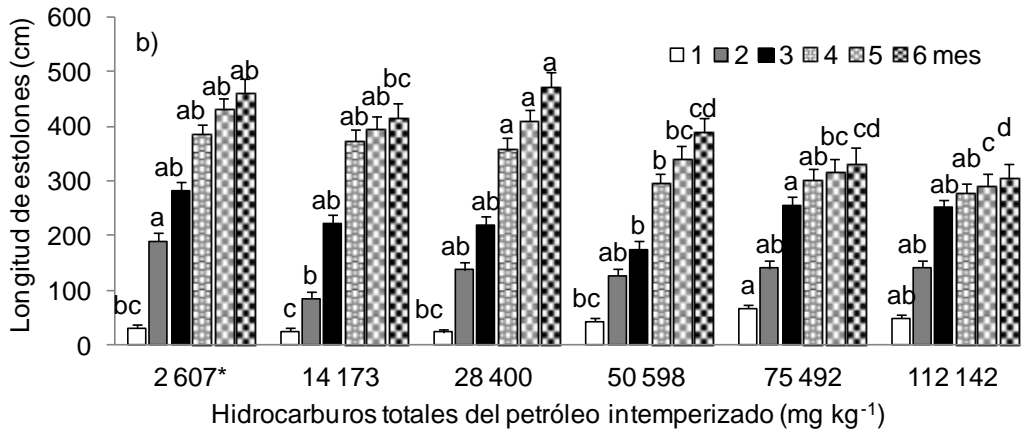
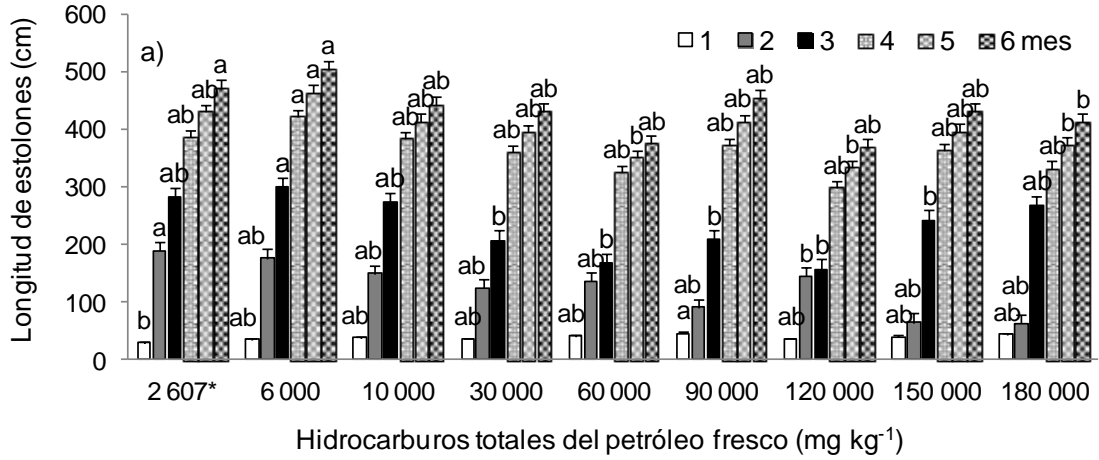


Figura 18a. Variación en el crecimiento del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, en tiempo sucesivo después del trasplante. a). Petróleo fresco y b). Petróleo intemperizado. *hidrocarburos de origen biogénico. Barras con diferentes letras en cada uno de los tiempos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

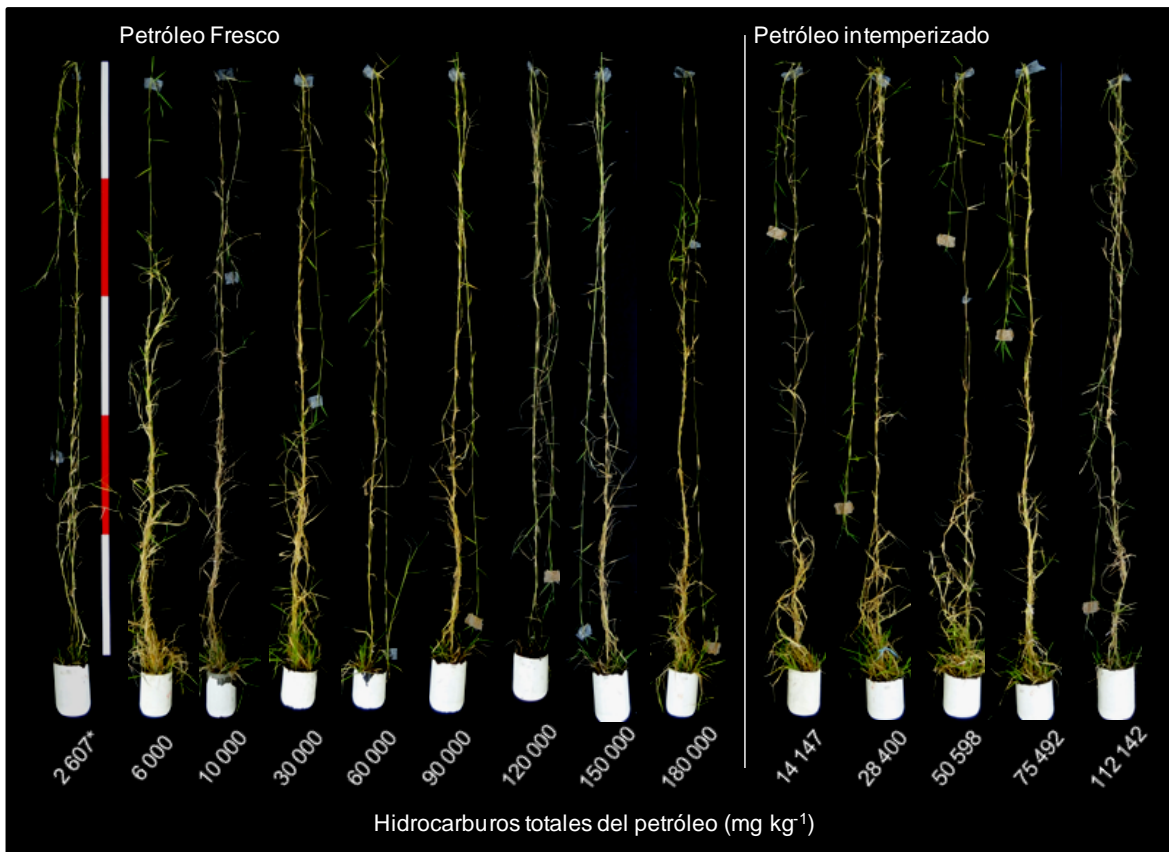


Figura 18b. Variación en el crecimiento del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado, a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico. Cada franja de color equivale a 50 cm.

6.1.2. Número de hijuelos

Las medias del NH a los tres y seis meses presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos por efecto de petróleo fresco (Figura 19a; Apéndice, Cuadro 2) e intemperizado (Figuras 19b; Apéndice, Cuadro 17) (Tukey, $p \leq 0.05$).

En los dos tiempos evaluados el NH de pasto japonesa plantado en suelo con petróleo fresco, no presenta una tendencia inversamente proporcional por efecto de las dosis, las ocho dosis de petróleo fresco estimulan el crecimiento de hijuelo. El TT registro el menor NH a los tres (14) y seis (25) meses. El tratamiento cinco (60 000 mg kg^{-1}) estimulo el mayor NH a los tres (26) y seis (43) meses (Figura 19). la NH presenta una tendencia directamente proporcional a los tres y seis

meses. Respuestas distintas encontró Rivera-Cruz, (2001) en plantas de pasto alemán e indica que el número de plantas disminuyen cuando aumenta la dosis de petróleo fresco.

El NH en suelo con petróleo intemperizado a los tres y seis meses, evidencia una tendencia directamente proporcional a la dosis de HTPI en el suelo a partir del tratamiento cuatro ($50\ 598\ \text{mg kg}^{-1}$) hasta el seis ($112\ 142\ \text{mg kg}^{-1}$). El mayor NH a los tres (23) y seis (43) meses se presentó en el tratamiento seis del BIO2 ($112\ 142\ \text{mg kg}^{-1}$). En los tratamientos dos y tres a los tres meses no presentaron diferencias significativas con el tratamiento testigo, sin embargo a los tres meses el NH disminuyó en un 40% y 8% en relación al TT, respectivamente.

El comportamiento del NH es un parámetro que permite indicar que el pasto japonesa es una gramínea adaptada a suelos impactados por la contaminación con petróleo fresco e intemperizado, posiblemente su sistema rizosférico permite que se desarrollen procesos de degradación y mineralización de moléculas orgánicas como los hidrocarburos derivados del petróleo fresco y del intemperizado para disponer de los nutrientes necesarios para su desarrollo y crecimiento (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2012).

Por lo tanto el NH en PJ es un parámetro que es estimulado por dosis altas de petróleo fresco, sin embargo resultados contrarios fueron reportados por Rivera-Cruz, (2001) en plantas de pasto alemán, el número de plantas disminuyen hasta cuando aumenta la dosis de petróleo fresco.

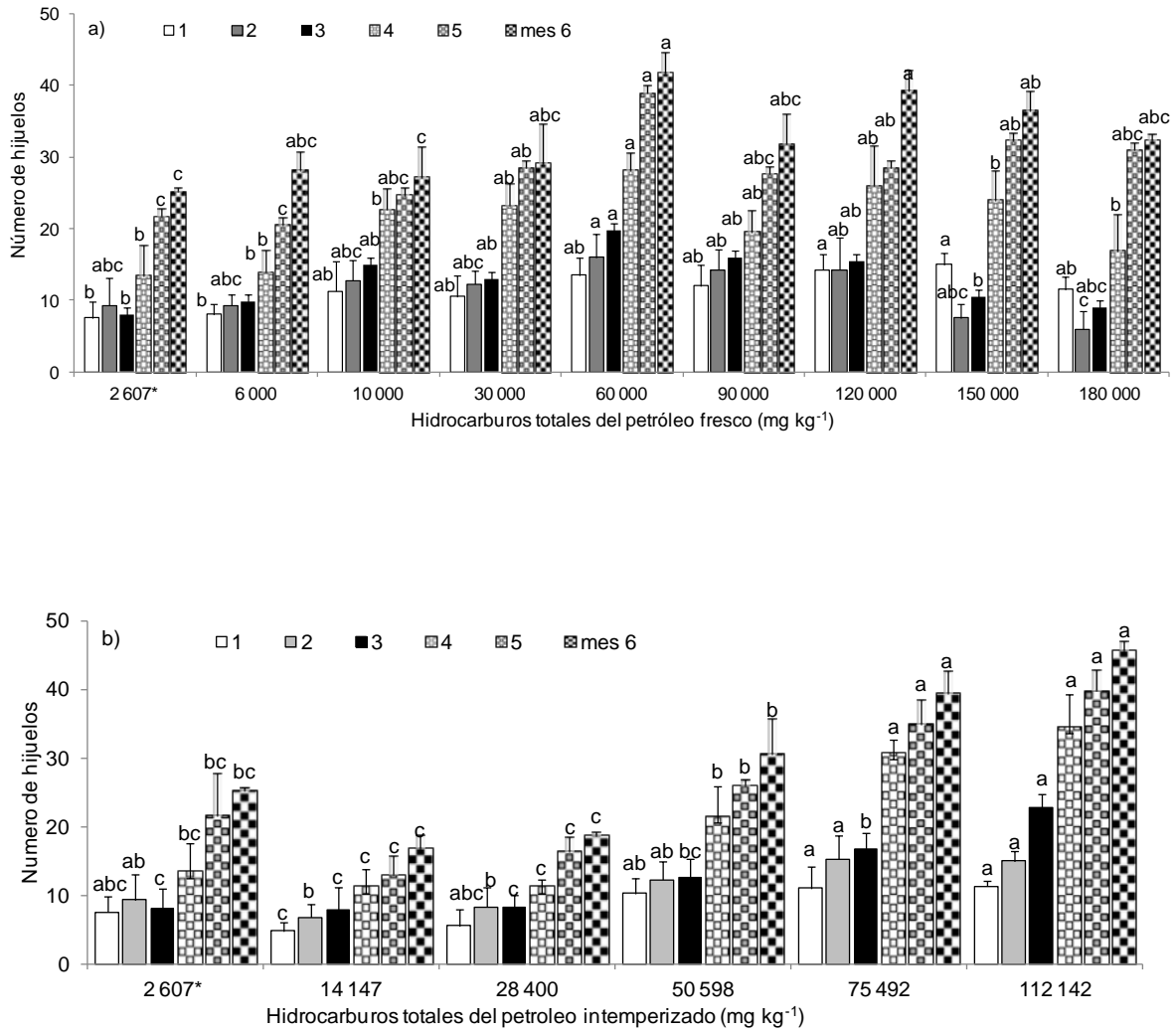


Figura 19a. Crecimiento del número de hijuelos del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado en tiempo sucesivo después del trasplante. a). Petróleo fresco y b). Petróleo intemperizado.*hidrocarburos de origen biogénico. Barras con diferentes letras en cada uno de los tiempos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

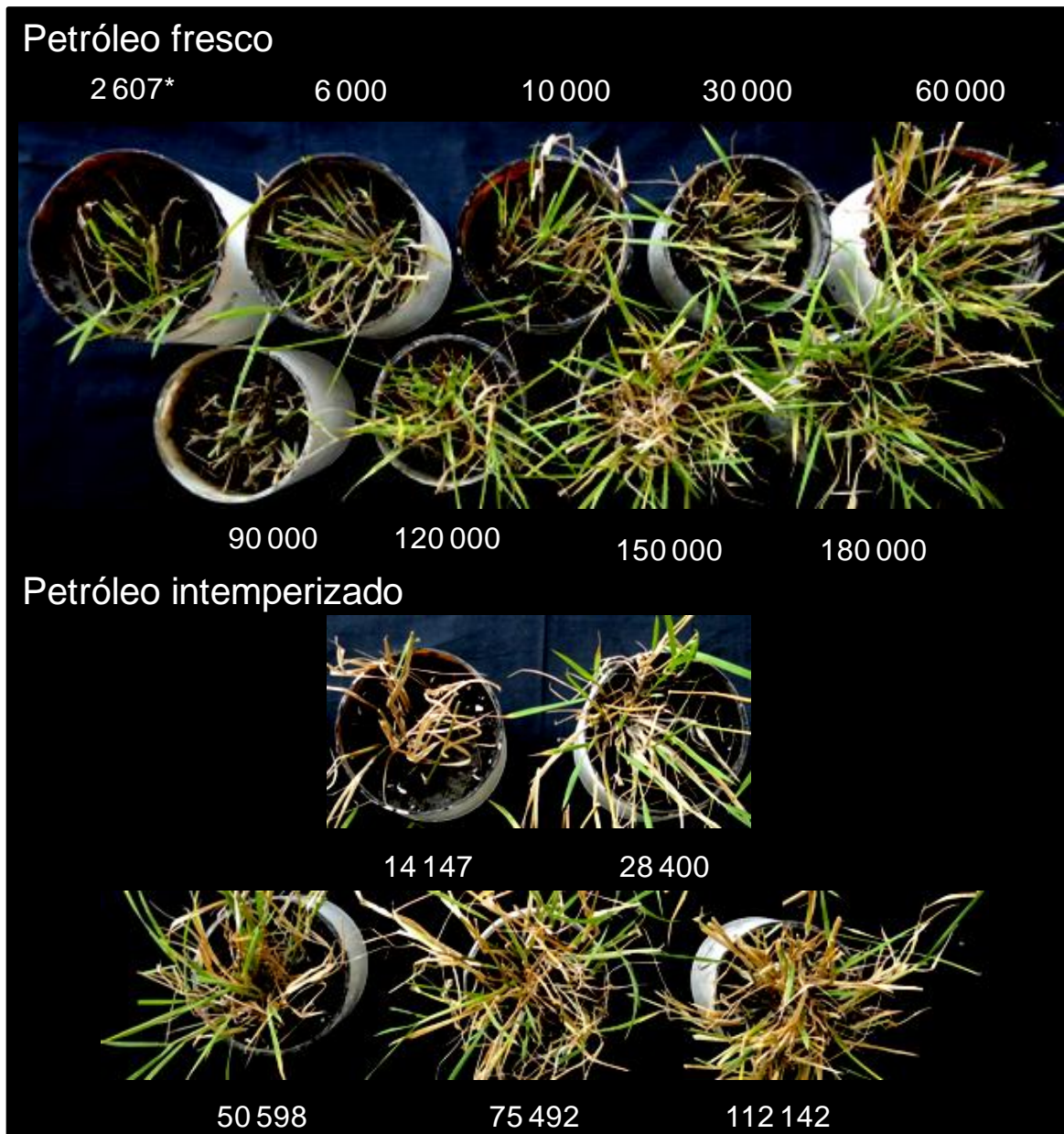


Figura 19b. Crecimiento del número de hijuelos del pasto japonesa por efecto de dosis de petróleo fresco e intemperizado. *hidrocarburos de origen biogénico. Cada franja de color equivale a 50 cm.

6.1.3. Diámetro de hijuelos

El diámetro de hijuelos (DH) en ambos BIOs presento diferencias estadísticas significativas, entre las dosis de petróleo fresco (Figura 20; Apéndice, Cuadro 3) e intemperizado (Figura 20; Apéndice, Cuadro 18) en ambos tiempos (Tukey, $p \leq 0.05$).

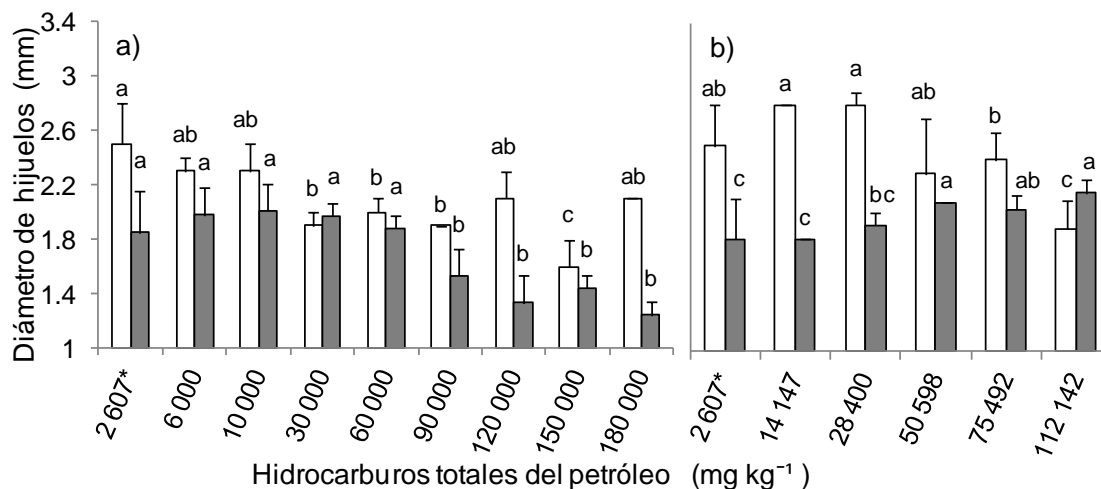


Figura 20. Diámetro de hijuelos de pasto japonesa en suelo con petróleo: a) fresco y b) intemperizado, a los tres (□) y seis (■) meses. *hidrocarburos de origen biogénico. Barras con diferentes letras en cada uno de los tiempos son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

El DH en petróleo fresco a los tres meses, registro el mayor valor (2.5 mm) en el TT y el menor (1.6 mm) en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹) (Figura 20a), es evidente una relación inversamente proporcional al contenido de hidrocarburos en los ocho tratamientos con petróleo fresco. Sin embargo, a los seis meses no presentaron diferencias estadísticas significativas en el tratamiento dos (6 000 mg kg⁻¹ de HTP), tres (10 000 mg kg⁻¹ de HTP), cuatro (30 000 mg kg⁻¹ de HTP) y cinco (60 000 mg kg⁻¹ de HTP) del tratamiento uno (ST). El DH se redujo a partir del tratamiento cinco (90 000 mg kg⁻¹) con un efecto inversamente proporcional al contenido de HTPI, el menor valor se registro en dosis de 180 000 mg kg⁻¹ de HTPI, una reducción del 36.84%.

En petróleo intemperizado, el DH presento una respuesta irregular. A los tres meses los tratamientos dos (14 147 mg kg⁻¹) y tres (28 400 mg kg⁻¹) presentaron el valor medio más alto (2.8 mm), el tratamiento cuatro (50 598 mg kg⁻¹) no presento diferencias estadísticas con el TT (2.5 mm) y, el valor medio menor (1.9 mm) se registro en el tratamiento seis (112 142 mg kg⁻¹). Por el contrario, a los seis meses

a partir del tratamiento tres hasta el seis se observo un efecto directamente proporcional al contenido de HTP. El valor medio mayor (2.2. mm) se registro en el tratamiento seis, el TT y el tratamiento dos fueron iguales estadísticamente.

6.1.4. Producción de la biomasa

La producción de biomasa seca radical, foliar y total presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), a los tres y seis meses (Cuadro 6) por las dosis de petróleo fresco (Apéndice, Cuadro 4) e intemperizado (Apéndice, Cuadro 19).

Cuadro 6. Producción de biomasa seca de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses			Seis meses		
		BSR	BSF	BST	BSR	BSF	BST
<u>Petróleo fresco</u>							
1	2,607(testigo)	6.5±1ab	20.5±1a	27.0±2ab	11.7±2b	42.3±6ab	54.0±8a
2	6,000	6.2±1ab	19.6±1a	25.8±1ab	20.4±2ab	41.3±1abc	61.7±5a
3	10,000	5.4±4ab	19.9±2a	25.0±4ab	27.3±2a	41.4±1c	68.7±2a
4	30,000	5.6±2ab	20.9±2a	26.5±1ab	19.1±8ab	41.7±1abc	60.9±3a
5	60,000	7.2±1ab	20.8±1a	28.0±2ab	18.3±6ab	41.5±1abc	59.8±7a
6	90,000	9.8±2a	18.5±5ab	28.4±4a	14.8±5b	48.6±1a	63.4±1a
7	120,000	7.0±1ab	17.6±2ab	24.7±1ab	15.2±5b	47.5±1a	62.7±6a
8	150,000	4.9±1b	12.9±3b	17.9±2c	28.7±4a	36.5±1c	65.2±6a
9	180,000	5.9±1ab	15.7±2ab	21.7±1bc	19.9±4ab	32.2±1bc	52.1±5a
<u>Petróleo intemperizado</u>							
1	2,607(testigo)	6.5±1b	20.5±1b	27.0±2b	11.7±2d	42.3±6ab	54.0±8bc
2	14,173	15.8±7a	28.9±2ab	44.7±9a	13.6±1cd	33.4±4b	47.0±5c
3	28,400	13.8±3ab	33.7±1a	47.4±5a	18.1±6cd	37.4±4b	55.5±3bc
4	50,598	6.7±1b	19.8±3c	26.5±4b	21.3±2bc	42.0±4ab	63.3±3b
5	75,492	7.9±3ab	20.7±5b	28.5±5b	27.8±6ab	52.3±5a	80.1±6a
6	112,142	9.0±1ab	21.2±4bc	30.1±5b	36.5±4a	52.4±6a	88.5±5a

[†] Valores con diferentes letras por columna son estadísticamente diferentes (Tukey, $p < 0.05$). T: tratamiento; HTP: Hidrocarburos totales de petróleo; BSR: biomasa seca radical; BSF: biomasa seca foliar; BST: biomasa seca total.

6.1.4.1. Biomasa seca radical

La biomasa seca radical (BSR) en suelos con petróleo fresco a los tres meses la BSR tuvo una relación inversamente proporcional al contenido de HTPF (Cuadro 6 y 7). Las dosis de 60 000, 90 000 y 120 000 mg kg⁻¹ estimularon un 10, 50 y 7% respectivamente en relación al TT. La BSR tuvo el valor medio mayor (9.8 g) en el

tratamiento seis (90 000 mg kg⁻¹) y el medio menor (4.9 g) en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹). Por el contrario a los seis meses, se observó una tendencia en la BSR directamente proporcional al contenido de HTPF. El valor medio mayor (28.7 g) corresponde al tratamiento ocho, y el valor medio menor (11.7 g) al TT.

Cuadro 7. Porcentajes de daño y estimulación de la producción de biomasa de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses			Seis meses		
		BSR	BSF	BST	BSR	BSF	BST
		%					
	<u>Petróleo fresco</u>						
1	2,607 (testigo)	0 [†]	0	0	0	0	0
2	6,000	38	-12	1	30	-49	16
3	10,000	42	-8	5	26	-47	18
4	30,000	4	4	4	56	-48	11
5	60,000	-19	4	-1	63	-48	13
6	90,000	-22	-10	-13	133	-54	9
7	120,000	-10	-3	-4	74	-59	14
8	150,000	-29	-36	-34	145	-62	21
9	180,000	-14	-22	-20	70	-60	-3
	<u>Petróleo intemperizado</u>						
1	2,607 (testigo)	0	0	0	0	0	0
2	14,173	129	45	66	16	-21	-13
3	28,400	99	68	76	55	-11	3
4	50,598	14	3	6	138	24	49
5	75,492	16	2	4	82	0	17
6	112,142	30	6	12	209	24	64

T: tratamiento; HTP: Hidrocarburos totales de petróleo; BSR: biomasa seca radical; BSF: biomasa seca foliar; BST: biomasa seca total. [†] Valores negativos: reducción de la biomasa; valores positivos: aumento de la biomasa.

La BSR del PJ, se estimuló por el contenido de petróleo intemperizado a los tres meses, a excepción del tratamiento cuatro (50 598 mg kg⁻¹) que no presentó diferencias estadísticas con el TT (Cuadro 6 y 7). El mayor valor (15.8 g) se registró en el tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹) y el menor (6.5 g) en el TT. A los seis meses, se observa una estimulación en los cinco tratamientos con PI, el efecto es directamente proporcional al contenido de HTP. El tratamiento seis (112 142 mg kg⁻¹) registró un 211% de estimulación en relación al TT (11.7 g). Ferrera-Cerrato *et al.* (2007) observó un incremento de la biomasa radical con respecto a la biomasa foliar en suelos contaminados con petróleo. El crecimiento radical se puede atribuir a las rizobacterias que interactúan con la planta y, promueven el

crecimiento al reducir la severidad del contaminante, resistencia sistémica y la competencia por nutrientes y el nicho (Ochoa *et al.*, 2010).

6.1.4.2. Biomasa seca foliar

La biomasa seca foliar (BSF) del PJ en petróleo fresco presento una reducción inversamente proporcional al contenido de hidrocarburo (Cuadro 6 y 7). A los tres meses la BSF registro el valor mayor (2.9 g) en el tratamiento cuatro (30 000 mg kg⁻¹) y el menor (12.9 g) en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹). Se observa una reducción de la BSF a partir del tratamiento seis (90 000 mg kg⁻¹). A los seis meses, la reducción de la BSF es inversamente proporcional al contenido de HTPI, a excepción del tratamiento seis y siete (120 000 mg kg⁻¹) que registraron la mayor BSF 48.6 y 47.5 g respectivamente. Estos resultados contradicen a los obtenidos por Sangabriel *et al.* (2006) en especies de leguminosas y gramíneas que disminuyo su BSF en suelos contaminados con combustóleo (50 000 mg kg⁻¹).

El petróleo intemperizado afecto de forma irregular la respuesta de la BSF del PJ (Cuadro 6 y 7). A los tres meses, las dosis de 14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ estimularon un 45 y 68% la BSF, en relación al TT (20.5 g), respectivamente, la menor BSF se registro en el tratamiento cuatro (50 598 mg kg⁻¹). Mientras que las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ no tuvieron diferencias estadísticas con el TT. Por el contrario a los seis meses, la mayor BSF (52.4 g) se presento en dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹, los tratamientos dos y tres presentaron una reducción de la BSF del 21 y 11% respectivamente, en relación al TT.

6.1.4.3. Biomasa seca total

El petróleo fresco afecto de forma irregular la producción de la biomasa seca total (BST) del PJ a los tres y seis meses. A los tres meses, Se observo una reducción inversamente proporcional al contenido de petróleo fresco. Las dosis de 60 000 y 90 000 se estimularon en un 3% en relación al TT. La menor BST (17.9 g) se presento en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹). Mientras que a los seis meses, los tratamientos con petróleo se estimularon hasta el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹) hasta en un 27% (10 000 mg kg⁻¹). La dosis de 180 000 mg kg⁻¹ redujo la BSF en un 3%, sin diferencias significativas con el TT. Este aumento de la BST, se puede atribuir a que algunas gramíneas pueden crecer o adaptarse en suelos contaminados con petróleo, al incorporar los hidrocarburos a su biomasa o permanecer en la rizósfera para ser utilizados como fuente de carbono por los microorganismos (Larenas y Viana, 2005).

En petróleo intemperizado estimulo la BST del PJ (Cuadro 6 y 7). A los tres meses el tratamiento tres (28 400 mg kg⁻¹) presento la mayor biomasa (47.3 g), la BST se estimulo de forma inversamente proporcional al contenido de HTP en el suelo. Sólo la dosis de 50 598 mg kg⁻¹ inhibió en un 4% la BSF. Por el contrario, a los seis meses la estimulación fue directamente proporcional al contenido de HTP y alcanzó su mayor valor (88.5 g) en la dosis de 112 142 mg kg⁻¹. Huang *et al.* (2004) explica que mantener o aumentar el contenido de agua en suelos contaminados con creosota con gramíneas, permitió continuar el transporte de material fotosintético a las raíces; esto conservó el estado de crecimiento y desarrollo del tejido fotosintético lo que aumenta la producción de la biomasa

6.2. Población bacteriana de la rizósfera del pasto japonesa

La densidad de los grupos de bacterias a los tres y seis meses (Cuadro 8), mostraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos por efecto de dosis de petróleo fresco (Apéndice, Cuadro 5) e intemperizado (Apéndice, Cuadro 20), un comportamiento irregular con medias estadísticas diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

6.2.1. Densidad de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre totales

La densidad de BFN en la rizósfera del PJ a los tres y seis meses fue estimulada por la presencia de petróleo fresco en el suelo, esto se observa en el Cuadro 8 (tres meses). La densidad de bacterias fue mayor en siete tratamientos con petróleo en relación al suelo testigo. A los seis meses se repite la misma situación pero sólo en seis tratamientos con petróleo.

A los tres meses, la dosis de 180 000 mg kg⁻¹ disminuyo la densidad de BFN en un 78% en relación con el TT (Cuadro 8). El mayor valor (262×10^1 UFC g⁻¹ s.s.) fue registrado en el tratamiento siete (120 000 mg kg⁻¹), se observo una tendencia inversamente proporcional al contenido de HTPF. A los seis meses, la mayor densidad promedio (258×10^1 UFC g⁻¹ s.s.) se observo en el tratamiento tres (10 000 mg kg⁻¹) y la menor (27×10^1 UFC g⁻¹ s.s.) en el tratamiento cuatro (30 000 mg kg⁻¹). Los tratamientos dos, cuatro, ocho y nueve presentaron valores de densidad por debajo del TT.

Este incremento en las densidades de BFN, es similar a los reportados por Hernández *et al.* (2003) y Vázquez-Luna *et al.* (2011) que observaron un incremento de BFN en la rizósfera del frijol en suelos con queroseno y con petróleo fresco sin vegetación, respectivamente. Muratova *et al.* (2003) explicaron que los exudados de las raíces están íntimamente ligados a la estimulación de la

comunidad rizoférica en suelos contaminados con petróleo, debido a que contienen componentes estructurales similares a varios hidrocarburos del petróleo que las bacterias utilizan como fuente de carbono o como co-metabolitos en la degradación de contaminantes (Wenzel, 2009).

Cuadro 8. Densidad de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre y grupos (*Azospirillum* y *Azotobacter*) de la rizósfera de pasto japonesa en suelos con hidrocarburos derivados del petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses			Seis meses		
		BFN	AZP	AZT	BFN	AZP	AZT
		10 ¹ UFC g ⁻¹ s.s.					
	Petróleo fresco						
1	2 607 (testigo)	150b ^f	21b	199g	463de	171b	1422a
2	6 000	185b	23b	541d	182e	44e	85d
3	10 000	155b	21b	765c	494d	258a	122cd
4	30 000	172b	25ab	288f	395e	27f	283b
5	60 000	182b	23b	909a	1394c	58de	257b
6	90 000	175b	22b	843b	1594b	142bc	278b
7	120 000	262a	21b	297f	2598a	109cd	227b
8	150 000	165b	32a	555d	41f	41e	235b
8	180 000	32c	31a	356e	137e	74de	247b
9	Petróleo intemperizado						
1	2 607 (testigo)	150c ^f	21a	199b	463b	171a	1422 b
2	14,173	10e	14c	36e	827a	31c	1633a
3	28,400	17e	16b	135d	333c	79bc	1188b
4	50,598	77d	10c	171.8c	216d	125ab	629c
5	75,492	167b	11c	162c	120e	99b	1153b
6	112,142	417a	12c	220a	120e	116b	1190b

^f Valores con diferentes letras por columna y por tipo de petróleo son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05). HTP: Hidrocarburos totales de petróleo; FRSC: petróleo fresco; INTP: petróleo intemperizado; UFC: unidades formadoras de colonias; BFN: bacterias fijadoras de N₂ de vida libre totales; AZT: *Azotobacter* spp.; AZP: *Azospirillum* spp.

El petróleo intemperizado a los tres meses, presentó una inhibición de las BFN en los tratamientos dos, tres y cuatro (Cuadro 8). Sin embargo a dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ se estimuló la densidad de BFN en un 11 y 178% en relación al TT, respectivamente. La tendencia de las BFN fue directamente proporcional al contenido de HTP. A los seis meses, la tendencia de las BFN a los contenidos de petróleo intemperizado fue inversamente proporcional. La mayor densidad (827 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.) se registró en el tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹) y la menor (120 mg kg⁻¹) en las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ un 74% menos que el TT. Resultados similares reportan Guo *et al.* (2012) en suelos con PI (149 - 1110 mg kg⁻¹).

6.2.2. Densidad de bacterias del grupo *Azotobacter*

El petróleo fresco en la densidad del grupo *Azotobacter* (AZT) manifestó a los tres meses un incremento hasta del 356% ($60\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$), la menor densidad ($199 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) corresponde al TT (Cuadro 8). El aumento que se observa en la densidad de AZT es inversamente proporcional al contenido de HTP. A los seis meses, se observa una disminución en los tratamientos con petróleo hasta del 6% en relación al TT, al cual le corresponde la mayor densidad ($1422 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) de AZT. La tendencia en la densidad de AZT en tratamientos con petróleo fresco es de manera inversa al contenido de hidrocarburos. Este irregular comportamiento puede considerarse como un proceso de adaptación ante los hidrocarburos del petróleo, Aleem *et al.*, (2003 explican que *Azotobacter Chroococcum* pueden incrementar su resistencia y desarrollar rasgos fisiológicos, que le permiten sobrevivir en ambientes de contaminación industrial.

El petróleo intemperizado disminuyó la densidad de AZT (Cuadro 8). A los tres meses en los tratamientos con petróleo la densidad de AZT se redujo en un 81% ($14\ 173\ \text{mg kg}^{-1}$). Sólo el tratamiento seis ($112\ 142\ \text{mg kg}^{-1}$) manifestó un incremento del 105% ($220 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) en relación al TT. A los seis meses, la disminución de la densidad de AZT se presentó a partir de la dosis 28 400 hasta $112\ 142\ \text{mg kg}^{-1}$. El tratamiento dos registró la mayor densidad ($1633 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$), la menor densidad ($1633 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) se registró en dosis de $50\ 598\ \text{mg kg}^{-1}$. La reducción en ambos tiempos no manifestó una tendencia irregular a los contenidos de HTP.

6.2.3. Densidad de bacterias del grupo *Azospirillum*

La densidad del grupo *Azospirillum* (AZP) en petróleo fresco, presentó una respuesta irregular (Cuadro 8). A los tres meses, los tratamientos con petróleo presentaron una estimulación. La mayor densidad ($32 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) se observó en dosis de $150\ 000$ y $180\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$. El menor valor ($21 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) se registró en el tratamiento testigo, tres ($10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$), y siete ($120\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$), los cuales no presentaron diferencias estadísticas significativas entre ellos. Por el contrario, a los seis meses, la mayor densidad ($258 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) de AZP se observó en el tratamiento tres ($10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$) y la menor densidad ($27 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) en el tratamiento cuatro ($30\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$). Aunque no se observó una tendencia en relación al contenido de HTP, la densidad de AZP se incrementó entre tratamiento de forma irregular.

Los tratamientos con petróleo intemperizado manifestaron un descenso de la densidad de AZP en ambos tiempos (Cuadro 8). El TT registró la mayor densidad a los tres ($21 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) y seis ($171 \times 10^1\ \text{UFC g}^{-1}\ \text{s.s.}$) meses. A los tres

meses se observó la menor densidad (10×10^1 UFC g^{-1} s.s.) en dosis de 50 598 $mg\ kg^{-1}$, se observó una tendencia inversamente proporcional al contenido de HTP. Mientras que los seis meses, el menor valor (31×10^1 UFC g^{-1} s.s.) se registró en dosis de 14 173 $mg\ kg^{-1}$. La densidad de AZP no presentó una relación directamente proporcional al contenido de petróleo intemperizado. Resultados similares encontró Ramírez (2012) en *Vigna unguiculata*, las densidades de AZP presentaron un comportamiento heterogéneo entre los tratamientos con petróleo intemperizado. Steenhoudt y Vanderleyden (2000), explican que la versatilidad de AZP en el metabolismo del N y C, le permite adaptarse y establecerse en ambientes competitivos de la rizósfera. De este modo promueven el crecimiento de la planta e incrementan su tolerancia a contaminantes (Huang *et al.*, 2004). En suelos contaminados con petróleo, pueden promover el desarrollo radical, mejorar el nivel de degradación e incrementar el crecimiento de las plantas (Zhuang *et al.*, 2007).

6.3. Actividad enzimática

La respuesta de la actividad enzimática de ureasa (USA) y arilsulfatasa (ASA), evaluadas en la rizósfera de PJ por efecto del petróleo fresco (Apéndice, Cuadro 7) e intemperizado (Apéndice, Cuadro 22), mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p \leq 0.05$), a los tres y seis meses (Cuadro 9).

6.3.1. Actividad enzimática ureasa

La actividad enzimática ureasa (USA) presentó un incremento en los tratamientos con petróleo fresco. A los tres meses, la mayor actividad ($1.29\ mmol\ NH_3\ g^{-1}\cdot h^{-1}$) se registró en el tratamiento tres ($10\ 000\ mg\ kg^{-1}$) y la menor ($0.35\ mmol\ NH_3\ g^{-1}\cdot h^{-1}$) en el TT. La tendencia de la actividad enzimática fue directamente proporcional al contenido de hidrocarburos. A los seis meses, el incremento se presentó a partir del tratamiento cuatro ($30\ 000\ mg\ kg^{-1}$) en adelante, con una tendencia directamente proporcional al contenido de HTP. En dosis de 6 000 y 10 000 $mg\ kg^{-1}$ se observó una reducción del 4 y 13% respectivamente, en relación al TT. Sin embargo, estos son iguales estadísticamente.

Estudios en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado, indican la disminución de la actividad enzimática de la USA y su relación al contenido de hidrocarburos (Peña *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2012). Sin embargo, Fontúrbel (2004) y Ramírez (2012) han reportado un incremento irregular de la USA en suelos con petróleo intemperizado a 10 000 y 28 465 $mg\ kg^{-1}$ de HTP.

Cuadro 9. Actividad enzimática de la rizósfera de pasto japonesa en suelo con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses		Seis meses	
		USA mmol NH ₃ g ⁻¹ ·h ⁻¹	ASA mmol PNF g ⁻¹ ·h ⁻¹	USA mmol NH ₃ g ⁻¹ ·h ⁻¹	ASA mmol PNF g ⁻¹ ·h ⁻¹
<u>Petróleo fresco</u>					
1	2,607 (testigo)	0.35±0.05e [¶]	0.744±0.10h	6.96±0.95c	0.150±0.1a
2	6,000	0.61±0.03d	2.609±0.01d	6.65±0.70c	0.066±0.2b
3	10,000	1.29±0.03a	3.128±0.02b	6.00±0.73c	0.051±0.1b
4	30,000	1.32±0.03a	2.752±0.02c	12.52±1.43bc	0.051±0.1b
5	60,000	0.79±0.02c	1.681±0.05f	21.31±4.20a	0.050±0.1b
6	90,000	0.62±0.02d	1.661±0.07f	9.129±3.10ab	0.050±0.1b
7	120,000	0.74±0.02c	1.434±0.02g	10.62±2.43bc	0.050±0.1b
8	150,000	1.14±0.03b	2.027±0.02e	17.31±4.83ab	0.048±0.1b
9	180,000	1.25±0.03a	4.085±0.04a	22.13±4.25a	0.050±0.1b
<u>Petróleo intemperizado</u>					
1	2,607 (testigo)	0.35±0.05e	0.744±0.10a	6.96±0.95a	0.150±0.01a
2	14,173	4.90±0.02b	0.388±0.00b	5.85±0.40a	0.026±0.01c
3	28,400	4.00±0.00d	0.162±0.00de	1.42±0.51c	0.042±0.02bc
4	50,598	4.12±0.00c	0.137±0.02e	4.63±0.68ab	0.053±0.00b
5	75,492	10.13±0.02a	0.233±0.03cd	3.88±0.62abc	0.042±0.01bc
6	112,142	10.09±0.00a	0.186±0.02cde	2.96±0.51bc	0.043±0.01bc

[¶] Valores con diferentes letras por columna y por tipo de petróleo son estadísticamente diferentes (Tukey, p≤0.05).

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo; FRSC: petróleo fresco; INTP: petróleo intemperizado; USA: ureasa; ASA: arilsulfatasa;

El petróleo intemperizado al igual que el petróleo fresco, a los tres meses incremento la actividad enzimática en una tendencia directamente proporcional al contenido de hidrocarburos (Cuadro 9). Con la mayor actividad (10.13 mmol NH₃ g⁻¹·h⁻¹) en dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ y la menor actividad (0.35 mmol NH₃ g⁻¹·h⁻¹) corresponde al TT. A los seis meses, por el contrario los contenidos de hidrocarburos redujeron la actividad en relación inversamente proporcional al contenido de HTPI. La mayor actividad (6.96 mmol NH₃ g⁻¹·h⁻¹) se registro en el TT y la menor (1.42 mmol NH₃ g⁻¹·h⁻¹) en el tratamiento 3 (28 400 mg kg⁻¹).

6.3.2. Actividad enzimática arilsulfatasa

La actividad enzimática arilsulfatasa (ASA) a los tres meses, presento un aumento directamente proporcional al contenido de petróleo fresco (Cuadro 9). La mayor actividad (4.085 mmol PNF g⁻¹·h⁻¹) corresponde al tratamiento nueve (180 000 mg kg⁻¹) y la menor (0.744 mmol PNF g⁻¹·h⁻¹) al TT. A los seis meses, el contenido de

petróleo fresco de los tratamientos disminuyó la actividad ASA, sin evidente tendencias al contenido de hidrocarburos y sin diferencias estadísticas entre los tratamientos con petróleo.

Cébron *et al.* (2011) observaron la estimulación de ASA en suelos con HAP y su relación con la materia orgánica del suelo, al igual que el carbono orgánico y la densidad microbiana (Contreras *et al.*, 2005). Sin embargo, Resultados similares presenta Gianfreda *et al.* (2005) que reportan la reducción de la enzima ASA en suelos con presencia de fenantreno y HPAs.

En petróleo intemperizado disminuyó la actividad de ASA hasta en un 80% a los tres y seis meses (Cuadro 9), A los tres meses la menor actividad ($0.137 \text{ mmol PNF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) corresponde al tratamiento cuatro ($50\,598 \text{ mg kg}^{-1}$) y a los seis meses la menor actividad ($0.026 \text{ mmol PNF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) en el tratamiento dos ($14\,173 \text{ mg kg}^{-1}$). La mayor actividad a los tres ($0.744 \text{ mmol PNF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) y seis ($\text{mmol PNF g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) meses se registro en el TT. En ambos tiempo la tendencia de la actividad fue inversamente proporcional al contenido de HTPI.

6.4. Índices de impacto ambiental toxicológico

6.4.1. Índices fisiológicos de toxicidad

6.4.1.1. Índices fisiológicos de toxicidad relativos

Los índices relativos de impacto ambiental fisiológico (IRIAF) basados en el crecimiento vegetativo [longitud de estolones (LE), número de hijuelos (NH), diámetro de hijuelos (DH)], y biomasa seca (raíz, follaje y total) a los tres (Cuadro 10) y seis meses (Cuadro 11), después del trasplante del pasto japonesa expuestos a petróleo fresco e intemperizado manifiestan estímulo positivo y efectos tóxicos negativos en las diferentes variables evaluadas.

El petróleo fresco estimuló el crecimiento y desarrollo del pasto japonesa a los tres (Cuadro 10; Apéndice, Cuadro 9) y seis meses (Cuadro 11; Apéndice, Cuadro 10). La LE presentó una inhibición a los tres y seis meses en las ocho concentraciones de petróleo, sin embargo este efecto negativo no sobrepasó el 18% ($150\,000 \text{ mg kg}^{-1}$) tres meses y 29% ($6\,000 \text{ mg kg}^{-1}$) a los seis meses. El NH se estimuló en los ocho tratamientos de petróleo fresco, la mayor estimulación a los tres (-0.86) y seis (-0.69) se halló en el tratamientos cuatro ($30\,000 \text{ mg kg}^{-1}$). El DH presentó a los tres meses una inhibición en las ocho concentraciones de petróleo, la mayor inhibición (0.36) se registro en el tratamiento ocho ($150\,000 \text{ mg kg}^{-1}$). A los seis meses, sin embargo la inhibición solo se observó en cuatro

tratamientos, las dosis de 30 000, 60 000, 90 000 y 120 000 mg kg⁻¹ estimularon el DH en un 2, 9, 10 y 10% respectivamente. En ambos tiempo la inhibición del DH fue menor del 50%.

Cuadro 10. Índices relativos de impacto ambiental fisiológicos del pasto japonesa expuesto a petróleo fresco e intemperizado, a tres meses de exposición.

T	Concentración HTP mg kg ⁻¹ b. s.	Crecimiento			Biomasa seca		
		Longitud de Estolones	Hijuelos	Diámetro hijuelo	Raíz	Foliar	Total
<u>Petróleo Fresco</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6,000	0.11	-0.21	0.14	0.04	0.04	0.04
3	10,000	0.07	-0.14	0.20	0.12	0.17	0.13
4	30,000	0.05	-0.86	0.16	-0.02	0.13	0.02
5	60,000	0.00	-0.71	0.19	-0.02	-0.11	-0.04
6	90,000	0.00	-0.64	0.08	0.09	-0.51	-0.05
7	120,000	0.10	-0.43	0.12	0.14	-0.09	0.08
8	150,000	0.18	-0.50	0.36	0.37	0.24	0.34
9	180,000	0.15	-0.29	0.14	0.23	0.08	0.20
<u>Petróleo Intemperizado</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	14,173	0.53	0.16	-0.16	-0.41	-1.43	-0.66
3	28,400	0.52	-0.11	-0.16	-0.64	-1.12	-0.76
4	50,598	0.58	0.38	0.02	0.03	-0.02	0.02
5	75,492	0.58	0.38	0.04	-0.01	-0.21	-0.06
6	112,142	0.72	0.35	0.23	-0.03	-0.38	-0.12

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo. Valores IRIAF<0: estimulan a la variable; IRIAF>0: afectan a la variable; IRIAF = 0 no afectan a la variable.

Al parecer el estímulo al aumento en el número de hijuelos, biomasa de raíz y biomasa total puede ser por el efecto de hormesis que ha sido reportado en especies vegetales, los hidrocarburos en pequeñas dosis (hormetinas) pueden ejercer un estímulo en procesos fisiológicos (Repetto, 1995; Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2000). Sin embargo, es claro que también puede haber una contribución potencial por parte de las bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPB), que mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés (Basham *et al.*, 2012).

El petróleo fresco estimuló el crecimiento y desarrollo del pasto japonesa a los tres (Cuadro 10) y seis meses (Cuadro 11). La LE presentó una inhibición a los tres y seis meses en las ocho concentraciones de petróleo, sin embargo este efecto negativo no sobrepasó el 18% (150 000 mg kg⁻¹) tres meses y 29% (6 000

mg kg⁻¹) a los seis meses. El NH se estimulo en los ocho tratamientos de petróleo fresco, la mayor estimulación a los tres (-0.86) y seis (-0.69) se halló en el tratamientos cuatro (30 000 mg kg⁻¹). El DH presento a los tres meses una inhibición en las ocho concentraciones de petróleo, la mayor inhibición (0.36) se registro en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹). A los seis meses, sin embargo la inhibición solo se observo en cuatro tratamientos, las dosis de 30 000, 60 000, 90 000 y 120 000 mg kg⁻¹ estimularon el DH en un 2, 9, 10 y 10% respectivamente. En ambos tiempo la inhibición del DH fue menor del 50%.

Cuadro 11. Índices relativos de impacto ambiental fisiológicos del pasto japonesa expuesto a petróleo fresco e intemperizado, a seis meses de exposición

T	Concentración HTP mgkg ⁻¹ s.s.	Crecimiento			Biomasa seca		
		Longitud de estolones	Hijuelos	Diámetro hijuelo	Raíz	Foliar	Total
<u>Petróleo Fresco</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6,000	0.29	-0.21	0.26	-0.75	0.02	-0.14
3	10,000	0.13	-0.21	0.16	-1.33	0.26	-0.09
4	30,000	0.28	-0.69	-0.02	-0.64	0.01	-0.13
5	60,000	0.17	-0.19	-0.09	-0.57	0.02	-0.11
6	90,000	0.15	-0.09	-0.10	-0.27	-0.15	-0.18
7	120,000	0.06	-0.14	-0.10	-0.30	-0.12	-0.16
8	150,000	0.18	-0.32	0.20	-1.45	0.14	-0.21
9	180,000	0.21	-0.28	0.32	-0.70	0.24	0.03
<u>Petróleo Intemperizado</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	14,173	0.21	0.41	0.01	-0.16	0.21	0.13
3	28,400	0.06	0.08	-0.07	-0.54	0.12	-0.03
4	50,598	0.26	-0.15	-0.16	-0.82	0.01	-0.17
5	75,492	0.37	-0.60	-0.13	-1.38	-0.24	-0.48
6	112,142	0.41	-0.81	-0.20	-2.09	-0.24	-0.64

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo. Valores IRIAF<0: estimulan a la variable; IRIAF>0: afectan a la variable; IRIAF = 0 no afectan a la variable.

Al parecer el estímulo al aumento en el número de hijuelos, biomasa de raíz y biomasa total puede ser por el efecto de hormosis que ha sido reportado en especies vegetales, los hidrocarburos en pequeñas dosis (hormetinas) pueden ejercer un estímulo en procesos fisiológicos (Repetto, 1995; Maliszewska-Kordybach y Smreczak, 2000). Sin embargo, es claro que también puede haber una contribución potencial por parte de las bacterias promotoras del crecimiento

vegetal (PGPB), que mejoran el crecimiento y desarrollo de la planta bajo condiciones de estrés (Basham *et al.*, 2012).

La producción de la raíz suelos con petróleo fresco a los tres meses (Cuadro 10), presenta una inhibición por debajo del 30% en seis de los ocho tratamientos con petróleo (Cuadro 11), los tratamientos cuatro (30 000 mg kg⁻¹) y cinco (60 000 mg kg⁻¹) estimularon la producción de la raíz en un 2% (-0.02). A los seis meses la estimulación se presentó en los ocho tratamientos hasta en un 145% (-1.45) en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹). La BSF presentó una inhibición a los tres y ocho, por debajo del 25%. Sin embargo, los tratamientos seis (90 000 mg kg⁻¹) y siete (120 000 mg kg⁻¹) se estimularon a los tres y seis meses. La BST, a los tres meses se estimuló en los tratamientos cinco y seis en un 4 y 5% respectivamente, la inhibición que se observó en los seis tratamientos con petróleo restantes fue por debajo del 35%. A los seis meses, la estimulación se presentó en siete de los ocho tratamientos, la dosis de 180 000 mg kg⁻¹ inhibió la BST en un 3% (0.03).

Las dosis de PI manifestaron un efecto de estimulación en los índices fisiológicos de toxicidad relativos del crecimiento y desarrollo del pasto japonesa (Cuadro 10 y 11). El PI inhibió la LE en los cinco tratamientos con petróleo a los tres (Apéndice, Cuadro 24) y seis meses (Apéndice; Cuadro 25), el mayor efecto a los (72%) tres y (41%) seis meses, se observó el tratamiento seis (112 142 mg kg⁻¹). El NH a los tres meses se redujo en relación al contenido de petróleo en los tratamientos, a excepción del tratamiento tres (28 400 mg kg⁻¹) que se estimuló un 11% (-0.11). A los seis meses se estimuló el NH a partir del tratamiento cuatro (50 598 mg kg⁻¹), y las dosis de 14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ inhibieron el NH en un 41 y 8% respectivamente. El DH a los tres meses se estimuló en dosis de 14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ en un 16%, sin embargo se observó una inhibición en los tratamientos cuatro, cinco y seis. A los seis meses, el DH se estimuló a partir del tratamiento tres y la dosis de 14 173 mg kg⁻¹ presentó una inhibición del 1%.

La producción de la raíz se estimuló por el PI a los tres y seis meses, el mayor efecto -0.64 y -0.82 se registró en el tratamiento tres (28 400 mg kg⁻¹) y cuatro (50 598 mg kg⁻¹) a los tres y seis meses respectivamente. La BSF presentó una estimulación a los tres meses en los cinco tratamientos con petróleo hasta en un 38% (112 142 mg kg⁻¹). Sin embargo a los seis meses, sólo las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ estimularon la BSF en un 24%(-0.24), mientras que los tratamientos con PI restantes inhibieron la BSF. La BST se estimuló por el contenido de PI a los tres meses, el mayor efecto (-0.76) se presentó en la dosis de 28 400 mg kg⁻¹. A los seis meses el mismo efecto se presentó, sin embargo la

dosis de 14 173 mg kg⁻¹ inhibió en un 13% (0.13) la BST. La mayor estimulación (-0.64) se presentó en el tratamiento seis.

6.4.1.2. Índices fisiológicos de toxicidad absolutos

Los índices fisiológicos de toxicidad absolutos (IFTA) del pasto japonesa expuesto al petróleo fresco, muestran a los tres y seis meses diferentes respuestas (Figura 21; Apéndice, Cuadro 14). A los tres meses de exposición el crecimiento de la planta es estimulado positivamente en las primeras seis dosis (6 000, 10 000, 30 000, 60 000, 90 000 y 120 000 mg kg⁻¹ de HTPF), el estímulo positivo no rebasa el 20%, sin embargo en dosis superiores a 120 000 el crecimiento y desarrollo absoluto de la planta es afectada hasta un 0.17 (17%). A los seis meses los IFTA manifiestan que la planta es estimulada positivamente en su crecimiento por las ocho dosis de petróleo fresco, este aumento se localiza en el rango de 0.07 a 0.28 (7 al 28%).

La respuesta del pasto japonesa en término de su crecimiento absoluto a las diferentes dosis de petróleo fresco, indican un proceso de adaptación paulatino conforme aumentan los contenidos de HTPF en suelo y el tiempo de exposición (tres y seis meses) la planta incrementa su resistencia y tolerancia, observar que a los tres meses el crecimiento y desarrollo se estimulo hasta 120 000 mg kg⁻¹ de HTP, pero a los seis meses el crecimiento es favorecido hasta un 28% por la presencia de hasta 150 000 mg kg⁻¹ de HTP derivados del petróleo fresco (Figura 21). Resultados similares obtuvo Mezzari *et al.* (2011), en el crecimiento y desarrollo de *Brachiaria brizantha* en suelos contaminados con diesel. La adaptaciones y desarrollo de ciertos pastos se deba a su sistema radical, la rizósfera influye bioquímica y biológicamente en la comunidad microbiana del suelo e interactúa con la planta, de este modo se logra el crecimiento de la planta en suelos contaminados (Waller *et al.*, 2001).

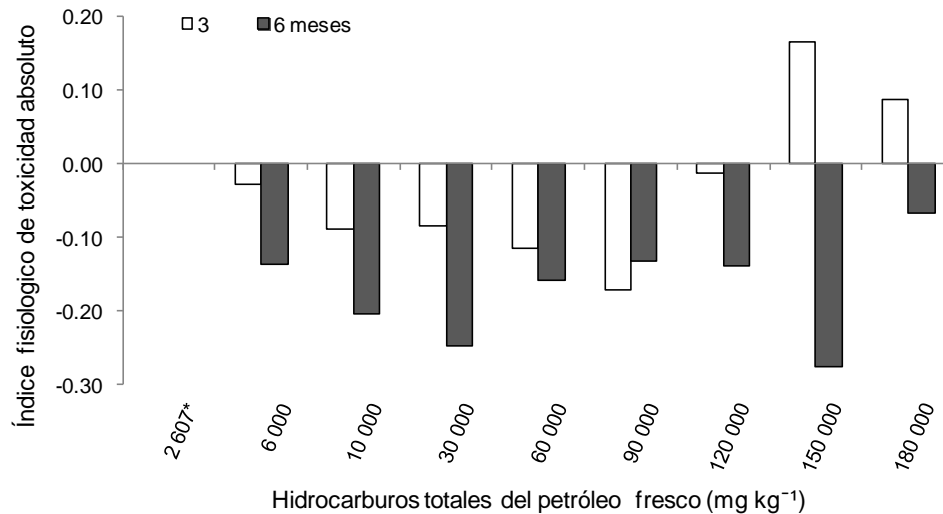


Figura 21. Índice fisiológico de toxicidad absoluta del pasto japonés a los tres y seis meses en suelos con petróleo fresco. *hidrocarburos de origen biogénico.

Los IFTA del pasto japonesa expuesto al petróleo intemperizado, muestran a los tres y seis meses diferentes respuestas (Figura 22; Apéndice, Cuadro 29). A los tres meses de exposición el crecimiento y desarrollo de la planta se estimulo en las dos primeras dosis (14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ de HTP), sin embargo en dosis superiores de 28 4000 mg kg⁻¹ de HTP la planta presenta una inhibición, que no supera el 20%. A los seis meses los IFTA se estimulo en dosis de 28 400, 50 598, 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTP, en un rango de -0.07 a -0.66, el crecimiento del pasto japonesa es afectado negativamente por las dosis de 14 173.

La respuesta del pasto japonesa a la exposición del petróleo intemperizado indica que es una planta que conforme aumenta su estado de crecimiento es más resistente y tolerante a los hidrocarburos recalcitrantes que caracterizan al petróleo intemperizado (Chi-Yuan y Krishnamurthy, 1995; Maletic *et al.*, 2011). Es posible que al alcanzar la planta la madurez, el sistema radical exude sustancias que contribuyan a la mineralización de los hidrocarburos fracción pesada (Bank *et al.*, 2003; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004), en ellos se localizan compuesto nitrogenados, fosfatos y azufre que quedan disponibles para el crecimiento y desarrollo de la planta (Mukerji *et al.*, 2006).

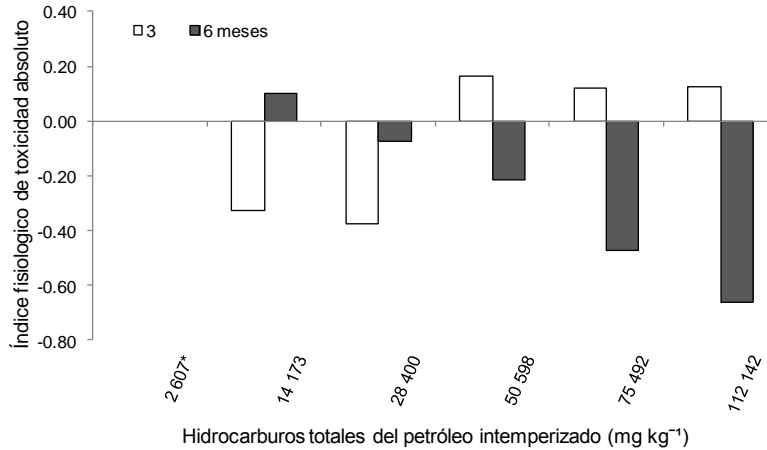


Figura 22. Índice fisiológico de toxicidad absoluta del pasto japonés a los tres y seis meses en suelos con petróleo intemperizado. *hidrocarburos de origen biogénico.

6.4.2. Índices de impacto bacteriano

6.4.2.1. Índices bacterianos de toxicidad relativos

Los índices bacterianos de toxicidad relativos (IBTR) manifiestan una respuesta irregular de los contenidos de petróleo fresco (Apéndice, Cuadro 11) e intemperizado (Apéndice, Cuadro 26) a los tres y seis meses (Cuadro 12).

En los bioensayos con tratamientos con petróleo fresco los IBTR de las BFN a los tres meses, indican una estimulación irregular en las siete primeras dosis de PF (6 000, 10 000, 30 000, 60 000, 90 000, 120 000 y 150 000 mg kg⁻¹ de HTP) (Cuadro 12), dosis de 180 000 mg kg⁻¹ de HTP inhibió en un 0.88 (88%) la densidad de BFN. A los seis meses, la estimulación se observó en las cinco primeras dosis y se inhibió la densidad de BFN en un 74, 76 y 56% en dosis de 90 000, 120 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP. Los IBTR de la densidad de AZP muestran una estimulación en los ocho tratamientos con PF, en un rango de -0.05 (5%) a -1.20 (120%). Por el contrario a los seis meses, se observa una inhibición en todos los tratamientos, en un rango del 0.17 al 0.84. Similar efecto presentó los IBTR de AZT en todos los tratamientos con PF, a los tres meses la estimulación se encuentra en un rango del -0.88 a -3.35 y la inhibición en un rango del 0.03 a 0.94.

El petróleo intemperizado inhibió la densidad de bacterias a los tres y seis meses (Cuadro 12). BFN registro una inhibición en dosis 14 173, 28 400, 50 598 y 112 142, en un rango del 0.54 al 0.97. Sólo en dosis de 75 492 mg kg⁻¹ de HTP se

registro una estimulación del 6%. A los seis meses la inhibición se observó en las cinco dosis de PI, el mayor efecto se registró en el tratamiento dos. La densidad de AZP a los tres meses, presentó una inhibición del 0.70 (70%) en los tratamientos dos (14 173 mg kg⁻¹ de HTP), cuatro (50 598 mg kg⁻¹ de HTP), cinco (75 492 mg kg⁻¹ de HTP) y seis (112 142 mg kg⁻¹ de HTP). Sin embargo la dosis de 28 400 mg kg⁻¹ de HTP estimuló en un -0.82 (82%) la densidad de AZP. A los seis meses solo las dosis de 14 173 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTP estimularon la densidad de AZP en un -0.15 (15%) y -6.70 (670%). La densidad de AZT indica una inhibición en los tratamientos dos, cuatro, cinco y seis del 0.60 (60%), 0.10 (10%) y 0.18 (18%), sin embargo dosis de 28 400 y 14 173 mg kg⁻¹ de HTP a los tres y seis meses estimularon la densidad de AZP en un -0.6 (6%) y -0.79 (79%) respectivamente, el tratamiento seis (112 142 mg kg⁻¹ de HTP) estimuló a los tres (-0.03) y seis meses (-0.74) la densidad de AZT.

Cuadro 12. Índices bacterianos de toxicidad relativos del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses de exposición.

T	Concentración HTP mgkg ⁻¹ s.s.	Tres meses			Seis meses		
		BFN	AZP	AZT	BFN	AZP	AZT
<u>Petróleo Fresco</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6,000	-0.15	-0.05	-3.06	-4.61	0.36	0.84
3	10,000	-0.23	-0.10	-3.35	-2.44	0.17	0.03
4	30,000	-0.41	-0.05	-0.59	-2.01	0.66	0.82
5	60,000	-0.04	-1.20	-3.18	-0.15	0.84	0.80
6	90,000	-0.05	-0.05	-3.91	-0.07	0.51	0.91
7	120,000	-0.46	-0.30	-0.88	0.61	0.74	0.94
8	150,000	-0.03	-0.60	-1.97	0.91	0.76	0.96
9	180,000	0.88	-0.40	-1.47	0.70	0.56	0.83
<u>Petróleo Intemperizado</u>							
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	14,173	0.97	0.70	0.60	0.82	-0.15	-0.79
3	28,400	0.84	-0.82	-0.06	0.54	0.16	0.28
4	50,598	0.54	0.70	0.10	0.27	0.56	0.53
5	75,492	-0.06	0.70	0.18	0.42	0.19	0.74
6	112,142	0.95	0.70	-0.03	0.32	-6.70	-0.74

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo. Valores IRIAF<0: estimulan a la variable; IRIAF>0: afectan a la variable; IRIAF = 0 no afectan a la variable.

6.4.2.2. Índices bacterianos de toxicidad absolutos

Los índices bacterianos de toxicidad absolutos (IBTA), responden de forma diferente en petróleo fresco (Figura 23; Apéndice, Cuadro 14) e intemperizado (Figura 24; Apéndice, Cuadro 29) a los tres y seis meses de exposición.

Los IBTA en petróleo fresco a los tres meses (Figura 23), muestran un efecto positivo en los ocho tratamientos con PF, en un rango de -0.04 (4%) a -1.47 (147%). A los seis meses las tres primeras dosis 6 000, 10 000 y 30 000 mg kg⁻¹ de HTP indican un efecto positivo en la densidad de bacterias en forma inversa al contenido de PF y, en dosis de 60 000, 90 000, 120 000, 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP se presenta una inhibición en un rango de 0.06 (6%) a 0.88 (88%). Resultados similares y con dosis dentro de los límites máximos permisibles por la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003, Timmerman *et al.*, (2003) reportaron un incremento en los índices microbianos calculados del carbono de la biomasa microbiana y actividad metabólica microbiana, en suelos contaminados con 5 000 mg kg⁻¹ de HTP.

Los IBTA indican una inhibición de las bacterias de la rizósfera del PJ a los tres y seis meses (Figura 24). A los tres meses, el efecto negativo se observa en los cinco tratamientos con PI en un rango del 0.01 (1%) al 0.75 (75%). Sin embargo a los seis meses, sólo el tratamiento seis (112 142 mg kg⁻¹ de HTP) indica un efecto positivo (-0.74) en la densidad de bacterias del PJ en PI.

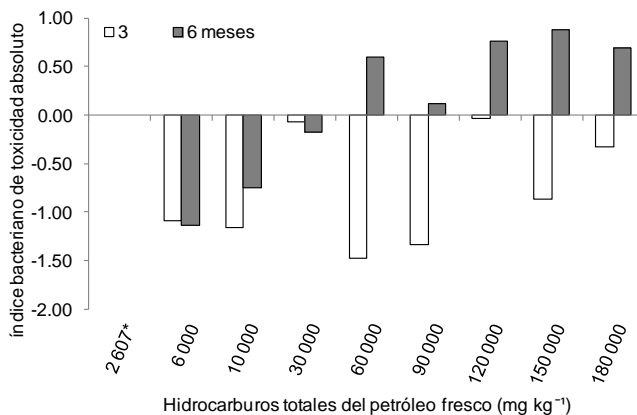


Figura 23. Índice bacteriano de toxicidad absoluto a los tres y seis meses de exposición con petróleo fresco. *hidrocarburos de origen biogénico.

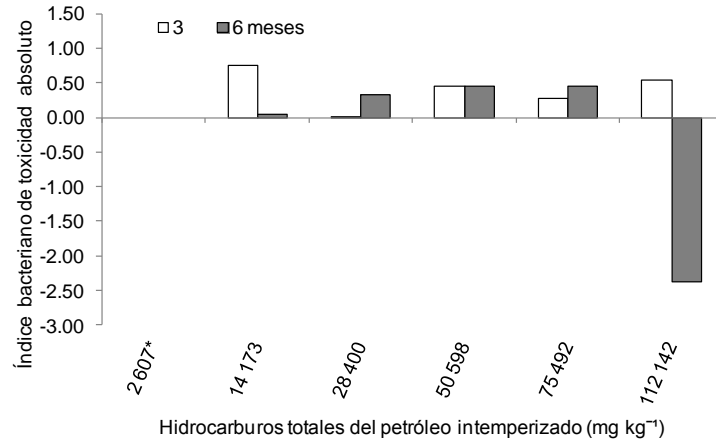


Figura 24. Índice bacteriano de toxicidad absoluto a los tres y seis meses de exposición con petróleo intemperizado. *hidrocarburos de origen biogénico.

6.4.3. Índices de impacto enzimático

6.4.3.1. Índices enzimáticos de toxicidad relativa

La actividad enzimática manifestó una estimulación e inhibición por la exposición a las dosis de hidrocarburos de petróleo fresco (Apéndice, Cuadro 13) e intemperizado (Apéndice, Cuadro 28), a los tres y seis meses (Cuadro 13).

La actividad enzimática de USA en los tratamientos con petróleo fresco a los tres y seis meses presento un efecto positivo (Cuadro 13), en un rango de -0.68 (68%) a -2.78 (278%) a los tres meses y -0.04 (4%) a -2.18 (218%), mientras que la actividad de ASA presento una respuesta positiva, en un rango de -0.77 (77%) a -3.62 (362%). A los seis meses, se observa un efecto negativo en su actividad del 0.57 (57%) al 0.68 (68%).

Los contenidos de PI, afectaron de forma diferente la actividad enzimática del suelo (Cuadro 13). La USA mostro un efecto positivo en su actividad a los tres y seis meses en los cinco tratamientos con PI, el mayor efecto (-27.95 y -27.76) se observo en dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTP. Sin embargo la ASA, presento un efecto negativo en los tres y seis meses, con valores superiores al 50%.

Cuadro 13. Índice enzimático de toxicidad relativa en la rizósfera del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco e intemperizado, a los tres y seis meses de exposición.

T	Concentración HTP mgkg ⁻¹ s.s.	Tres meses		Seis meses	
		Ureasa	Arilsulfatasa	Ureasa	Arilsulfatasa
<u>Petróleo Fresco</u>					
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00
2	6,000	-0.68	-1.76	-0.31	0.67
3	10,000	-2.69	-2.30	-0.53	0.67
4	30,000	-2.78	-2.37	-2.06	0.66
5	60,000	-1.19	-0.98	-0.80	0.66
6	90,000	-0.80	-1.01	-0.14	0.66
7	120,000	-0.99	-0.77	-0.04	0.56
8	150,000	-2.21	-1.85	-1.49	0.68
9	180,000	-2.50	-3.62	-2.18	0.67
<u>Petróleo Intemperizado</u>					
1	2,607 (testigo)	0.00	0.00	0.00	0.00
2	14,173	-12.94	0.50	-1.01	0.83
3	28,400	-10.35	0.82	-0.51	0.72
4	50,598	-11.91	0.84	-0.33	0.72
5	75,492	-27.95	0.73	-0.59	0.65
6	112,142	-27.76	0.79	-0.02	0.71

HTP: Hidrocarburos totales de petróleo. Valores IRIAF<0: estimulan a la variable; IRIAF>0: afectan a la variable; IRIAF = 0 no afectan a la variable.

6.4.3.2. Índices enzimáticos de toxicidad absoluto

La actividad enzimática a los tres meses, en base a los índices enzimáticos de toxicidad absoluta (IETA) indica un efecto positivo en la actividad enzimática de los ocho tratamientos con petróleo fresco (Figura 25; Apéndice, Cuadro 14). Sin embargo a los seis meses, la actividad enzimática manifiesta un efecto negativo en los tratamientos del dos (6 000 mg kg⁻¹ de HTP) al siete (120 000 mg kg⁻¹ de HTP). Sin embargo, dosis de 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP estimulan la actividad enzimática en -0.40 (40%) y -0.70 (70%).

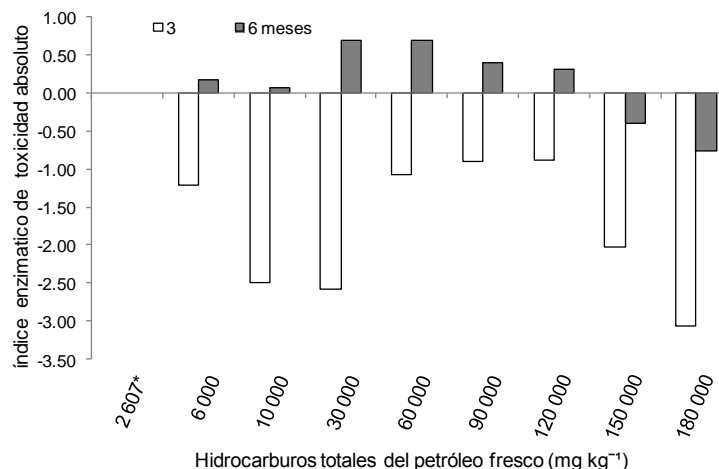


Figura 25. Índice de impacto enzimático absoluto de suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres y seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico.

Los IETA de la actividad enzimática en suelos con PI, muestran a los tres meses un efecto positivo en la actividad enzimática (Figura 26; Apéndice, Cuadro 29), con la mayor estimulación (-14.27 y -13.89) en dosis de 60 000 y 90 000 mg kg⁻¹ de HTP. Sin embargo a los seis meses se observa una respuesta negativa en la actividad enzimática en dosis de 28 400, 50 598, 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTP, en un rango de 0.03 a 0.62 (62%). Solo el tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹ de HTP) registro una respuesta positiva (1%) en su actividad enzimática.

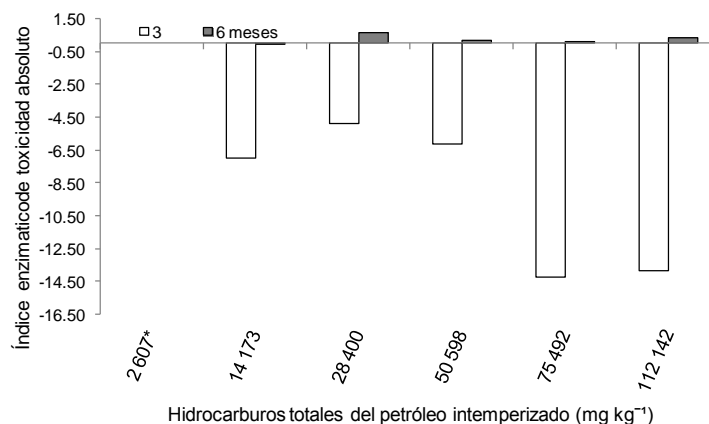


Figura 26. Índice de impacto enzimático absoluto de suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres y seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico.

6.5. Degradación de petróleo en suelo y rizósfera del pasto japonesa

La descontaminación (DSC) de hidrocarburos estimulada por el pasto japonesa en los tratamientos con petróleo fresco e intemperizado, presento diferencias estadísticas significativas a los tres y seis meses (Tukey ≤ 0.05) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Descontaminación de petróleo fresco e intemperizado en suelo y rizósfera del pasto japonesa, a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses		Seis meses	
		Descontaminación mg kg ⁻¹	%	Descontaminación mg kg ⁻¹	%
<u>Petróleo fresco</u>					
1	2,607 (Biogénico)	1, 079	42bc	1, 662	64ab
2	6,000	2, 810	47bc	5, 220	87a
3	10,000	2, 383	24c	8, 583	86a
4	30,000	8, 465	28c	24, 944	83a
5	60,000	19, 610	33c	47, 900	80a
6	90,000	53, 839	60a	74, 098	82a
7	120,000	63, 874	53b	75, 440	63ab
8	150,000	100, 299	67a	102, 296	68ab
9	180,000	77, 856	43bc	112, 240	62ab
<u>Petróleo intemperizado</u>					
1	2,607 (Biogénico)	1, 079	42b	1, 662	64ab
2	14,173	3, 240	77a	12, 214	86a
3	28,400	23, 565	17d	13, 354	47b
4	50,598	37, 949	25c	20, 588	56b
5	75,492	61, 545	33b	17, 082	37b
6	112,142	75, 492	32b	42, 292	42b

HTP: hidrocarburos totales del petróleo

La descontaminación en suelos con petróleo fresco presento heterogeneidad en sus valores, a los tres meses el mayor valor de DSC (100 299 mg kg⁻¹ de HTPS) se halló en el tratamiento ocho (150 000 mg kg⁻¹ de HTPF), las ocho dosis de PF registraron una DSC superior al 20%. A los seis meses, los cinco primeros tratamientos con PF presentan una DSC alrededor del 80%, el TT, las dosis de 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTPF no registraron diferencias estadísticas (Tukey ≤ 0.05). La menor DSC se observó en suelos con 180 000 mg kg⁻¹ de HTPF, sin embargo la degradación es superior al 50% (Cuadro 13).

En PI la mayor degradación a los tres (77%) y seis (86%) meses se presentó en el tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹ de HTPI) del BIO2 (Cuadro 13), la menor DSC (23 565 mg kg⁻¹ de HTP) se halló en dosis de 28 400 mg kg⁻¹ de HTPI. A los seis

meses, las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTPI presentaron el mismo rango de DSC a los tres y seis meses, en un rango del 30 a 42%.

Aunque la tendencia de los resultados es irregular en tiempos y bioensayos, es claro que el potencial del pasto japonesa en la fitorremediación. Rivera-Cruz Trujillo-Narcía (2004) y Maldona-Chavez *et al.* (2010) obtuvieron resultados similares en gramíneas con una descontaminación del 30 hasta el 60%, esto en función de las asociaciones bacterias-hongos y su interacción con la rizósfera. Ramírez *et al.* (2009) explica que condiciones de anegamiento mejora la biodisponibilidad de los hidrocarburos para los microorganismo la degradación, al dispersar los agregados del suelo y mejorar la difusión del contaminante en la fase acuosa.

6.5.1. Bacterias rizoféricas del pasto japonesa en la degradación de los hidrocarburos del petróleo

Se observaron diferencias estadísticas significativas en la densidad BFN, AZP y AZT a los tres y seis meses (Figura 27), A los tres meses la densidad de BFN y AZT mantienen un comportamiento irregular con la DSC de los tratamientos con PF (Figura 27). La densidad de BFN y AZT fue apreciable en los ocho tratamientos, Sin embargo, AZP manifestó una relación inversamente proporcional al porcentaje de DSC, aunque presento valores bajos en los ocho tratamientos con PF, en un rango de 21 a 32x10¹ UFC g⁻¹ s.s. Las dosis de 150 000 mg kg⁻¹ HTPF logro el porcentaje de DSC mas alto (67%), sin embargo las densidad bacteriana es baja (32 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.). La densidad de AZT aunque irregular, tolera altas dosis de PF y superior al TT (199 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.).

Resultados similares presento la bacteria del género *Alcaligenes*. Una mejor DSC del suelo y adaptación (Chirino *et al.*, 2010). La relación entre la DSC y ciertas bacterias, es mencionada por Pao-Wen (2011) que explican que las bacterias tienen a degradar o remover los compuestos saturados y parcialmente saturados. Sin embargo, los hongos prefieren y son responsables de la degradación de metabolitos recalcitrantes.

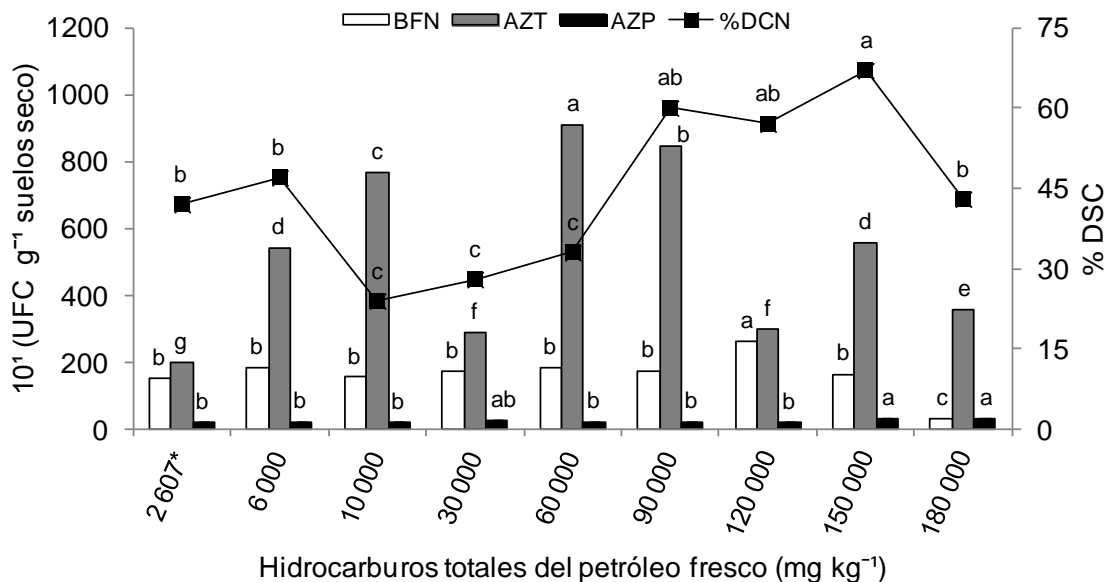


Figura 27. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

La DSC en tratamientos con PI a los tres meses, presento una relación directamente proporcional al contenido de hidrocarburo a partir de la dosis de 28 400 mg kg⁻¹ HTPI (Figura 28), el tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹ HTPI) aunque presento la mayor DSC (3 240 mg kg⁻¹ HTPI), registro la menor densidad bacteriana (14x10¹ UFC g⁻¹ s.s.). Se observo la presencia de BFN y AZT en dosis altas de PI (75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ HTP), con densidades de 167 y 417x10¹ UFC g⁻¹ s.s. las bacterias AZT y AZP presentaron una relación inversamente proporcional al porcentaje DSC en el suelo.

A los seis meses en PF, la DSC presento los valores más altos en dosis de 6 000, 10 000, 30 000, 60 000 y 90 000 mg kg⁻¹ HTP (Figura 29). Sin embargo la densidad de bacterias es irregular. El tratamiento dos presento el mayor porcentaje DSC, un 87% (5 220 mg kg⁻¹ HTP), pero con baja densidad en los tres grupos de bacterias evaluados. Las BFN presentaron una relación inversamente proporcional al porcentaje DSC en los tratamientos con PF.

La estimulación bacteriana en la rizósfera del pasto japonesa y su adaptación a dosis consecutivas de petróleo fresco e intemperizado, puede ser atribuido a los exudados de la rizósfera que incrementa la densidad y tolerancia de bacterias (Kuiper *et al.*, 2004).

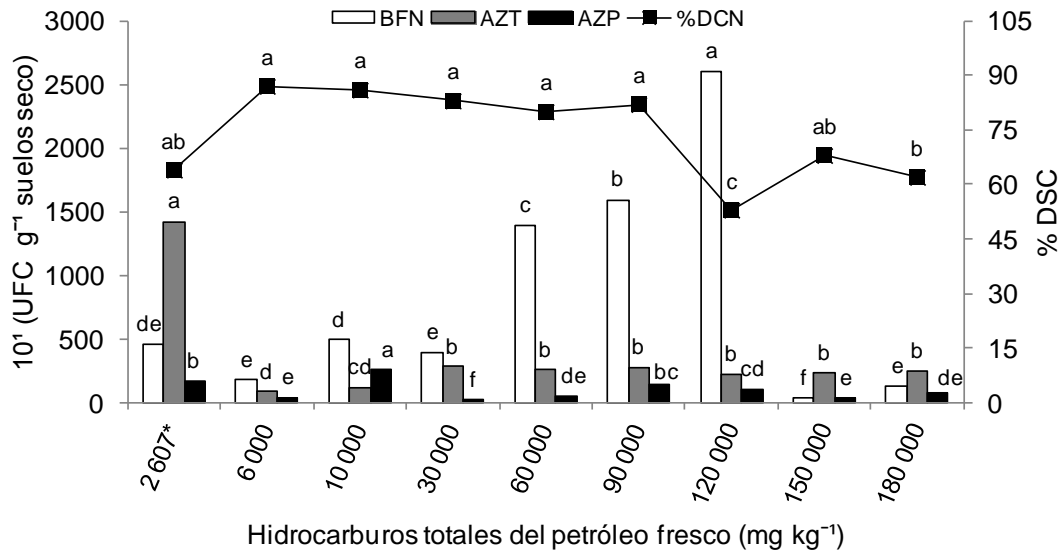


Figura 28. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

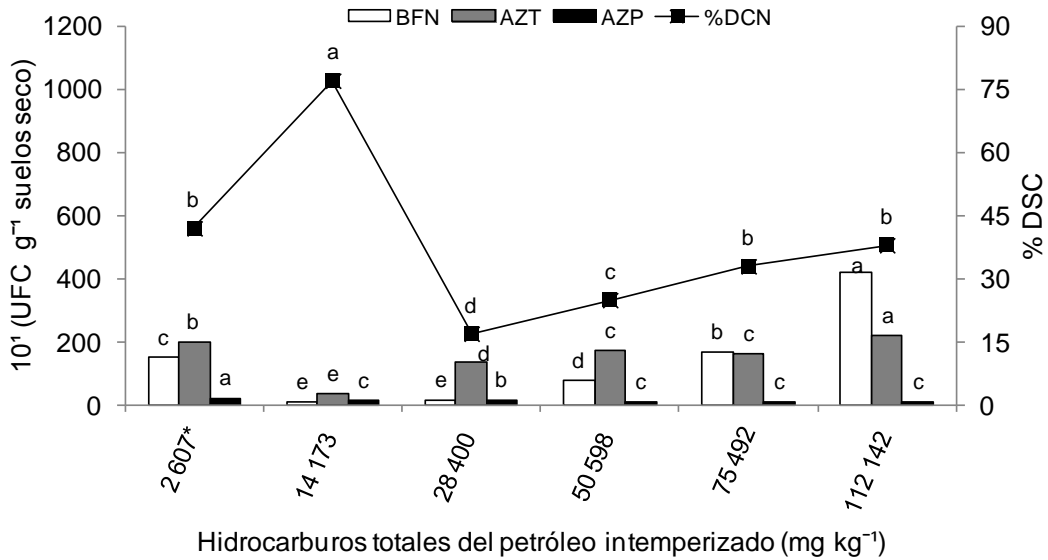


Figura 29. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

La DSC en los tratamientos con PI a los seis meses, manifestó una tendencia inversamente proporcional a la densidad de BFN (Figura 30). El tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹ de HTPI) registro la densidad más altas de BFN (827 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.) y AZT (1633 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.), las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTPI presentaron porcentajes de descontaminación del 50%, pero la densidad de bacteria no tuvo diferencias estadísticas significativas (Tukey, p≤0.05). El grupo AZT fue el que manejo un mayor nivel de adaptación a los niveles de PI, con valores desde 31 hasta 116 x10¹ UFC g⁻¹ s.s.

Las densidades de AZT en la rizósfera del pasto japonesa de suelos contaminados con petrolero fresco e intemperizado, pueden incrementar la viabilidad de nutrientes de las plantas huésped, ya que son implicados en la solubilización de P en la rizósfera (Vessey, 2003).

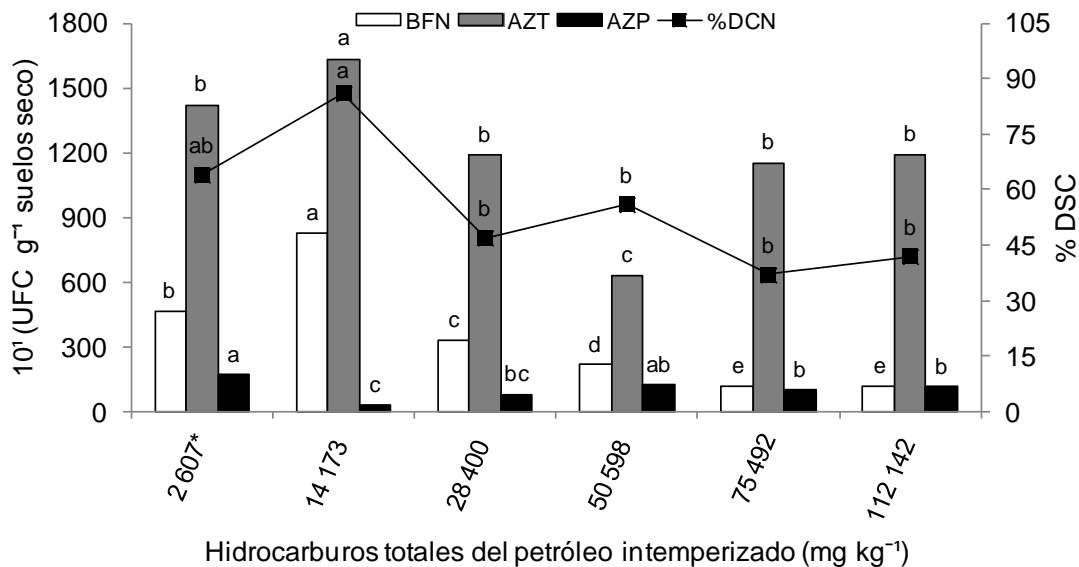


Figura 30. Relación entre descontaminación y la densidad de bacterias de la rizósfera del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

6.5.2. Actividad enzimática en rizósfera del pasto japonesa en la degradación de los hidrocarburos del petróleo

La actividad enzimática y su relación con la DSC en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado, presento diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$).

6.5.2.1. Actividad enzimática ureasa en la degradación de los hidrocarburos petróleo

La actividad enzimática de USA presento una relación directamente proporcional a la DSC a los tres meses (Figura 31) en tratamientos con PF. La relación entre DSC y actividad USA presento una tendencia irregular, Las dosis de 10 000 y 30 000 mg kg^{-1} de HTP estimularon la actividad USA en 1.29 y 1.32 $\text{mmol NH}_3 \text{g}^{-1} \text{h}^{-1}$, los porcentajes de DSC son bajos, 28 y 33% respectivamente (Figura 31). A los seis meses (Figura 32), la relación entre la DSC y la actividad USA es inversamente proporcional, a excepción de la dosis de 30 000 y 150 000 mg kg^{-1} de HTP donde la relación entre la DSC y al actividad enzimática fue directamente proporcional. Las enzimas del suelo participan en la DSC a partir de reacciones de oxidación, reducción o hidrolisis. La oxidación de moléculas orgánicas xenobióticas en plantas pueden inducir la actividad enzimática, en especial las moléculas con grupos no polares (López-Martínez *et al.*, 2005).

Margesin *et al.* (2000) observaron resultados similares en la respuesta de la actividad de USA en suelos contaminados con PF sin vegetación. Sin embargo, el incremento de la actividad solo duro las primeras semanas y después disminuyo.

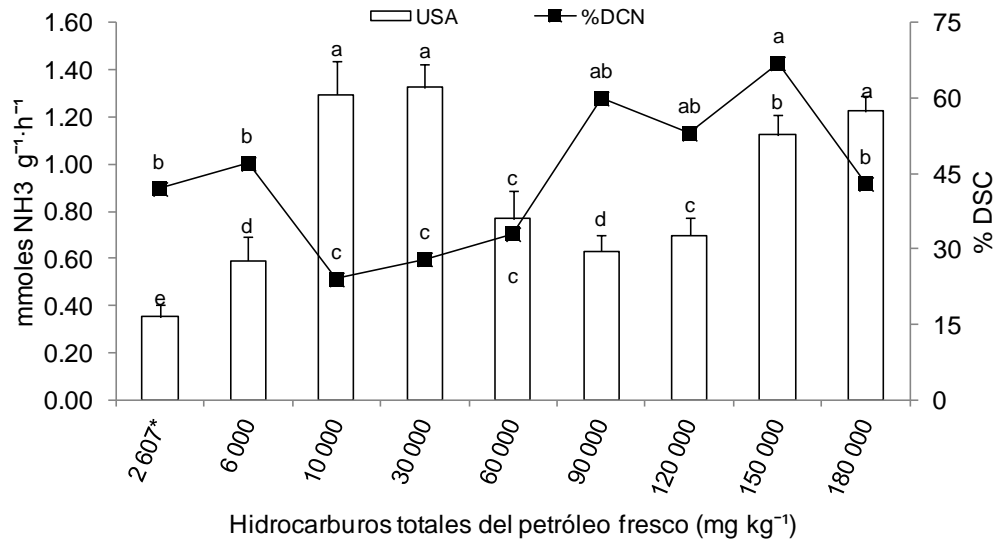


Figura 31. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

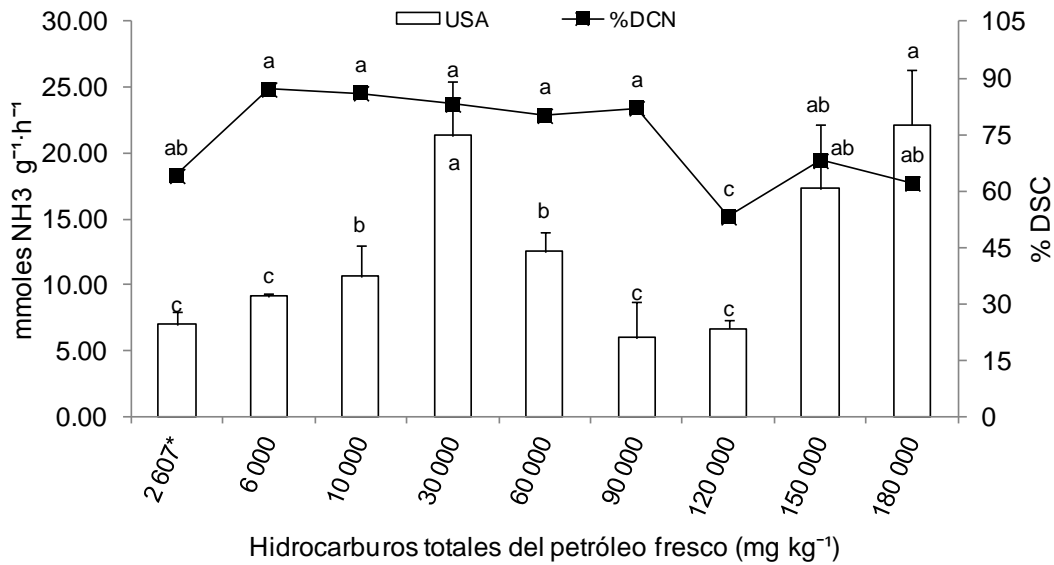


Figura 32. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

En el BIO2, la actividad de USA presenta una tendencia directamente proporcional a la DSC, a los tres (Figura 33) y seis meses (Figura 34). A los tres meses y seis meses la dosis de 14 173 mg kg⁻¹ de HTPI presentó el mayor porcentaje de DSC, con diferente valor en la actividad de USA. Sin embargo las dosis de 75 492 y 112 142 mg kg⁻¹ de HTPI aunque presentan una mayor actividad en USA, la DSC es baja. A los seis meses, la DSC en los tratamientos con PI está por debajo del 60% con valores irregulares en la actividad USA en los cinco tratamientos. Estos resultados contradicen a registrado por Gianfreda *et al.* (2005) en suelos contaminados con PI, donde la USA presentó una baja o nula actividad en relación a dosis altas y bajas de HAP.

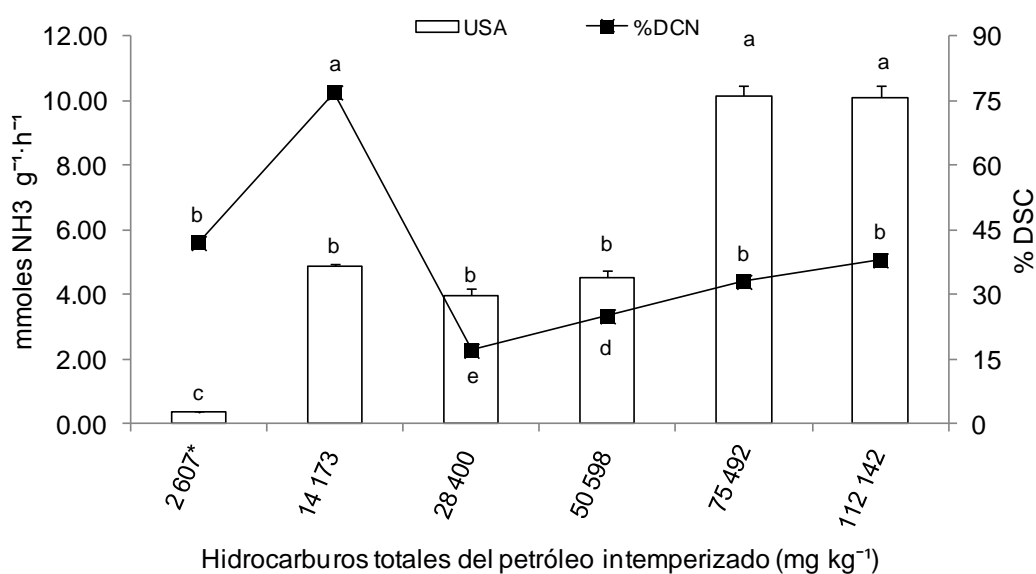


Figura 33. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

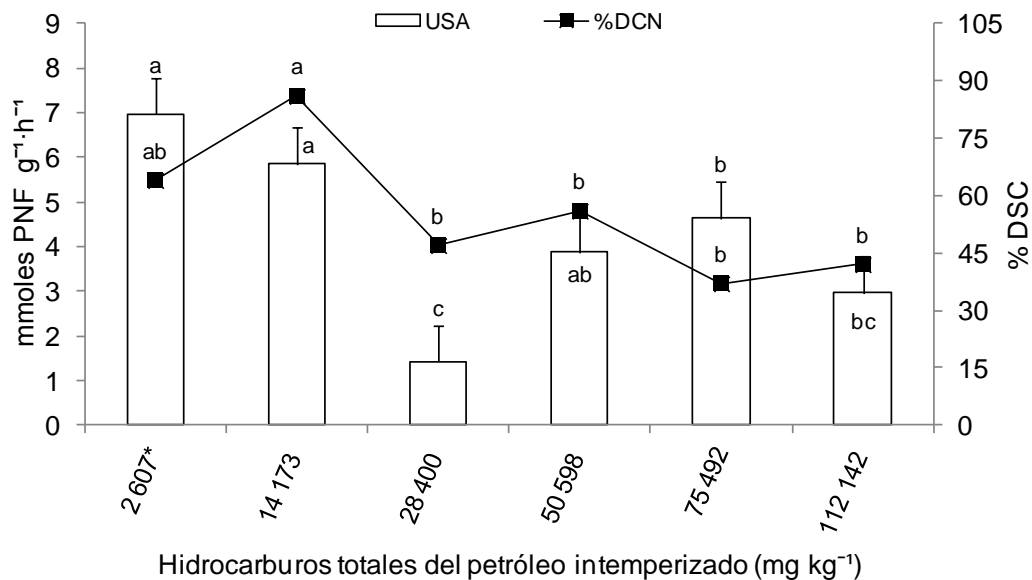


Figura 34. Relación entre descontaminación y la actividad de la ureasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

6.5.2.2. Actividad enzimática arilsulfatasa en la degradación de petróleo crudo

Los niveles de DSC en relación a la actividad de ASA a los tres meses presento una relación inversamente proporcional (Figura 35). Sin embargo, la DSC en los tratamientos con petróleo es irregular en relación a la actividad de ASA. A los seis meses (Figura 36), no se observa una tendencia entre la ASA y la DSC en los tratamientos con PF. La dosis de 6 000, 10 000, 30 000, 60 000, 90 000, 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP, aunque no presentan diferencias estadísticas significativas en la actividad de ASA, la DSC demostró diferencias entre tratamientos.

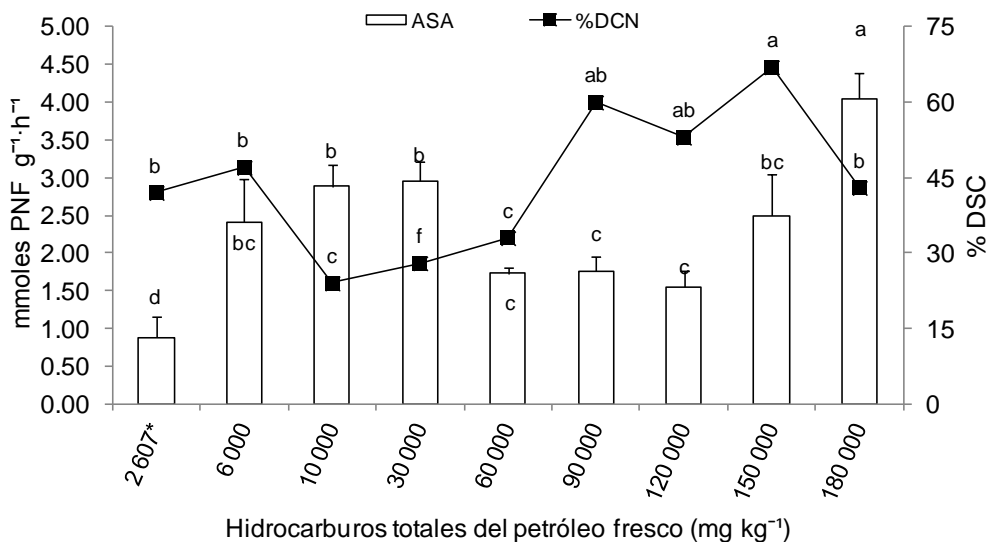


Figura 35. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

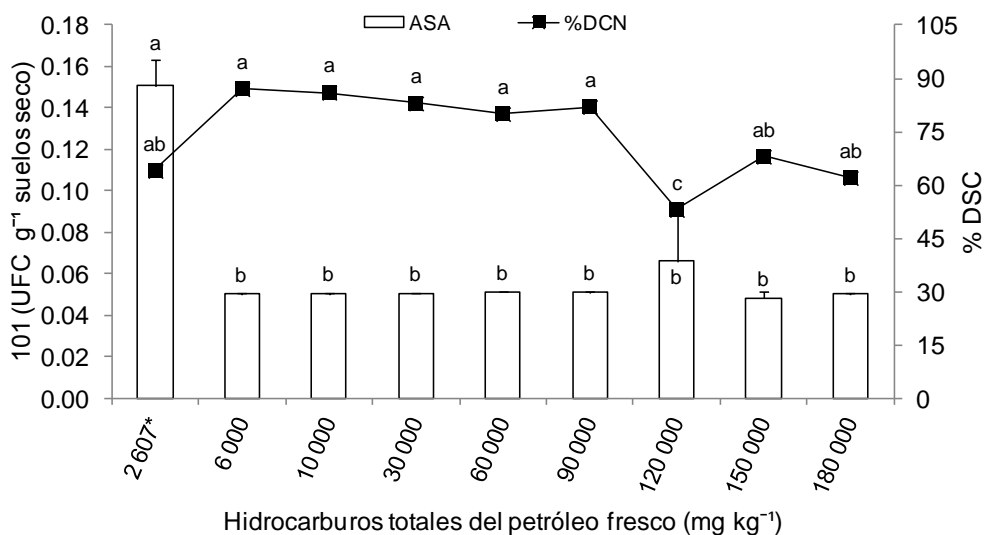


Figura 36. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

La actividad de ASA y su relación con la DSC a los tres (Figura 37) y seis meses (Figura 38) presento datos heterogéneos. El tratamiento dos (14 173 mg kg⁻¹) mostro la mayor DSC y actividad enzimática a los tres meses, sin embargo a los

seis meses, la actividad de ASA disminuyó a pesar que la DSC persistió en forma directa al contenido de HTPI.

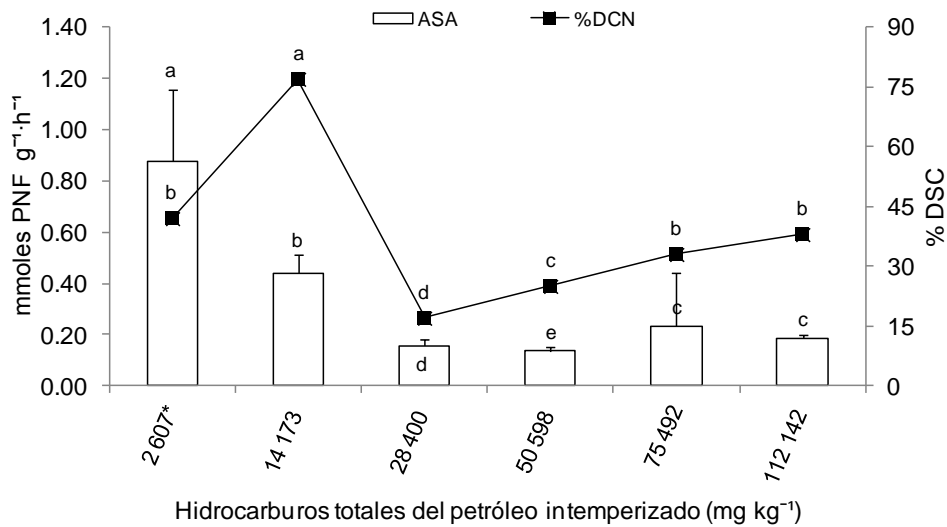


Figura 37. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

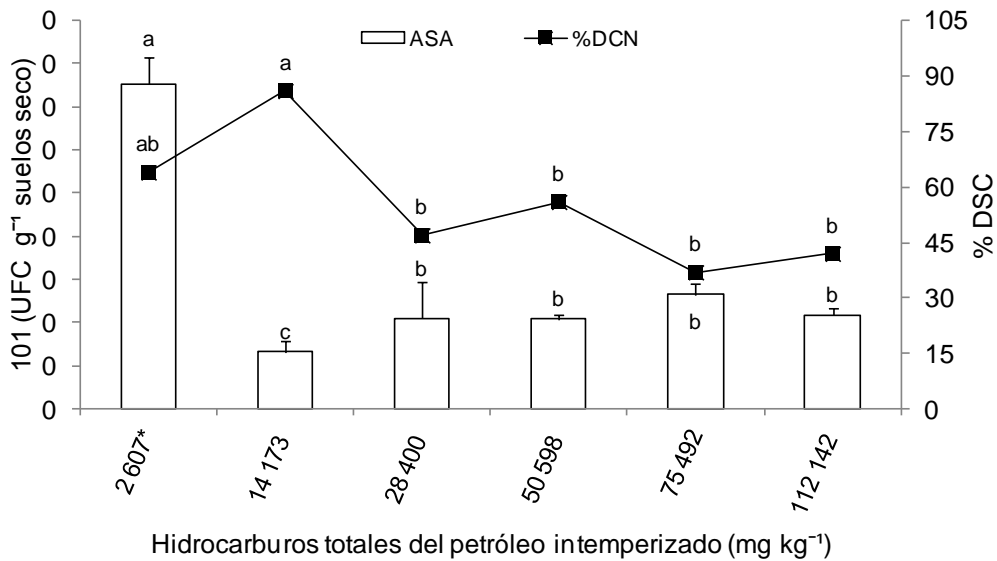


Figura 38. Relación entre descontaminación y la actividad de la arilsulfatasa del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

6.5.3. Relación de la descontaminación de petróleo con parámetros fisiológicos, microbianos y enzimáticos.

La relación positiva y negativa del porcentaje de descontaminación hidrocarburos del petróleo fresco con factores fisiológicos del pasto japonesa, grupos de bacterias fijadoras de N de vida libre y actividad enzimática en la rizósfera, fueron observados a los tres y seis meses después de establecer el bioensayo (Cuadro 14). La descontaminación de los suelos con petróleo fresco a los tres meses no presento relación con el contenido de HTP inicial, sin embargo a los seis meses presento una relación directamente significativa (0.392*).

A los tres meses la descontaminación de hidrocarburos presento una relación positiva, altamente significativa con la actividad enzimática de la ureasa (0.648**) y significativa con arilsulfatasa (0.415*) (Cuadro 14). Esto posiblemente contribuyo para el aumento de la degradación de los hidrocarburos en la rizósfera. Pero a pesar de existir descontaminación de hidrocarburos se presento una relación inversa con la densidad de bacterias del grupo *Azospirillum* (-0.335*), el diámetro de hijuelos (-0.378*) la acumulación de biomasa radical (-0.508**) y total de pasto japonesa (-0.337*).

A los seis meses la descontaminación de hidrocarburos del petróleo fue evidente, pero se observa relaciones nula o inversa en la mayoría de los parámetros con los que interactúa (Cuadro 14), sobresale que la actividad enzimática de la arilsulfatasa y el grupo de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre totales presentan una relación inversa pero altamente significativa (-0.530** y -0.594**).

La descontaminación de los suelos con petróleo intemperizado, al igual que el petróleo fresco presento a los seis meses una relación inversa altamente significativa (-0.714**) con el contenido de HTP (Cuadro 15). A los tres meses, no se encontró relación alguna de las variables fisiológicas con la descontaminación de los suelos; sin embargo las variables microbiológicas presentan efectos negativos, altamente significativa (-0.715**) en la densidad del grupo *Azotobacter* y significativa en *Azospirillum* (-0.459*). Por el contrario, la enzima arilsulfatasa manifestó una relación positiva con alta significancia (0.407*).

A los seis meses, la descontaminación de los suelos con petróleo intemperizado presenta una relación negativa altamente significativa (-0.889**) con respecto al contenido de HTP (Cuadro 15). Las variables fisiológicas número de hijuelos (-0.768**), diámetro de hijuelos (-0.714**), biomasa radical (-0.678**), biomasa foliar (-0.683**) y biomasa total (-0.754**) muestran un efecto negativo altamente significativo con la descontaminación. Por el contrario la longitud de estolones presenta una relación positiva significativa (0.434*).

Las variables microbianas de los grupos *Azotobacter* y *Azospirillum* no manifestaron relación alguna (Cuadro 15). En contraste la densidad de bacterias fijadoras de N₂ totales registro una relación positiva significativa (0.514*). La actividad enzimática de los suelos, sólo la enzima ureasa tuvo una relación positiva (0.420*) con la descontaminación de los suelos con petróleo fresco.

Cuadro 15. Correlación del porcentaje de descontaminación y las variables fisiológicas, microbianas y enzimáticas en suelos con petróleo fresco, a los tres y seis meses.

	%DSC	LE	NH	DH	BSR	BSF	BST	BFN	AZT	AZP	USA	ASA
Tres meses												
HTP	-.264	-.360*	.167	-.320	.017	-.582**	-.478**	-.304	-.144	.342*	.287	.358*
%DSC	1	-.254	-.073	-.387*	-.508**	-.119	-.371*	-.002	-.125	-.335*	.648**	.415*
LE		1	-.143	.349*	.151	.569**	.556**	-.090	.142	-.008	-.247	-.356*
NH			1	-.221	.241	.050	.170	-.058	.116	.327	.207	.046
DH				1	.293	.431**	.517**	.000	-.277	-.316	-.504**	-.295
BSR					1	.021	.551**	.013	.192	-.011	-.270	-.177
BSF						1	.846**	.014	.054	-.059	-.332*	-.367*
BST							1	.018	.147	-.055	-.421*	-.401*
BFN								1	.016	-.152	-.390*	-.541**
AZT									1	.148	.075	.132
AZP										1	.021	-.095
USA											1	.793**
ASA												1
Seis meses												
HTP	.392*	-.009	.036	-.133	.130	-.106	.024	-.719**	-.608**	-.305	.378*	-.353*
%DSC	1	.563**	-.564**	.258	-.215	.348*	.134	-.594**	-.201	.144	-.530**	.025
LE		1	-.560**	.264	-.332*	.170	-.165	-.543**	.517**	.258	-.544**	.705**
NH			1	.000	.219	-.064	.158	.178	-.264	-.334*	.653**	-.371*
DH				1	-.231	.393*	.163	-.177	-.007	.097	-.283	.103
BSR					1	-.512**	.494**	.153	-.033	-.277	.284	-.430**
BSF						1	.494**	-.082	-.312	.191	-.368*	.188
BST							1	.073	-.349*	-.090	-.084	-.244
BFN								1	.190	.142	-.105	-.184
AZT									1	.359*	-.260	.617**
AZP										1	-.494**	.287
USA											1	-.364*
ASA												1

HTP: hidrocarburos totales del petróleo; %DSC: porcentaje de descontaminación; LE: longitud de estolones; NH: número de hijuelos; DH: diámetro de hijuelos; BSR: biomasa seca radical; BSF: biomasa seca foliar; BST: biomasa seca total; AZT: densidad de bacterias del grupo *Azotobacter*; AZP: densidad de bacterias del grupo *Azospirillum*; USA: actividad enzimática ureasa y ASA: Actividad enzimática arilsulfatasa.

Cuadro 16. Correlación del porcentaje de descontaminación y las variables fisiológicas, microbianas y enzimáticas en suelos con petróleo

intemperizado, a los tres y seis meses.

	%DSC	LE	NH	DH	BSR	BSF	BST	BFN	AZT	AZP	USA	ASA
Tres meses												
HTPI	-.293	-.729**	-.611**	-.716**	-.228	-.349	-.324	-.130	.250	-.458*	.885**	-.592**
%DSC	1	.097	-.038	.188	.348	.064	.205	-.213	-.715**	-.459*	-.059	.407*
LE		1	.481*	.221	-.219	-.128	-.183	.522**	.112	.366	-.794**	.842**
NH			1	.513*	.468*	.574**	.576**	-.015	.174	.748**	-.576**	.380
DH				1	.602**	.560**	.632**	-.101	-.352	.425*	-.470*	.087
BSR					1	.676**	.936**	-.446*	-.142	.542**	-.166	-.140
BSF						1	.892**	-.437*	-.414*	.170	-.028	-.151
BST							1	-.285	.414*	-.482*	-.116	-.158
BFN								1	.449*	.234	-.029	-.124
AZT									1	-.064	-.509*	.130
AZP										1	-.124	.379
USA											1	-.595**
ASA												1
Seis meses												
HTPI	-.714**	-.889**	.847**	.844**	.915**	.714**	.909**	.033	.729**	.057	-.035	-.412*
%DSC	1	.434*	-.768**	-.714**	-.678**	-.683**	-.754**	.514*	-.316	-.326	.420*	.056
LE		1	-.688**	-.692**	-.799**	-.591**	-.777**	-.070	-.544**	.171	-.318	.570**
NH			1	.795**	.820**	.711**	.851**	-.140	.594**	.318	-.135	-.057
DH				1	.778**	.588**	.763**	-.206	.511*	.221	-.194	-.294
BSR					1	.628**	.913**	.022	.692**	-.009	-.144	-.341
BSF						1	.890**	-.185	.474*	.279	.055	.064
BST							1	-.084	.653**	.141	-.056	-.166
BFN								1	.604**	-.311	.161	-.124
AZT									1	.101	-.144	-.147
AZP										1	-.313	.707**
USA											1	-.236
ASA												1

HTP: hidrocarburos totales del petróleo; %DSC: porcentaje de descontaminación; LE: longitud de estolones; NH: número de hijuelos; DH: diámetro de hijuelos; BSR: biomasa seca radical; BSF: biomasa seca foliar; BST: biomasa seca total; AZT: densidad de bacterias del grupo *Azotobacter*; AZP: densidad de bacterias del grupo *Azospirillum*; USA: actividad enzimática ureasa y ASA: Actividad enzimática arilsulfatasa.

6.6. Los sulfatos, bacterias sulfato reductoras y actividad enzimática en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado

6.6.1. Los sulfatos y su respuesta en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado

Los contenidos de sulfatos (S-SO₄) presenta diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, p<0.05) por efectos del petróleo fresco (Apéndices, Cuadro 8) e intemperizado (Apéndices, Cuadro 23), a los tres y seis meses (Cuadro 17).

Cuadro 17. Contenidos de sulfatos en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado a los tres y seis meses.

T	HTP mg kg ⁻¹	Tres meses	Seis meses
		S-SO ₄ mg kg ⁻¹	S-SO ₄ mg kg ⁻¹
Petróleo fresco			
1	2,607 (testigo)	45±3a	45±3d
2	6,000	23±3cd	70±2bc
3	10,000	31±6b	95±2a
4	30,000	32±3b	78±5b
5	60,000	11±1d	64±9c
6	90,000	47±6a	75±7bc
7	120,000	6±3d	45±3d
8	150,000	21±1cd	68±5bc
9	180,000	8±1d	63±7c
Petróleo intemperizado			
1	2,607 (testigo)	45±3b	45±3d
2	14,173	19±2c	35±9d
3	28,400	28±8c	82±4c
4	50,598	112±7a	179±7a
5	75,492	126±6a	144±9b
6	112,142	115±7a	158±3b

[†] Valores con diferentes letras por columna y por tipo de petróleos son estadísticamente diferentes (Tukey, p<0.05); HTP: hidrocarburos totales de petróleo; S-SO₄: sulfatos.

A los tres meses el contenido de sulfatos en los tratamientos con PF, presento una relación significativa (-0.385*) de forma inversamente proporcional con el contenido de HTP (Cuadro 18). El valor medio mayor (47 mg kg⁻¹ de S-SO₄) se halla en el tratamiento seis (90 000 mg kg⁻¹ de HTP) sin diferencias estadísticas con el TT mientras que los tratamientos cinco (60 000 mg kg⁻¹ de HTP), siete (120 000 mg kg⁻¹ de HTP) y nueve (180 000 mg kg⁻¹ de HTP) presentaron los valores medios más

bajos (11, 6 y 8 mg kg⁻¹ de S-SO₄). A los seis meses por el contrario, no se encontró relación con el contenido de HTP en los tratamientos, el valor medio mayor (96 mg kg⁻¹ de S-SO₄) se registro en el TT, sin embargo la dosis de 10 000 mg kg⁻¹ de HTP no presento diferencias estadísticas significativas con el TT (95 mg kg⁻¹ de S-SO₄). Valor medio menor se registro (45 mg kg⁻¹ de S-SO₄) en el tratamiento siete (Cuadro 17).

Cuadro 18. Correlación del contenido sulfatos con bacterias reductoras de sulfatos y arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo fresco, a los tres y seis meses.

	HTP	S-SO ₄	ASA	BRST	DSV
Tres meses					
HTP	1	-.385*	.358*		
S-SO ₄		1	-.489**		
ASA			1		
Seis meses					
HTP	1	-.091	-.353*	.584**	.381*
S-SO ₄		1	.506**	-.183	.064
ASA			1	-.195	-.266
BRST				1	.673**
DSV					1

**Correlación altamente significativa (p<0.01)

*Correlación significativa (p<0.05)

HTP: hidrocarburos totales del petróleo; S-SO₄: sulfatos; ASA: arilsulfatasa; BRST: bacterias sulfato reductoras totales y DSV: bacterias del grupo *Desulfuvibrio*.

En suelos contaminados con PI, el contenido de sulfatos presento una relación inversamente proporcional al contenido de HTP a los tres (-0.533**) y seis meses (-0.616**), con alta significancia (Cuadro 19). El contenido de sulfatos se incremento a partir del tratamiento cuatro (50 598 mg kg⁻¹ de HTP) en adelante, a los tres y seis meses. El valor medio mayor (126 mg kg⁻¹ de S-SO₄) a los tres meses se registro en suelos con dosis de 75 492 mg kg⁻¹ de HTPI, un 280% menos que el TT. Las dosis de 14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ de HTPI presentan los valores medios menores un 57 y 37% menos que el TT (Cuadro 17). El comportamiento de los contenidos de sulfatos se repitió a los seis meses, el valor medio mayor (179 mg kg⁻¹ de S-SO₄) se registró en el tratamiento cuatro.

Es probable que este incremento de sulfatos a los seis meses sea a causa de la baja actividad enzimática de la arilsulfatasa (ASA). Ferreriro (2006) explica que la ASA facilita el suministro de iones sulfato a plantas y microorganismo, así como la degradación de ciertos compuesto xenobiótico. De este modo se aumenta el contenido de sulfatos que limita la diversidad vegetal y la productiva agrícola (Gómez *et al.*, 2005).

Cuadro 19. Correlación del contenido sulfatos con bacterias reductoras de sulfatos y arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo intemperizado, a los tres y seis meses.

	HTP	S-SO ₄	ASA	BRST	DSV
Tres meses					
HTP	1	-.533**	-.355		
S-SO ₄		1	-.426*		
ASA			1		
Seis meses					
HTP	1	-.616**	-.689**	.168	-.208
S-SO ₄		1	-.004	-.261	.301
ASA			1	.258	.101
BRST				1	.351
DSV					1

**Correlación altamente significativa (p<0.01)

*Correlación significativa (p<0.05)

HTP: hidrocarburos totales del petróleo; S-SO₄: sulfatos; ASA: arilsulfatasa; BRST: bacterias sulfato reductoras totales y DSV: bacterias del grupo *Desulfuvibrio*.

6.6.2. Relación de contenidos de sulfatos con la densidad de bacterias sulfato reductoras y la enzima arilsulfatasa en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado

La densidad de bacterias sulfato reductoras totales (BRST) y grupo *Desulfubrivio* a los seis meses presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos (Tukey, $p < 0.05$). Con una estimulación irregular entre los contenidos de hidrocarburos sin una tendencia convencional de dosis respuesta, a los tres (Apéndice, Cuadro 6 y 21) y seis meses (Apéndice, Cuadro 12 y 27).

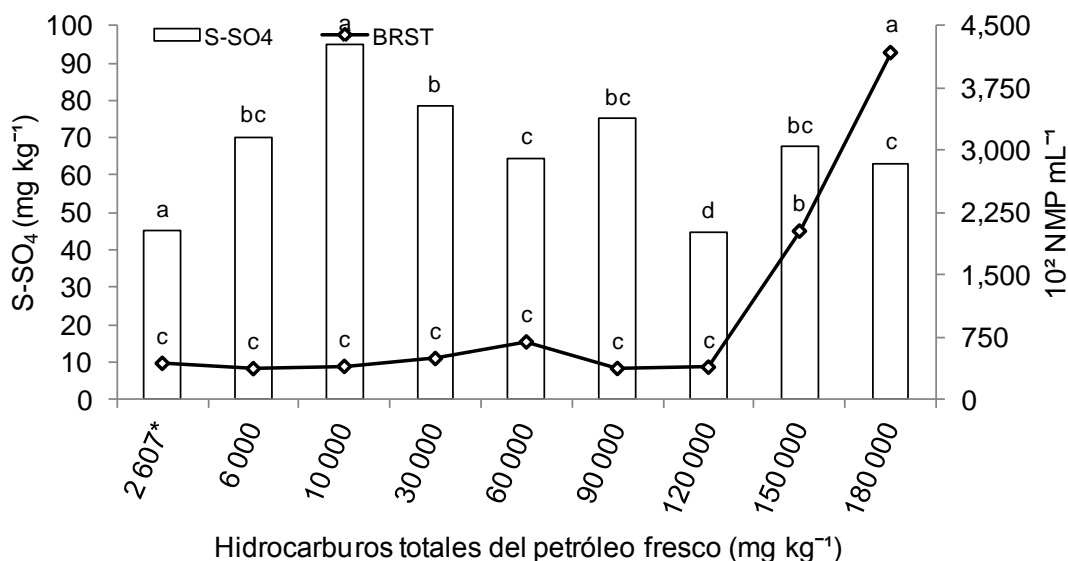


Figura 39. La relación de sulfatos y bacterias sulfato reductoras totales en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

Los contenidos de sulfatos y su relación con la densidad de BRST y DSV manifiestan un incremento irregular a los seis meses (Figura 39 y 40). Por el contrario el contenido de HTP en los suelos presentó una relación positiva (0.584**) altamente significativa en BSRT y significativa (0.381*) en DVS (Cuadro 19).

En suelos con petróleo fresco los seis primeros tratamientos con petróleo no presentaron diferencias estadísticas significativas con respecto al TT (Tukey, $p \leq 0.05$). La densidad de BRST se registró en dosis de 150 000 y 180 000 mg kg⁻¹ de HTP con valores medios de $2,025$ y $4,175 \times 10^2$ NMP mL⁻¹ respectivamente. La densidad del grupo DSV manifestó un incremento irregular, el valor medio mayor se cuantificó ($4,167 \times 10^2$ NMP mL⁻¹) en dosis de 150 000 mg kg⁻¹ de HTP. Los

tratamientos, mientras que el valor medio menor ($558 \times 10^2 \text{ NMP mL}^{-1}$) se observó en dosis de $120\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de HTP. Se halló una relación directamente proporcional con alta significancia (0.673^{**}) entre la densidad de BRST y DSV (Cuadro 18).

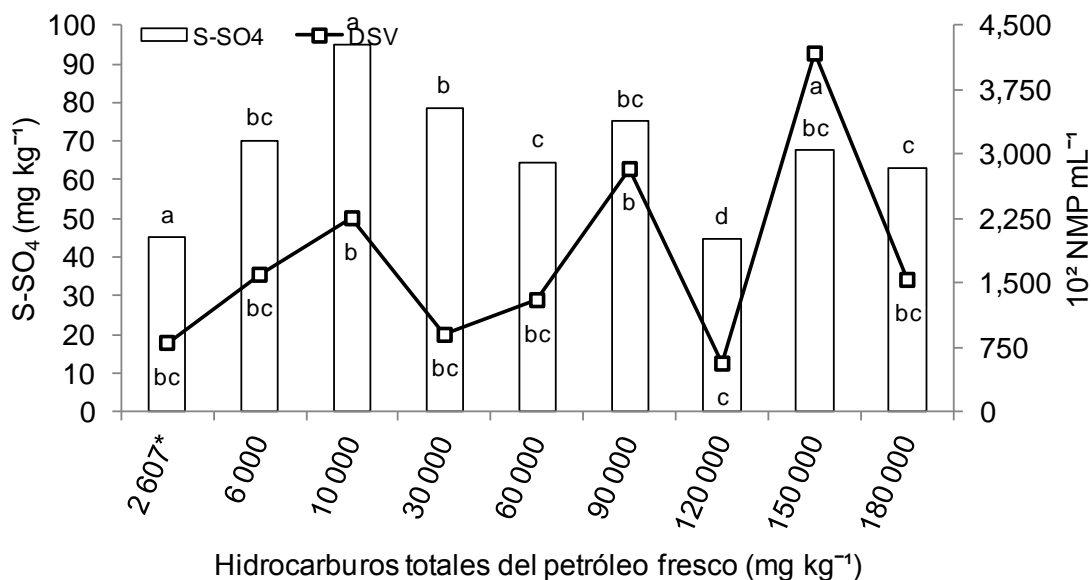


Figura 40. La relación de sulfatos y bacterias del grupo *Desulfuvibrio* en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

El incremento en las poblaciones de BRST y DSV en suelos con PF y PI, se debe al contenido de sulfatos en el suelo. Sacaca *et al.* (2009) explican que las BRST en drenajes mineros utilizan el sulfato como sustrato y lo reducen a sulfuro de hidrogeno. Así mismo, las condiciones de anegamiento y los contenidos elevados de materia orgánica benefician la adaptación y proliferación de las bacterias sulfato reductoras (Holguín *et al.*, 2011), sin embargo la competencia por el sustrato con los microorganismo metanogénicos u otras especies puede dificultar su distribución en el suelo (Gallego-García *et al.*, 2010).

Al contrario del efecto observado en PF en relación a la densidad de BRST y DSV, en PI no se manifiesta relación alguna con el contenido de HTP o sulfatos, a los seis meses (Cuadro 19). La densidad de BRST ($680 \times 10^2 \text{ NMP mL}^{-1}$) y DSV ($2,567 \times 10^2 \text{ NMP mL}^{-1}$) presentan el valor medio mayor en dosis de $50\,598 \text{ mg kg}^{-1}$ de HTPI, sin embargo el comportamiento es irregular en las cinco dosis de petróleo restantes (Cuadro 41 y 42). Las dosis altas de PI ($75\,492$ y $112\,143 \text{ mg kg}^{-1}$ de HTPI) registran las densidad medias menores de BRST, un 85% menos

que el TT. Por el contrario, las densidad de DSV obtuvieron los valores medios más bajos en las dosis de 14 173 y 28 400 mg kg⁻¹ de HTPI, en un 26 y 71% menos que el TT respectivamente. No se presentó una relación entre la densidad de BRST y DSV como en el PF (Cuadro 19).

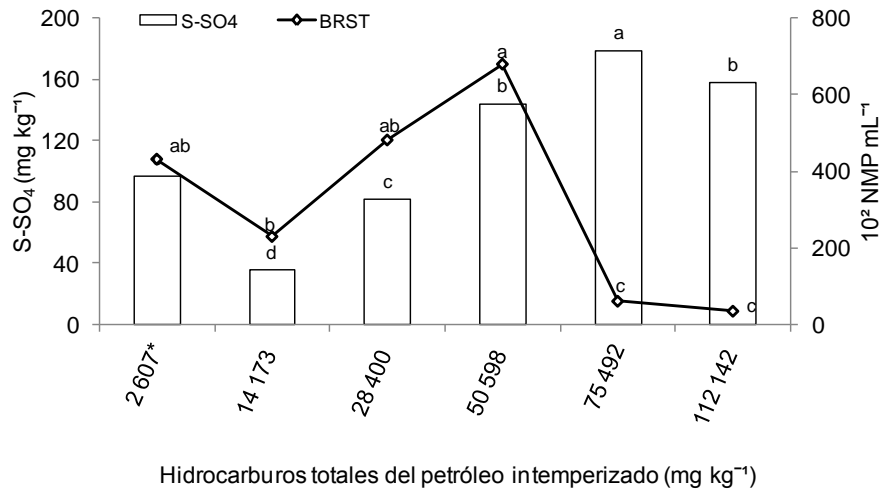


Figura 41. La relación de sulfatos y bacterias sulfato reductoras totales en suelos contaminados con petróleo intemperizado a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

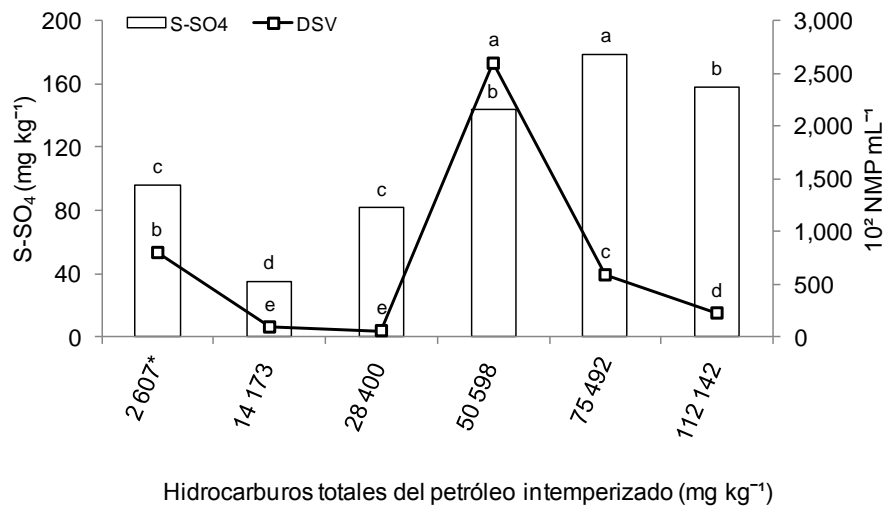


Figura 42. La relación de sulfatos y bacterias del grupo *Desulfuvibrio* en suelos contaminados con petróleo fresco a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

6.6.3. La relación de sulfatos y la actividad enzimática en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado

La actividad enzimática ASA presento una relación significativa con el contenido de HTPF positiva a los tres (0.358*) y negativa a los seis meses (-0.353*) (Cuadro 18). Por el contrario, en los tratamientos con petróleo fresco la ASA presento una relación altamente significativa con el contenido de sulfatos, a los tres meses fue inversamente proporcional (-0.498**) y directamente proporcional a los seis meses (0.506**) (Figura 43 y 44). El incremento de la ASA en los tratamientos con PF, nos indica que a pesar de los elevados contenidos de sulfatos a los tres meses, la enzima no se ve inhibe por los contenidos de HTP. Sin embargo a los seis meses la actividad de ASA disminuye.

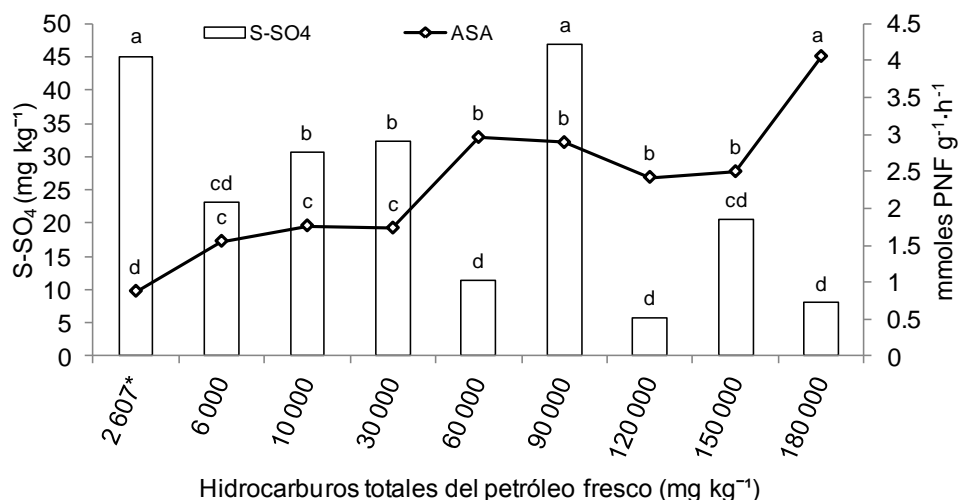


Figura 43. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo fresco, a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

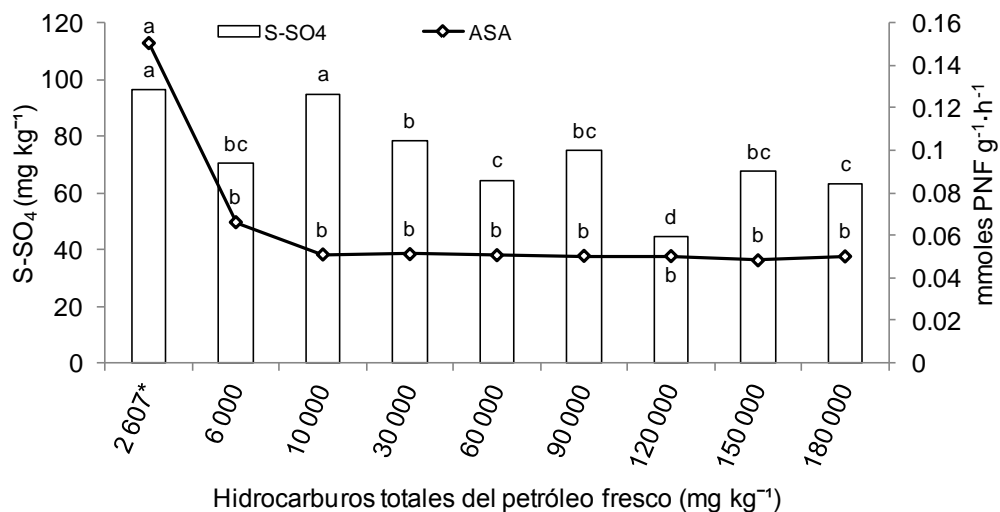


Figura 44. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo fresco, a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

Al contrario del PF, la actividad enzimática ASA en PI sólo presentó un efecto negativo (-.698**) con altamente significativo en relación al contenido de HTP a los seis meses (Cuadro 19). Por el contrario la ASA presentó una respuesta inversamente proporcional significativa (-.426*) con el contenido de sulfatos en los suelos, sólo a los tres meses (Figura 45 y 46).

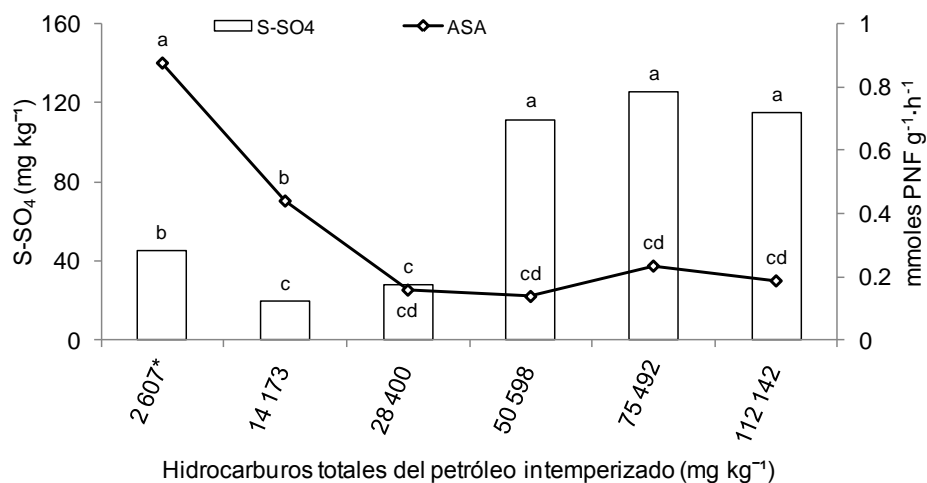


Figura 45. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo intemperizado, a los tres meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

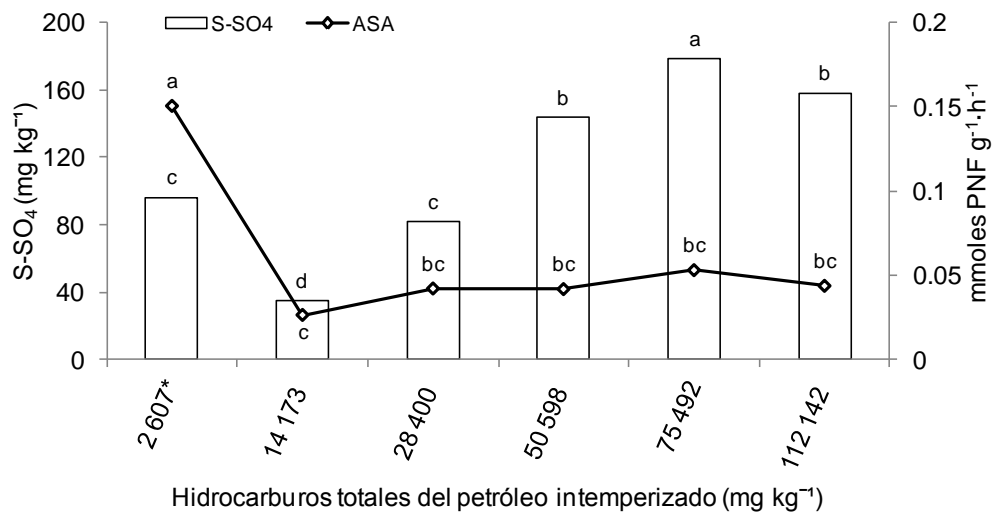


Figura 46. Relación de sulfatos y la actividad enzimática de arilsulfatasa en suelos con petróleo intemperizado a los seis meses. *hidrocarburos de origen biogénico (testigo).

SECCIÓN VII. CONCLUSIONES

7.1. Conclusión general

El crecimiento y producción del pasto japonesa, la densidad de bacterias, y la actividad enzimática en las diferentes dosis de los petróleos fresco e intemperizado en el Gleysol permitieron a los tres y seis meses seleccionar parámetros biológicos y bioquímicos de ecotoxicidad, corroborar la descontaminación de los suelos a través de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo y demostrar a nivel de microcosmo la existencia y relación de los sulfatos solubles con los tipos de petróleo, las bacterias sulfatos reductoras y la actividad enzimática de la arilsulfatasa.

7.2. Conclusiones particulares

1. Las diferentes dosis y los petróleos; fresco e intemperizado en el Gleysol a los tres y seis meses estimularon positivamente cinco de seis parámetros evaluados del crecimiento y producción del pasto japonesa (Número y diámetro de hijuelos, biomasa raíz, foliar y total), un parametro a los seis meses de dos actividades enzimáticas (ureasa), y la disminución a los seis meses de dos de cinco parámetros microbiológicos (*Azospirillum* y *Azotobacter*).
2. La ecotoxicidad del petróleo fresco e intemperizado fue demostrada a los seis meses, debido a que los índices de toxicidad alcanzados fueron mayores a cero, estos índices son; los relativos de fitotoxicidad obtenidos de la longitud de estolones del pasto japonesa, los índices bacterianos de toxicidad basados en la densidad de los grupos *Azospirillum* y *Azotobacter* y los índices bioquímicos obtenidos con la actividad enzimática de la arilsulfatasa.
3. La descontaminación evaluada a través del porcentaje de degradación de hidrocarburos totales del petróleo en el Gleysol con diferentes dosis y dos tipos de petróleos se presento a los tres y seis meses, en ambos petróleo la mayor degradación se obtuvo en dosis menores de hidrocarburos totales del petróleo.

4. El porcentaje de degradación de los hidrocarburos totales del petróleo fresco e intemperizado a los tres meses únicamente presenta relación negativa pero altamente significativa con el grupo *Azospirillum*, y *Azotobacter*; relación positiva con la actividad enzimática arilsulfatasa. A los seis meses el pasto japonesa demuestra su potencial como planta fitorremediadora debido a la relación altamente significativa y positiva del porcentaje de degradación con el crecimiento (LE) y producción de biomasa (BSF)

5. Los sulfatos solubles en el suelo a los tres y seis meses al parecer son incorporados al suelo por la presencia de petróleo fresco e intemperizado, debido a que sus contenidos aumentan conforme aumentan los hidrocarburos totales del petróleo en el suelo. Este comportamiento es evidente en mayor magnitud en suelo con petróleo intemperizado.

SECCIÓN VIII. APÉNDICES

8.1. Análisis de varianza de la respuesta de las variables fisiológicas, microbianas y bioquímicas del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo fresco

Cuadro 1. Análisis de varianza de la longitud de estolones del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco, durante seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Mes 1					
Tratamiento	8	13417.000	1677.125	20.471	.000
Error	27	2212.00	81.926		
Total	35	15629.00			
R cuadrada	0.858				
Mes 2					
Tratamiento	8	15480.056	14435.007	13.168	.000
Error	27	29598.250	096.231		
Total	35	145078.306			
R cuadrada	0.106				
Mes 3					
Tratamiento	8	116048.500	14506.063	7.874	.000
Error	27	49738.250	1842.157		
Total	35	65786.750			
R cuadrada	1.764				
Mes 4					
Tratamiento	8	46730.222	5841.278	13.699	.000
Error	27	11512.750	426.398		
Total	35	58242.972			
R cuadrada	0.802				
Mes 5					
Tratamiento	8	56647.389	7080.924	2.199	.060
Error	27	86957.500	3222.648		
Total	35	143604.889			
R cuadrada	0.394				
Mes 6					
Tratamiento	8	206505.500	25813.188	7.555	.000
Error	27	92249.250	3416.639		
Total	35	298754.750			
R cuadrada	0.691				

Cuadro 2. Análisis de varianza de número de hijuelos del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco, durante seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Mes 1					
Tratamiento	8	213.500	26.688	4.153	.002
Error	27	173.500	6.426		
Total	35	387.000			
R cuadrada	0.552				
Mes 2					
Tratamiento	8	373.722	46.715	5.402	.000
Error	27	233.500	8.648		
Total	35	607.222			
R cuadrada	0.615				
Mes 3					
Tratamiento	8	490.389	61.299	5.382	.000
Error	27	307.500	11.389		
Total	35	797.889			
R cuadrada	0.614				
Mes 4					
Tratamiento	8	872.500	109.063	7.826	.000
Error	27	376.250	13.935		
Total	35	1248.750			
R cuadrada	0.698				
Mes 5					
Tratamiento	8	1016.222	127.028	9.422	.000
Error	27	364.000	13.481		
Total	35	1380.222			
R cuadrada	0.736				
Mes 6					
Tratamiento	8	1025.556	128.194	12.406	.000
Error	27	279.000	10.333		
Total	35	1304.556			
R cuadrada	0.786				

Cuadro 3. Análisis de varianza de diámetro de hijuelos, biomasa seca radical, foliar y total del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco a los tres meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	8	1.875	.234	9.193	.000
Error	27	.688	.025		
Total	35	2.564			
R cuadrada	0.731				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	8	97.981	12.248	3.459	.007
Error	27	95.611	3.541		
Total	35	193.592			
R cuadrada	0.506				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	8	220.711	27.589	4.347	.002
Error	27	171.377	6.347		
Total	35	392.088			
R cuadrada					
Biomasa seca total					
Tratamiento	8	383.558	47.945	6.628	.000
Error	27	195.314	7.234		
Total	35	578.871			
R cuadrada	0.563				

Cuadro 4. Análisis de varianza diámetro de hijuelos, biomasa seca radical, foliar y total del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	8	2.921	.365	1.850	.111
Error	27	5.329	.197		
Total	35	8.250			
R cuadrada	0.354				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	8	994.044	124.255	5.003	.001
Error	27	670.613	24.838		
Total	35	1664.656			
R cuadrada	0.597				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	8	1158.166	144.771	7.660	.000
Error	27	510.318	18.901		
Total	35	1668.483			
R cuadrada	0.694				
Biomasa seca total					
Tratamiento	8	596.970	74.621	1.959	.092
Error	27	1028.578	38.095		
Total	35	1625.548			
R cuadrada	0.367				

Cuadro 5. Análisis de varianza de las densidades de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN), *Azotobacter* y *Azospirillum* en la rizósfera del pasto japonesa en suelos con petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
BFN					
Tratamiento	8	4923.506	615.438	6.759	.000
Error	27	2458.333	91.049		
Total	35	7381.840			
R cuadrada	0.667				
<i>Azotobacter</i>					
Tratamiento	8	103410.789	12926.349	37.942	.000
Error	27	9198.487	340.685		
Total	35	112609.276			
R cuadrada	0.918				
<i>Azospirillum</i>					
Tratamiento	8	59.778	7.472	6.651	.000
Error	27	30.333	1.123		
Total	35	90.111			
R cuadrada	0.663				
Seis meses					
BFN					
Tratamiento	8	23939842.078	2992480.260	1934.873	.000
Error	27	41758.283	1546.603		
Total	35	23981600.361			
R cuadrada	0.998				
<i>Azotobacter</i>					
Tratamiento	8	9417084.338	1177135.542	546.843	.000
Error	27	58120.293	2152.603		
Total	35	9475204.631			
R cuadrada	0.993				
<i>Azospirillum</i>					
Tratamiento	8	184160.968	23020.121	45.789	.000
Error	27	13574.123	502.745		
Total	35	197735.092			
R cuadrada	0.931				

Cuadro 6. Análisis de varianza de las densidades de bacterias sulfato reductoras y *Desulfuvibrio* en suelos con petróleo fresco a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BRS					
Tratamiento	8	54575950000.000	68219937500.000	14.462	.000
Error	27	127361730000.000	4717101111.111		
Total	35	673121230000.000			
R cuadrada	0.810				
Desulfuvibrio					
Tratamiento	8	423191745541.838	52898968192.730	8.780	.000
Error	27	162678759259.259	6025139231.824		
Total	35	585870504801.097			
R cuadrada	0.722				

BRS: bacterias sulfato reductoras

Cuadro 7. Análisis de varianza de la actividad enzimática ureasa y arilsulfatasa de suelos con petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Ureasa					
Tratamiento	8	4.086	.511	57.421	.000
Error	27	.240	.009		
Total	35	4.327			
R cuadrada	0.944				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	8	28.383	3.548	21.231	.000
Error	27	4.512	.167		
Total	35	32.895			
R cuadrada	0.862				
Seis meses					
Ureasa					
Tratamiento	8	1263.506	157.938	18.659	.000
Error	27	228.543	8.465		
Total	35	1492.049			
R cuadrada	0.847				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	8	.035	.004	59.628	.000
Error	27	.002	.000		
Total	35	.037			
R cuadrada	0.946				

Cuadro 8. Análisis de varianza del contenido de sulfatos en suelos con petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Tratamiento	8	7289.418	911.177	68.274	.000
Error	27	360.337	13.346		
Total	35	7649.755			
R cuadrada	0.952				
Seis meses					
Tratamiento	8	8229.929	1028.741	33.829	.000
Error	27	821.063	30.410		
Total	35	9050.991			
R cuadrada	0.910				

Cuadro 9. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental fisiológicos de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco a los tres meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Longitud de estolones					
Tratamiento	8	.151	.019	2.151	0.065
Error	27	.237	.009		
Total	35	.388			
R cuadrada	0.389				
Numero de hijuelos					
Tratamiento	8	2.340	.293	4.986	.001
Error	27	1.584	.059		
Total	35	3.925			
R cuadrada	0.596				
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	8	.308	.038	9.092	.000
Error	27	.114	.004		
Total	35	.422			
R cuadrada	0.729				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	8	2.319	.290	3.650	.005
Error	27	2.145	.079		
Total	35	4.464			
R cuadrada	0.519				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	8	.527	.066	4.433	.002
Error	27	.401	.015		
Total	35	.929			
R cuadrada	0.567				
Biomasa seca total					
Tratamiento	8	.529	.066	6.891	.000
Error	27	.259	.010		
Total	35	.787			
R cuadrada	0.672				

Cuadro 10. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental fisiológicos de pasto japonesa en suelos con petróleo fresco a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Longitud de estolones					
Tratamiento	8	.288	.036	346.717	.000
Error	27	.003	.000		
Total	35	.290			
R cuadrada	0.993				
Numero de hijuelos					
Tratamiento	8	1.275	.159	5.295	.000
Error	27	.813	.030		
Total	35	2.088			
R cuadrada	0.611				
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	8	.872	.109	1.845	.112
Error	27	1.595	.059		
Total	35	2.466			
R cuadrada	0.353				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	8	7.260	.907	5.151	.001
Error	27	4.757	.176		
Total	35	12.016			
R cuadrada	0.604				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	8	.648	.081	9.551	.000
Error	27	.229	.008		
Total	35	.877			
R cuadrada	0.738				
Biomasa seca total					
Tratamiento	8	.207	.026	2.433	.040
Error	27	.287	.011		
Total	35	.494			
R cuadrada	0.419				

Cuadro 11. Análisis de varianza de los índices de relativos de impacto ambiental de las densidades de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN), *Azotobacter* y *Azospirillum* en suelos con petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	de	Grados de libertad	de	Suma de cuadrados	de	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses								
BFN								
Tratamiento		8		4.812		.601	9.169	.000
Error		27		1.771		.066		
Total		35		6.583				
R cuadrada		0.635						
<i>Azotobacter</i>								
Tratamiento		8		3.353		.419	13893.746	.000
Error		27		.001		.000		
Total		35		3.354				
R cuadrada		0.999						
<i>Azospirillum</i>								
Tratamiento		8		5.393		.674	6.803	.000
Error		27		2.675		.099		
Total		35		8.068				
R cuadrada		0.668						
Seis meses								
BFN								
Tratamiento		8		111.677		13.960	2306.547	.000
Error		27		.163		.006		
Total		35		111.840				
R cuadrada		0.998						
<i>Azotobacter</i>								
Tratamiento		8		4.657		.582	566.354	.000
Error		27		.028		.001		
Total		35		4.685				
R cuadrada		0.994						
<i>Azospirillum</i>								
Tratamiento		8		6.298		.787	98.299	.000
Error		27		.216		.008		
Total		35		6.514				
R cuadrada		0.967						

Cuadro 12. Análisis de varianza de los índices de relativos de impacto ambiental de las densidades de bacterias sulfato reductoras y *Desulfuvibrio* en suelos con petróleo fresco a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BRS					
Tratamiento	8	291.762	36.470	14.540	.000
Error	27	67.722	2.508		
Total	35	359.485			
R cuadrada	0.812				
Desulfuvibrio					
Tratamiento	8	66.263	8.283	8.801	.000
Error	27	25.410	.941		
Total	35	91.673			
R cuadrada	0.723				

BRS: bacterias sulfato reductoras

Cuadro 13. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental de la actividad enzimática ureasa y arilsulfatasa de suelos con petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Ureasa					
Tratamiento	8	33.177	4.147	59.359	.000
Error	27	1.886	.070		
Total	35	35.063			
R cuadrada	0.946				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	8	36.969	4.621	22.428	.000
Error	27	5.563	.206		
Total	35	42.533			
R cuadrada	0.869				
Seis meses					
Ureasa					
Tratamiento	8	26.053	3.257	18.880	.000
Error	27	4.657	.172		
Total	35	30.710			
R cuadrada	0.848				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	8	1.555	.194	78.601	.000
Error	27	.067	.002		
Total	35	1.622			
R cuadrada	0.959				

Cuadro 14. Análisis de varianza de los índices absolutos de impacto ambiental: fisiológico (IAIAF), microbiano (IAIAM) y Enzimático (IAIAB) de petróleo fresco a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
IAIAF					
Tratamiento	8	.397	.050	8.971	.000
Error	27	.149	.006		
Total	35	.546			
R cuadrada	0.728				
IAIAM					
Tratamiento	8	1.210	.151	12.557	.000
Error	27	.325	.012		
Total	35	1.535			
R cuadrada	0.789				
IAIAB					
Tratamiento	8	32.134	4.017	41.209	.000
Error	27	2.632	.097		
Total	35	34.766			
R cuadrada	0.924				
Seis meses					
IAIAF					
Tratamiento	8	.198	.025	2.349	.046
Error	27	.285	.011		
Total	35	.484			
R cuadrada	0.409				
IAIAM					
Tratamiento	8	15.928	1.991	1421.541	.000
Error	27	.038	.001		
Total	35	15.966			
R cuadrada	0.998				
IAIAB					
Tratamiento	8	5.638	.705	16.300	.000
Error	27	1.167	.043		
Total	35	6.805			
R cuadrada	0.829				

8.2. Análisis de varianza de la respuesta de las variables fisiológicas, microbianas y bioquímicas del pasto japonesa en suelos contaminados con petróleo intemperizado

Cuadro 16. Análisis de varianza de la longitud de estolones del pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado, durante seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	de Suma de cuadrados	de Cuadrado medio	F calculada	P>F
Mes 1					
Tratamiento	5	358.929	59.821	.996	.454
Error	18	1261.750	60.083		
Total	23	1620.679			
R cuadrada	0.221				
Mes 2					
Tratamiento	5	57377.357	9562.893	57.928	.000
Error	18	3466.750	165.083		
Total	23	60844.107			
R cuadrada	0.943				
Mes 3					
Tratamiento	5	132996.714	22166.119	10.162	.000
Error	18	45806.250	2181.250		
Total	23	178802.964			
R cuadrada	0.743				
Mes 4					
Tratamiento	5	142510.929	23751.821	7.010	.000
Error	18	71155.500	3388.357		
Total	23	213666.429			
R cuadrada	0.667				
Mes 5					
Tratamiento	5	67800.714	11300.119	1.675	.177
Error	18	141646.250	6745.060		
Total	23	209446.964			
R cuadrada	0.324				
Mes 6					
Tratamiento	5	59225.214	9870.869	1.614	.193
Error	18	128394.500	6114.024		
Total	23	187619.714			
R cuadrada	0.316				

Cuadro 17. Análisis de varianza de número de hijuelos del pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado, durante seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Mes 1					
Tratamiento	5	163.375	32.675	6.111	.002
Error	18	96.250	5.347		
Total	23	259.625			
R cuadrada	0.629				
Mes 2					
Tratamiento	5	256.875	51.375	5.937	.002
Error	18	155.750	8.653		
Total	23	412.625			
R cuadrada	0.622				
Mes 3					
Tratamiento	5	735.333	147.067	23.636	.000
Error	18	112.000	6.222		
Total	23	847.333			
R cuadrada	0.867				
Mes 4					
Tratamiento	5	2088.708	417.742	47.217	.000
Error	18	159.250	8.847		
Total	23	2247.958			
R cuadrada	0.929				
Mes 5					
Tratamiento	5	2178.833	435.767	29.655	.000
Error	18	264.500	14.694		
Total	23	2443.333			
R cuadrada	0.891				
Mes 6					
Tratamiento	5	2644.833	528.967	66.583	.000
Error	18	143.000	7.944		
Total	23	2787.833			
R cuadrada	0.945				

Cuadro 18. Análisis de varianza de número y diámetro de hijuelos, biomasa seca

radical, foliar y total, y el índice de biomasa radical/foliar del pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado a los tres meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	5	2.439	.488	12.189	.000
Error	18	.720	.040		
Total	23	3.159			
R cuadrada	0.772				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	5	307.055	61.411	4.773	.006
Error	18	231.570	12.865		
Total	23	538.625			
R cuadrada	0.570				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	5	665.682	133.136	10.895	.000
Error	18	219.958	12.220		
Total	23	885.640			
R cuadrada	0.751				
Biomasa seca total					
Tratamiento	5	1781.938	356.388	11.129	.000
Error	18	576.400	32.022		
Total	23	2358.338			
R cuadrada	0.756				

Cuadro 19. Análisis de varianza de número y diámetro de hijuelos, biomasa seca radical, foliar y total, y el índice de biomasa radical/foliar del pasto

japonesa en suelos con petróleo intemperizado a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	5	.485	.097	22.136	.000
Error	18	.079	.004		
Total	23	.564			
R cuadrada	0.859				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	5	1702.933	340.587	18.925	.000
Error	18	323.945	17.997		
Total	23	2026.878			
R cuadrada	0.840				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	5	1191.617	238.323	10.068	.000
Error	18	426.093	23.672		
Total	23	1617.710			
R cuadrada	0.736				
Biomasa seca total					
Tratamiento	5	5281.749	1056.350	29.910	.000
Error	18	635.708	35.317		
Total	23	5917.456			
R cuadrada	0.892				
Índice de biomasa Radical/Foliar					
Tratamiento	5	.395	.079	5.349	.003
Error	18	.266	.015		
Total	23	.661			
R cuadrada	0.598				

Cuadro 20. Análisis de varianza de las densidades de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN), *Azotobacter* y *Azospirillum* en la

rizósfera del pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
BFN					
Tratamiento	5	4408.678	881.736	20.950	.000
Error	18	757.571	42.087		
Total	23	5166.249			
R cuadrada	0.853				
Azotobacter					
Tratamiento	5	1391.468	278.294	8.404	.000
Error	18	596.083	33.116		
Total	23	1987.551			
R cuadrada	0.700				
Azospirillum					
Tratamiento	5	85.926	17.185	116.000	.000
Error	18	2.667	.148		
Total	23	88.593			
R cuadrada	0.969				
Seis meses					
BFN					
Tratamiento	5	1775472.484	355094.497	204.999	.000
Error	18	31179.143	1732.175		
Total	23	1806651.627			
R cuadrada	0.983				
Azotobacter					
Tratamiento	5	319036639.864	63807327.973	159.838	.000
Error	18	7185606.320	399200.351		
Total	23	326222246.184			
R cuadrada	0.978				
Azospirillum					
Tratamiento	5	44246.650	8849.330	17.772	.000
Error	18	8962.697	497.928		
Total	23	53209.346			
R cuadrada	0.831				

BFN: bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Cuadro 21. Análisis de varianza de las densidades de bacterias sulfato reductoras y *Desulfuvibrio* en suelos con petróleo intemperizado a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BRS					
Tratamiento	5	10456885000.000	2091377000.000	8.601	.000
Error	18	4376955000.000	243164166.667		
Total	23	14833840000.000			
R cuadrada	0.705				
Desulfuvibrio					
Tratamiento	5	185938757638.889	37187751527.778	13.571	.000
Error	18	49322844166.667	2740158009.259		
Total	23	235261601805.556			
R cuadrada	0.790				

BRS: bacterias sulfato reductoras

Cuadro 22. Análisis de varianza de la actividad enzimática ureasa y arilsulfatasa de suelos con petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Ureasa					
Tratamiento	5	291.095	58.219	114.528	.000
Error	18	9.150	.508		
Total	23	300.245			
R cuadrada	0.969				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	5	1.627	.325	22.436	.000
Error	18	.261	.015		
Total	23	1.888			
R cuadrada	0.861				
Seis meses					
Ureasa					
Tratamiento	5	47.443	9.489	7.105	.001
Error	18	24.038	1.335		
Total	23	71.481			
R cuadrada	0.664				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	5	.041	.008	95.282	.000
Error	18	.002	.000		
Total	23	.043			
R cuadrada	0.95				

Cuadro 23. Análisis de varianza del contenido de sulfatos de suelos con petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Tratamiento	5	46698.582	9339.716	136.153	.000
Error	18	1234.753	68.597		
Total	23	47933.335			
R cuadrada	0.974				
Seis meses					
Tratamiento	5	58138.568	11627.714	48.320	.000
Error	18	4331.522	240.640		
Total	23	62470.090			
R cuadrada	0.930				

Cuadro 24. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental fisiológicos de pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado a los tres meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Longitud de estolones					
Tratamiento	5	1.243	.249	879.238	.000
Error	18	.005	.000		
Total	23	1.248			
R cuadrada	0.996				
Numero de hijuelos					
Tratamiento	5	.879	.176	10.689	.000
Error	18	.296	.016		
Total	23	1.175			
R cuadrada	0.748				
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	5	.390	.078	12.245	.000
Error	18	.115	.006		
Total	23	.505			
R cuadrada	0.773				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	5	7.269	1.454	4.880	.005
Error	18	5.362	.298		
Total	23	12.631			
R cuadrada	0.576				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	5	1.581	.316	11.091	.000
Error	18	.513	.029		
Total	23	2.095			
R cuadrada	0.755				
Biomasa seca total					
Tratamiento	5	2.441	.488	11.260	.000
Error	18	.780	.043		
Total	23	3.221			
R cuadrada	0.758				

Cuadro 25. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental fisiológicos de pasto japonesa en suelos con petróleo intemperizado a

los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Longitud de estolones					
Tratamiento	5	.537	.107	571.736	.000
Error	18	.003	.000		
Total	23	.541			
R cuadrada	0.993				
Numero de hijuelos					
Tratamiento	5	4.189	.838	21.396	.000
Error	18	.705	.039		
Total	23	4.894			
R cuadrada	0.856				
Diámetro de hijuelos					
Tratamiento	5	.158	.032	1.227	.337
Error	18	.463	.026		
Total	23	.621			
R cuadrada	0.254				
Biomasa seca radical					
Tratamiento	5	12.440	2.488	20.134	.000
Error	18	2.224	.124		
Total	23	14.664			
R cuadrada	0.848				
Biomasa seca foliar					
Tratamiento	5	.677	.135	13.226	.000
Error	18	.184	.010		
Total	23	.861			
R cuadrada	0.786				
Biomasa seca total					
Tratamiento	5	2.140	.428	45.516	.000
Error	18	.169	.009		
Total	23	2.310			
R cuadrada	0.926				

Cuadro 26. Análisis de varianza de los índices de relativos de impacto ambiental de las densidades de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (BFN), *Azotobacter* y *Azospirillum* en suelos con petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	de	Grados de libertad	Suma de cuadrados	de Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses						
BFN						
Tratamiento	5		4.495	.899	137.722	.000
Error	18		.117	.007		
Total	23		4.612			
R cuadrada		0.974				
<i>Azotobacter</i>						
Tratamiento	5		1.204	.241	11.435	.000
Error	18		.379	.021		
Total	23		1.583			
R cuadrada		0.760				
<i>Azospirillum</i>						
Tratamiento	5		9.259	1.852	150.000	.000
Error	18		.222	.012		
Total	23		9.481			
R cuadrada		0.976				
Seis meses						
BFN						
Tratamiento	5		8.282	1.656	261.414	.000
Error	18		.114	.006		
Total	23		8.396			
R cuadrada		0.986				
<i>Azotobacter</i>						
Tratamiento	5		157.776	31.555	159.882	.000
Error	18		3.553	.197		
Total	23		161.329			
R cuadrada		0.978				
<i>Azospirillum</i>						
Tratamiento	5		1.513	.303	93.065	.000
Error	18		.059	.003		
Total	23		1.572			
R cuadrada		0.962				

BFN: bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre.

Cuadro 27. Análisis de varianza de los índices de relativos de impacto ambiental

de las densidades de bacterias sulfato reductoras y *Desulfuvibrio* en suelos con petróleo intemperizado a los seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BRS					
Tratamiento	5	5.590	1.118	10.190	.000
Error	18	1.975	.110		
Total	23	7.565			
R cuadrada	0.739				
Desulfuvibrio					
Tratamiento	5	22.694	4.539	13.588	.000
Error	18	6.013	.334		
Total	23	28.707			
R cuadrada	0.791				

BRS: bacterias sulfato reductoras

Cuadro 28. Análisis de varianza de los índices relativos de impacto ambiental de la actividad enzimática ureasa y arilsulfatasa de suelos con petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
Ureasa					
Tratamiento	5	2.091	.418	600.398	.000
Error	18	.013	.001		
Total	23	2.104			
R cuadrada	0.994				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	5	2.121	.424	271.806	.000
Error	18	.028	.002		
Total	23	2.149			
R cuadrada	0.987				
Seis meses					
Ureasa					
Tratamiento	5	5.649	1.130	7.127	.001
Error	18	2.854	.159		
Total	23	8.502			
R cuadrada	0.664				
Arilsulfatasa					
Tratamiento	5	1.819	.364	133.939	.000
Error	18	.049	.003		
Total	23	1.868			
R cuadrada	0.974				

Cuadro 29. Análisis de varianza de los índices absolutos de impacto ambiental: fisiológico (IAIAF), microbiano (IAIAM) y Enzimático (IAIAB) de petróleo intemperizado a los tres y seis meses.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tres meses					
IAIAF					
Tratamiento	5	1.163	.233	9.846	.000
Error	18	.425	.024		
Total	23	1.589			
R cuadrada	0.731				
IAIAM					
Tratamiento	5	1.986	.397	61.466	.000
Error	18	.116	.006		
Total	23	2.103			
R cuadrada	0.944				
IAIAB					
Tratamiento	5	1.965	.393	675.366	.000
Error	18	.010	.001		
Total	23	1.976			
R cuadrada	0.994				
Seis meses					
IAIAF					
Tratamiento	5	1.550	.310	43.681	.000
Error	18	.128	.007		
Total	23	1.677			
R cuadrada	0.924				
IAIAM					
Tratamiento	5	23.660	4.732	189.415	.000
Error	18	.450	.025		
Total	23	24.110			
R cuadrada	0.981				
IAIAB					
Tratamiento	5	1.398	.280	7.055	.001
Error	18	.713	.040		
Total	23	2.111			
R cuadrada	0.662				

SECCIÓN IX. LITERATURA CITADA

- Achuba, F. I. y B. O. Peretiemo. 2008. Effect of spent engine oil on soil catalase and dehydrogenase activities. *Int. Agrophysics* 22: 1-4.
- Acosta-Martínez, V., L. Cruz, D. Sotomayor-Ramírez, L. Pérez-Alegría. 2007. Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed. *Applied Soil Ecology* 35:35-45.
- Adam, G. y H. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120: 363-370.
- Adams, R., J. Zavala-Cruz y F. A. Morales G. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico, II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia* 33(7): 483-493.
- Agbogidi, O., y Enujeke, E. C. 2012. Effects of spent motor oil on soil physico-chemical properties and growth of *Arachis hypogaea* L. *Global Journal of Bio-Science & Biotechnology* 1:71-74.
- Akpor, O. B., O. E. Igbinosa E. y O. O. Igbinosa. 2007. Studies on the effect of petroleum hydrocarbon on the microbial and physico-chemicals characteristics of soil. *African Journal of Biotechnology* 6(16): 1939-1943.
- Akubugwo, E. I., G. C. Ogbuji, C. G. Chinyere, y E. A. Ugbogu. 2009. Physicochemical properties and enzymes activity studies in a refined oil contaminated soil in Isiukwuato, Abia state, Nigeria. *Biokemistri* 21(2): 79-84.
- Alcántar G., G., B. J. D. Etchevers y S. A. Aguilar. 1992. Los análisis físicos y químicos: su aplicación en Agronomía. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp:108-125.
- Aleem A., J. Isar y A. Malik. 2003. Impact of long-term application of industrial wastewater on the emergence of resistance traits in *Azotobacter chroococcum* isolated from rhizospheric soil. *Bioresource Technology* 86:7-13.
- Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. 2a ed. John Wiley & Sons, Inc, USA. 472 p.
- Annunciado, T.R., T. H. D. Sydenstricker y S. C. Amico. 2005. Experimental investigation of various vegetable fibers as sorbent materials for oil spills. *Marine Pollution Bulletin* 50: 1340-1346.

- Arias-Trinidad, A. 2008. Evaluación toxicológica de suelos afectados por petróleo a partir de plantas y plántulas de frijol negro (*Phaseolus vulgaris* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco. 68 p.
- Banks, M.K., H, Mallede & K. Rathbone. 2003a. Rhizosphere microbial characterization in petroleum-contaminated soil. *Soil Sediment Contamination*. 12, 371–385.
- Banks, M.K., P. Kulakow, A. P. Schwab, Z. Chen y K. Rathbone. 2003. Degradation of Crude Oil in the Rhizosphere of *Sorghum bicolor*. *International Journal of Phytoremediation* 5(3): 225-234.
- Baran S., J. E. Bielińska y P. Oleszczuk. 2004. Enzymatic activity in an airfield soil polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons. *Geoderma* 118: 221-232.
- Bashan, L. E., J. P. Hernández, y Y. Bashan. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation: a comprehensive evaluation. *Applied Soil Ecology* 61: 171-189.
- Bautista Z., F. 1999. Introducción al Estudio de la Contaminación del Suelo por Metales Pesados. Universidad Autónoma de Yucatán. Yucatán, México. 109 p.
- Bello G., J. y A. L. De Cerain S. 2001. Fundamentos de Ciencia Toxicológica. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 349 p.
- Bohórquez-Echeverry, P. y C. Campos-Pinilla. 2007. Evaluación de *Lactuca sativa* y *Selenastrum capricornutum* como indicadores de toxicidad en aguas. *Revistas de la Facultad de Ciencias de la Universitas Scientiarum* 12(2): 83-98.
- Bordoloi, S., B. Basumatary, R. Saikia y H. Chandra D. 2012. *Axonopus compressus* (Sw.) P. Beauv. A native grass species for phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soil in Assam, India. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 87: 1335-1341.
- Botello, A. V. 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In: Botello, A. V., J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds). Golfo de México Contaminación Ambiental: Diagnostico y Tendencia. Univ. Autón. de Campeche, Univ. Autón. de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. pp: 264-265.*

- Botello, V. A. 1996. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In: Botello V. A., G J. L. Rojas, J. A. Benítez, L. Zarate (eds). Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. pp: 2003-2010.*
- Brady, C. N. y R. Weil R. 2002. *The Nature and Properties of Soils. 3a. ed. Prentice Hall, México. 960 p.*
- Buitrón M., G. y C. Carvajal M. 2009. Producción de hidrogeno a partir de aguas residuales. *Revista Digital Universitaria 10(6): 1-9.*
- Calabrese, E. J. y L. A. Baldwin. 1998. Hórmesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspectives. 106(1): 357-362.*
- Caneva, G., M. P. Nugari y O. Salvadori. 2000. *La Biología de la Restauración. 2a ed. Editorial NEREA. Andalucía, España. 274 p.*
- Capó M., M. A. 2007. *Principios de Ecotoxicología: Diagnóstico, Tratamiento y Gestión del Medio Ambiente. Editorial Tebar, España. 320 p.*
- Carballeira O., A. 2003. Efectos y vigilancia ecotoxicológica del vertido del Prestigio en Galicia. *In: Ramos C., P. (ed).VII Jornadas Ambientales, Residuos: Alternativas de Gestión. Ediciones Universidad de Salamanca, España. pp: 233-240.*
- Carrero, J. M. y S. Planes. 2008. *Plagas del Campo. 13a ed. Madrid, España. 775 p.*
- Castillo R., F. y M. D. Roldán R. 2005. *Biotecnología ambiental. Editorial Tebar. Madrid, España. 614 p.*
- Castillo-Rodríguez, F., M. D. Roldán Ruiz, R. Blasco P., M. J. Huertas R., F. J. Caballero D. C. Moreno-Vivián y M. M. Luque-Romero. 2005. *Biotecnología Ambiental. Editorial Tébar. Madrid, España. 616 p.*
- Cébron, A., J. Cortet, S. Criquet, A. Biaz, V. Calvert, C. Caupert, C. Pernin y C. Leyval. 2011. Biological Functioning of PAH-Polluted and termal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research Microbiology. 162(9): 896-907.*
- Cerón R., L., y L. M. Melgarejo M. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana 10; 5-18.*

- Chaney, R. L., Mallik, M., Li, Y. M., Brown, S.L., Brewer, E. P., Scott, J. A. & Baker J. M. A. (1997). Phytoremediation of soil metals. *Current Opinions Biotechnology*, 8, 279–284.
- Chávez-Crooker, P., A., Contreras V., A. Cavour C. y N. Garrido C. 2005. Capítulo IX- Microorganismos marinos y sus aplicaciones industriales: el potencial chileno en el mar. *In: Figueroa B., E. (ed). Biodiversidad Marina: Valoración, Usos y Perspectivas: ¿Hacia dónde va Chile? Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile. pp: 355-368.*
- Chirinos, I. M. Larreal y J. Díaz. 2010. Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un Oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 10(1): 133-140.
- Chi-Yuan, F. y S. Krishnamurthy. 1995. Enzymes for enhancing bioremediation of petroleum-contaminated soils: a brief review. *J. Air & Waste Manage. Assoc.* 45: 453-460.
- CICY, (Centro de Investigación Científica de Yucatán). 2012. http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=557 (Revisado Septiembre del 2012)
- Consuegra, G., R. C. 2006. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006, Suelos-hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría. SEMARNAT y Diario Oficial de la Nación. México. 27 p.
- Contreras B., F., J. Paolini y C. Rivero. 2005. Efecto de la adición de enmiendas orgánicas sobre la actividad de las enzimas de la fosfomonoesterasa ácida y arilsulfatasa en suelos del municipio Rivas Dávila (Estado Mérida). *Rev. Fac. Agron.* 31: 53-65.
- Cuervo P., L. E. 2001. Introducción al Derecho y la Política de Petróleos. Pontificia Universidad Javeriana. Colombia. 279 p.
- Cunningham, D. S & Berti, R.W. (1993). Remediation of contaminated soils with green plants: an overview. *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 29, 207-212.
- Cunningham, D. S., Anderson, T. A., Schwab, A. P., & Hsu, F. C. (1996). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*, 56, 55–114.

- Das, N. y P. Chandra. 2011. Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*. 2011: 1-13
- Delgadillo-López, A. E., C. A. González-Ramírez, F. Prieto-García, J. R. Villagómez-Ibarra y O. Acevedo-Sandoval. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 14: 597-612.
- Diab, E.A. 2008. Phytoremediation of oil contaminated desert soil using the rhizosphere effects. *Global Journal of Environmental Research* 2 (2), 66-73.
- Döbereiner, J., I. E. Marriel, and M. Nery. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Can. J. Microbiol.* 22:1464-1473.
- DOF , (Diario Oficial de la Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. *Diario Oficial de la Federación*. 31/12/2002. 2ª Sec. México. pp: 85.
- DOF , (Diario Oficial de la Federación). 2006. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006. *Diario Oficial de la Federación*. 12/10/2006. *Diario Oficial de la Federación*. México. pp: 27.
- DOF, (Diario Oficial de la Federación). 2010. NOM-138-SEMARNAT/SA1-2008 Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y las Especificaciones para su Caracterización y Remediación. *Diario Oficial de la Federación*. Lunes 23 de Agosto del 2010. 16 pp.
- Domènech, X. y J. Peral. 2006. *Química Ambiental de Sistemas Terrestres*. Editorial Reverté, España. 239 p.
- Dorantes A.R. 2010. Estudio comparativo de tres épocas del año en características químicas, plantas y organismos de suelo contaminado con petróleo en la Venta, Tabasco, México. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 146 p.
- Dushenkov, V., Kumar, P. B., Motto, H. y Raskin, I. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology* 29:1239-1245.
- EPA, (Environment Protection Agency). 1986. Method 418.1 mod. Petroleum hydrocarbons. Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency. Washington, DC. EEUU. 8 p.

- EPA, (Environment Protection Agency). 1996. Method 3540C Mod. Soxhlet Extraction. Washington, DC. USA. 8 p.
- España, M., B. Rodríguez, E. Cabrera y B. Cecanti. 2001. Actividades enzimáticas y contribución de residuos de cosecha de maíz al nitrógeno del suelo en sistema de labranza en los Llanos Centrales, Venezuela. *Terra Latinoamericana* 20:81-86.
- Espí, J. A. 2006. Análisis coste-beneficio ambiental (ACBA) aplicado a la remediación de acumulaciones de residuos sólidos de mina. *In: Rodríguez, R. y A. García C. (eds). Los Residuos Minero-Metalúrgicos en el Medio Ambiente: Serie Medio Ambiente No 11. Publicaciones del Instituto Geológico y Minero de España, España. pp: 519-230.*
- Espina, S y Vanegas, C. 1996. Ecotoxicología y Contaminación. *In: Botello, A.V., Rojas, G.J.L., Benítez, J.A y Zárate, L.D (eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche, México. pp: 69-106.*
- Fernández, C., M. Silva, J. C. Pereira, A. Mallia, M. J. Llobregat y V. Atomare. 2006b. Biodegradabilidad de las fracciones de resinas y asfáltenos por pseudomonas en suelo impactado con petróleo crudo mediano. *Ingeniería Universidad de Carabobo* 13(2): 7-13.
- Ferreiro P., J. 2006. Propiedades Bioquímicas de Suelos de Prado de Galicia. Tesis de Doctorado en Química. Universidad de Santiago de Compostela, Facultad de Farmacia. Santiago de Compostela, España. 521 p.
- Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón. 2007. Rizósfera: Interacción suelo, planta microorganismos *In: Ecología de la Raíz. Fuentes-Dávila, G. y R. Ferrera-Cerrato (eds). 2da ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A. C. Cd. Obregón, Sonora, México. pp:1-26.*
- Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcón, M. R. Mendoza-López, W. Sangabriel, D. Trejo-Aguilar, J. S. Cruz-Sánchez, C. López O. y J. Delgadillo-Martínez. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826.
- Figuroa de G., Y., S. Camero, J. L. Prin y R. Réquiz. 2008. Evaluación de la corrosión inducida por bacteria sulfato reductora en un acero inoxidable 316L. *Revista Latinoamericana de Metalurgia y Materiales* 28(1): 60-72.

- Figueruelo A., J. y M. Marino D. 2004. Química Física del Ambiente y de los Procesos Medioambientales. Editorial Reverté, España. 591 p.
- Flocco, C.G., Lobalbo, A., Carranza, M.P. & Giuletti, A. M. (2002). Removal of phenol by alfalfa (*Medicago sativa* L.) grown in hydroponics and its effect on some physiological parameters. *Acta Biotechnology*, 22, 43-54.
- Flores V., F. J., C. Agraz H. y D. Benitez P. 2007. Ecosistemas acuáticos costeros: importancia, restos y prioridades para su conservación. *In: Sánchez, O., M. Herzing, E. Peters, R. Márquez y L. Zambrano (eds). Perspectivas sobre Conservación de Ecosistemas Acuáticos en México. Instituto Nacional de Ecología. Hidalgo, México. pp:145-168.*
- Fontúrbel R., F. 2004. Uso de algunos parámetros indicadores microbiológicos y bioquímicos para la evaluación de la contaminación por hidrocarburos y la biodegradación de los mismos, en la zona de lago Titikaka (San Pedro de Tiquina, Bolivia). *Ecología Aplicada* 3(1, 2): 172-179.
- Fraume R., N. J. 2006. Abecedario Ecológico: la más Completa Guía de Términos Ambientales. Editorial San Pablo. Bogotá, Colombia. 326 p.
- Frick, C. M, Farrell, R. E., & Germida, J. J. 1999. Assessment of Phytoremediation as an in Situ Technique for Cleaning Oil Contaminated Sites. Petroleum Technology Alliance Canada: Calgary, Canada. 239 p.
- Fuentes Y., J. L. 2006. Iniciación a la Botánica. 2a ed. Ediciones Mundi-Prensa. México. 230 p.
- Galazka, A., M. Król y A. Perzynski. 2010. Bioremediation of crude oil derivatives in soils naturally and artificially polluted with the use of maize as the test plant Part I. PAHS degradation. *Acta Sci. Pol. Agricultura* 9(3): 13-24.
- Gallegos-García, M., L. B. Celis y E. Razo-Flores. 2010. Competencia por sustrato durante el desarrollo de biomasa sulfatorreductora a partir de un lodo metanogénico en un reactor UASB. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(2): 109-117.
- Garriz R., A. 2001. Tú y la Química. Pearson Educación, México. 848 p.
- Gary, J. H. y G. E. Handwerk. 2003. Refino de petróleo. Editorial Reverté. Sevilla, España. 408 p.
- Garza R., F., Y. Ortiz P., B. Macías A., C. García. y D. Coll. 2008. Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos. *Revista Latinoamericana de Recursos Naturales* 4(2): 49-54.

- Gawdzik, B. y J. Gawdzik. 2011. Impact of pollution with oil derivatives on the natural environment and methods of their removal. *Ecological Chemistry and Engineerings* 18(3): 345-357.
- Gianfreda, L., M. A. Rao, A. Piotrowska, G. Palumbo y C. Colombo. 2005. Soil enzyme activities as affected by anthropogenic alterations: intensive agricultural practices and organic pollution. *Science of the Total Environment* 341: 265-279.
- Gómez, M. I., H. E. Castro y D. Malagón. 2005. Interpretación de procesos redox en suelos sulfatados ácidos del distrito de riego del Alto Chicamocha, Boyocá. *Agronomía Colombiana* 23: 136-142.
- González C., S., M. Navarro G., J. I. López F. y C. Rad M. 2003. Determinación de la actividad arilsulfatasa del suelo. *In: García, C., F. Gil, T. Hernández y C. Trasar (eds). Técnicas de Análisis de Parámetros Bioquímicos en Suelos: Medida de Actividades Enzimáticas y Biomasa Microbiana. Editorial Mundi-Presa. Murcia, España. pp:85-90.*
- González-Chávez, M. del C. A. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *TERRA Latinoamericana* 23: 29-37.
- Guo, Y., X. Huo, K. Wu, J. Liu, Y. Zhang, X. Xu. 2012. Carcinogenic polycyclic aromatic hydrocabons in umbilical cord blood of human neonates from Guiyu, China. *Scienci of the total environment* 427-428: 35-40.
- Hernández A., E. 1997. Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosfericas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacán 12-A3. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduado - Campus Montecillo. Montecillo, Estado de México. 110 p.
- Hernández A., E., R. Ferrera-Cerrato y R. Rodríguez V. 2003. Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana* 21(1): 81-89.
- Hernández-Acosta, E., M. C. Gutiérrez-Castorena, J. E. Rubiños-Panta y J. Alvarado-López. 2006. Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana* 24(4): 463-470.
- Hernández-Rodríguez, C., I. Nería G. y J. M. Romero. 2006. Análisis comparativo del papel de diversas especies microbianas en la formación de biopelículas corrosivas en ductos de acero que transportan agua marina y crudo Maya. *Rev. Latinoam. Microbial* 48(2): 211-225.

- Hernández-Valencia, I. y Mager, D. 2003. Uso de *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con crudo de petróleo liviano. *Bioagro* 15(3): 149-156.
- Herrera A., J. M. 1961. Los aceites de petróleo como insecticidas y su empleo en los cultivos cítricos. *Revista Peruana de Entomología Agrícola* 4(1): 1-7.
- Herrera A., Y., P. M. Peterson y A. Cortés Ortiz. 2010. Gramíneas de Zacatecas, México. CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). Botanical Reserch Institute of Texas, USA. 250 p.
- Holguin, G., P. Vazquez, J. Sánchez, Y. López de los S., A. L. Flores-Mireles, L. M. Melgarejo, J. Vanegas, T. Galindo, A. Dávila-Lule, J. Polanía y M. Ruíz. 2011. Capítulo 5: Microbiología del manglar. *In: Félix P., E. F., E. Serviere Z., R. Riosmena R. y J. L. León de La L. (eds). Los manglares de la península de Baja California. Centro Interdisciplinario de Ciencias Marinas, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. y Universidad Autónoma de Baja California Sur. Distrito Federa, México. pp: 130-151.*
- Hopkins G., W y N. Hüner P. A. 2004. *Introduction to Plant Physiology*. 3a ed. John Wily & Sons, U.S.A. 560 p.
- Huang, X. D., Y. El-Alawi, D. M. Penrose, B. R. Glick y B. M. Greenberg. 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130: 453-463.
- IMP, (Instituto Mexicano del Petróleo). 2010. www.imp.mx/petroleo/?imp=comp (consultado Noviembre de 2010).
- IMP, (Instituto Mexicano del Petróleo). 2011. <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp> (Revisado: Septiembre, 2012).
- INE, (Instituto Nacional de Ecología). 2007. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/372/tecnolog.html> (Revisado: Octubre, 2012).
- Kandeler, E. y H. Gerber. 1988. Short-term assay of soil urease activity using colorimetric determination of ammonium. *Biology and Fertility of Soils* 6: 68-72.
- Kirk-Othmer, M. 2001. *Enciclopedia de Tecnología Química*. Editorial Limusa, México. 1494 p.

- Kleikemper, J., M. H. Schroth, W. V. Sigler, M. Schmucki, S. M. Bernasconi y J. Zeyer. 2002. Activity and diversity of sulfate-reducing bacteria in a petroleum hydrocarbon-contaminated aquifer. *Applied and Environmental Microbiology* 68(4): 1516-1523.
- Kuiper, I., E. L. Lagendijk, G. V. Bloemberg y B. J. J. Lugtenberg. 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17(1): 6-15.
- Labud, V., C. García y T. Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbons pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66: 1863-1871.
- Larenas P., G. y M. L. de Viana. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecología Austral* 15:177-181.
- León-García, G. J., E. Razo-Flores y F. J. Cervantes. 2007. Propiedades catalíticas del humus y su potencial aplicación en la degradación de contaminantes prioritarios. *Revista latinoamericana de Recursos Naturales* 3(2): 118-128.
- Leung, K. T., K. Nandakumar, J. Sreekumari, H. Lee y J. T. Trevors. 2007. Biodegradation and bioremediation of organic pollutants in soil. *In: Van Elsas, J. D., J. K. Jansson y J. T. Trevors (eds). 2a ed. Modern Soil Microbiology. Taylor & Francis Group. New York, USA. pp: 521-550.*
- Llaneza A., F. J. 2009. *Ergonomía y Psicología Aplicada: Manual para la Formación del Especialista*. 12a ed. Editorial Lex Nova. 574 p.
- López M., J. B., G. Quintero, A. L. Guevara V., D. C. Jaimes C., S. M. Gutiérrez R. y J. M. García. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova* 4(5): 82-90.
- López-Martínez, S., M. E. Gallegos-Martínez, L. J. Pérez-Flores y M. Gutierrez-Rojas. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 21(2): 91-100.
- Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap y P. D. Clark. 2009. *Brock. Biología de los Microorganismos*. 12a. ed. Pearson Educación, España. 1259 p.
- Maier, R. M. I. Pepper L. and C. Gerba P. 2000. *Environmental Microbiology*. Academic Press, U.S.A. 585 p.

- Maldonado-Chavez, E., M. C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes y D. J. Palma-López. 2010. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universiada y Ciencia Trópico Húmedo* 26(2): 121-136.
- Maldonado G., J. 2007. Pemex en Tabasco. Biblioteca Jurídica Virtual del Instituto de Investigaciones Jurídicas de la UNAM. México. 8 pp.
- Maletic, S. P., B. D. Dalmacija, S. D. Roncevic, J. R. Agbaba y S. D. Ugarcina P. 2011. Impact of hydrocarbon type, concentration and weathering on its biodegradability in soil. *Journal of environmental science and health, Part A* 46: 1042-1049.
- Maliszewska-Kordybach, B. y B. Smreczak. 2000. Ecotoxicological activity of soils polluted with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS): Effects on plants. *Environmental Technology* (21): 1099-1110.
- Manahan, E. S. 2007. *Introducción a la Química Ambiental*. Editorial Reverté, México. 725 p.
- Mantilla-Paredes, A. J., G. I. Cardona, C. P. Peña-Venegas, U. Murcia, M. Rodríguez y M. M. Zambrano. 2009. Distribución de bacterias potencialmente fijadoras de nitrógeno y su relación con parámetros fisicoquímicos en suelos con tres coberturas vegetales en el sur de la Amazonia Colombia. *Rev. Biol. Trop.* 57(4): 915-927.
- Margesin, R., A. Zimmerbauer y F. Schinner. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere* 40: 339-346.
- Martínez M., V. E. y F López S. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *TERRA Latinoamericana* 19: 9-17.
- Mastral, A. M. y M. S. Callen. 2000. A review an polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) emissions from energy generation. *Environ. Sci. Technol.* 34(15):3051-3057.
- Merkl, N., R. Schultze-Kraft y C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution* 165: 195-209.
- Mezzari, M. P., D. M. Hoffmann Z., H. X. Corseuil y A. Verzani N. 2011. Potential of grasses and rhizosphere bacteria for bioremediation of diesel-contaminated soils. *R. Bras. Ci. Solo.* 35: 2227-2236.

- Miranda-Martínez, M. C., J. Delgadillo-Martínez, A. Alarcon, R. Ferrera-Cerrato. 2007. Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizósfera del pasto alemán. *TERRA Latinoamericana* 25(1): 25-33.
- Mohsenzade, F., Nasser, S., Mesdaghinia, A., Nabizadeh, R., Zafari, D. & Chehregani, A. 2009. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: Pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 91(8) 1443-1453
- Mukerji K.G; Manoharachary C. y Singh J. 2006. *Microbial Activity in the Rhizosphere*. Ed. Gulf Professional Publishing. Leipzig, Germany. 349 p.
- Muratova, A., T. Hübner, N. Narula, H. Wand, O. Turkovskaya, P. Kusch, R. Jahn y W. Merbach. 2003. Rhizosphere microflora of plants used for the phytoremediation of bitumen-contaminated soil. *Microbial Research* 158: 151-161.
- Ingraham, J. L. y C. A. Ingraham. 1998. *Introducción a la microbiología Volumen 2*. Editorial Reverté. Barcelona, España. 751 pp.
- OCDE, (Organization for Economic Co-operation and Development). 1984. Test 208. Terrestrial plant test: seedling emergence and seedling growth test. *Guía técnica*. París, Francia. 21 p.
- Ochoa S., M., R. Madrigal P., M. Martínez T. y Y. Carreón A. 2010. Plantas, hongos micorrízicos y bacterias: su compleja red de interacciones. *Biológicas*. 12(1):65-71.
- Odum, E. P. y G. W. Barrett. 2006. *Fundamentos de Ecología*. 5a ed. Ediciones Thompson. México D.F. 598 p.
- Okolo, J. C., E. N. Amadi y C. T. I. Odu. 2005. Effects of soil treatments containing poultry manure on crude oil degradation in a Sandy loam soil. *Applied Ecology and Environmental Research* 3: 47-53.
- Olguín, E. J., M. E. Hernández y G. Sánchez-Galván. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 23(3): 139-154.
- Oliveira P., J. A., E. Afif K. y M. Mayor L. 2006. *Análisis de Suelos y Plantas y Recomendaciones de Abono*. Universidad de Oviedo. Asturias, España. 159 p.

- OMI, (Organización Marítima Internacional). 2005. Manual Sobre la Contaminación Ocasionada por los Hidrocarburos: parte IV, Lucha Contra los Derrames de Hidrocarburos. 2a ed. Northampton, Reino Unido. 226 p.
- ONU, (Organización de las Naciones Unidas). 2005. Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (SGA). United Nations Publications. New York, U.S.A. 560 p.
- Ortíz B., O., I. Ize L. y A. Gavilán G. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica* 69: 83-92.
- Ortíz, R., C. Siebe, G. Díaz y S. Cram. 2007. Fuentes de hidrocarburos en suelos orgánicos. *Terra Latinoamericana* 25: 105-113.
- Ortiz-González, D. P., F. Andrade F., G. Rodríguez N., L. C. Montenegro R. 2006. Biomateriales sorbentes para la limpieza de derrames de hidrocarburos en suelos y cuerpos de agua. *Revista Ingeniería e Investigación* 26(2): 20-27.
- Pao-Wen, G. L., 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration & Biodegradation* 65:1119-1127.
- Parra, M. A., R. Fernández-Escobar, C. Navarro y O. Arquero. 2002. Los Suelos y la Fertilización del Olivar Cultivado en Zonas Calcáreas. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid, España. 259 p.
- Pastor, J., A. Gutiérrez-Maroto y A. J. Hernández. 2003. Biomarcadores a nivel de una comunidad de pasto y de una población herbácea forrajera para suelos contaminados por cobre. *Anales de Biología* 25: 103-108.
- Pathak, H., K. Bhatnagar y D. P. Jaroli. 2011. Physico-Chemical Properties of Petroleum Polluted Soil Collected From Transport Nagar (Jaipur). *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences* 1(3): 84-89.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos). 2009. http://www.pemex.com/files/content/tabasco_0903271.pdf (Revisado: Agosto, 2012).
- Peña, W., C. Trasar-Cepeda, F. Gil-Sotres, y M. C. Leirós. 2007. Modification of the degradative capacity of a soil artificially contaminated with diesel. *Chemosphere* 67: 1057-1063.
- Peralta-Pérez, M. R. y T. L. Volke-Sepúlveda. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química* 11: 75-88.

- Pérez V., J., O. Anaya R., C. K. Chang S., I. L. Membrillo V. y G. Calva C. 2010. Producción de biosurfactantes por bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno crecidas en hidrocarburos. *Revista CENIC. Ciencias Químicas* 41:1-10.
- Pérez, E., P. Garrido, M. Laca. 2008. Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno. *Ecosistemas* 17(3): 133-138.
- Petrík, P., P. Soudek, D. Benešová, P. Najmanová, M. Najman, Tomáš Vaněk. 2009. Flora of toxic depots in selected industrial zones. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 78(4): 327-334.
- Phillips, T. M., D. Liu, A. G. Seech, H. Lee y J. T. Trevors. 2000. Monitoring bioremediation in creosote-contaminated soils using chemical analysis and toxicity tests. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 24:132-139.
- Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annual. Review of Plant Biology*, 56, 15-39
- Planas M., J. 1993. El estrés en los peces. *In: Castelló O, F. (Coord.). Acuicultura Marina: Fundamentos Biológicos y Tecnología de la Producción. Publicaciones de la Universidad de Barcelona, España. pp: 563-574.*
- Postgate, J. R. 1963. Versatile medium for his enumeration of sulfate-reducing bacteria. *Appl. Microbiol.* 11: 265-267.
- Prasad, M. N. V. y M. O. Freitas H. 2003. Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Journal of Molecular Biology & Genetics* 6: 276-312.
- Primo Y., E. 1995. *Química Orgánica Básica y Aplicada, Tomo II: de la Molécula a la Industria. Editorial REVERTÉ, Barcelona, España. 484 p.*
- Quiñones-Aguilar, E. E., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez y Alejandro Alarcón. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37: 585-594.
- Ramírez G., A. 2005. *Ecología Aplicada: Diseño y Análisis Estadístico. Fundación Universidad de Bogotá. Colombia. 313 p.*
- Ramírez M., A. G. 2012. Estado fenológico temprano de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp] Bacterias y actividad enzimática: Indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado. Tesis para obtener el grado de Maestra en Ciencias en

- Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados - Campus Tabasco. H. Cárdenas Tabasco. 127 p.
- Ramírez, M.E., Zapien, B., Zegarra, H.G., Rojas, N.G., Fernandez, L.C., 2009. Assessment of hydrocarbon biodegradability in clayed and weathered polluted soils. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63, 347–353.
- Reinhold, B., T. Hurek, I. Fendrik, B. Pot, M. Gillis, K. Kersters, D. Thielemans, J. de Ley. 1987. *Azospirillum halopraeferans* sp. novel a nitrogen fixing organism associated with roots of Kallar (*Leptochloa fusca* (L) Kunth). *Int. J. System. Bacterid* 37: 43-46.
- Rennie, R. J. 1981. A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can J. Microbiol.* 27(1):8-14.
- Repetto J., M. y G. Repetto K. 2009. *Toxicología Fundamental*. 4a ed. Editorial Díaz de Santos. Madrid, España. 620 p.
- Repetto, M. y P. Sanz. 1995. Fundamentos de ecotoxicología. *In*: Repetto, M. y A. Camean (eds). *Toxicología avanzada*. Ediciones Días de Santo, Madrid, España. pp: 147-204.
- Reyes, F., A. Lillo, N. Ojeda, M. Reyes y M. Alvear. 2011. Efecto de la exposición y la toposecuencia sobre actividades biológicas del suelo en bosque relicto del centro-sur de Chile. *Bosque* 32(3): 255-265.
- Rivera-Cruz, M. C, A. N. Trujillo, C. M. A. Miranda, C.E. Maldonado. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*, 30, 326-331.
- Rivera-Cruz, M. C. y A. Trujillo-Narcía. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29(7):369-376.
- Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volker H., R. Rodríguez V. y L. Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamericana* 20: 423-434.
- Rivera-Cruz, M. del C. 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y Cabezón (*paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el venzo(a)pireno. Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 348 p.

- Rivera-Cruz, M. del C. 2011. Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadores de perturbación causada por petróleo e inundación. *Agroregión* 5 (51): 12-15.
- Robertson, S. J., W. B. McGill, H. B. Massicotte y P. M. Rutherford. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews* 82: 213-240.
- Rosa, E. B., C. A. Bianco, S. E. Mercado y E. Gloria Scappini. 2005. Poáceas de San Luis: Distribución e Importancia Económica. Nueva Editorial Universitaria. San Luis, Argentina. 154 pp.
- Sacaca C., S. V. Iñiguez R. y M. Roulet. 2009. Diversidad y distribución de bacterias sulfato reductoras en sedimentos de lagunas de la cuenca Milluni contaminada por desechos mineros. *BIOFARBO* 17(2): 39-50.
- Salt, D. E., Smith, R. D. & Raskin I. 1998. Phytoremediation. *Annual Review Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49:643–68.
- Sánchez M., J. C. 2003. Conceptos Básicos de Ecotoxicología. *In*: Solís S., L. M. y J. A. López A. Principios Básicos de Contaminación Ambiental. Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México, pp: 279.
- Sánchez P., M. y E. D. Gómez I. L. 2007. Las Endomicorrizas: Expresión Bioedáfica de Importancia en el Trópico. Universidad Nacional de Colombia, Colombia. 352 p.
- Sangrabel, W., R. Ferrera-Cerrato, D. Trejo-Aguilar, M. R. Mendoza-López, J. S. Cruz-Sánchez, C. López-Ortiz, J. Delgadillo-Martínez y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22(2): 63-73.
- Schnoor L., J. 1997. Report Technology Evaluation: Phytoremediation. The University of Iowa, USA. 37 p.
- Seoánez C., M. 2000. Tratado de Reciclado y Recuperación de Productos de los Residuos. Grupo Mundi-Prensa. Madrid, España. 605 pp.
- Shann R., J. 1995. The role of plants and plant/microbial systems in the reduction of exposure. *Environ. Health Perspect.* 103: 13-15.
- Shen, G., Y. Lu y J. Hong. 2005. Combined effect of heavy metals and polycyclic aromatic hydrocarbons on urease activity in soil. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63(3): 474-480.

- Smith, M. J., T. H. Flowers, H. J. Duncan y H. Saito. 2011. Study of PAH dissipation and phytoremediation in soils: comparing freshly spiked with weathered soil from a former coking works. *Journal of Hazardous Materials*. 192(3): 1219-1225.
- Soleimani, M., M. Afyuni, M. A. Hajabbasi, F. Nourbakhsh, M. R. Sabzalian y J. H. Christensen. 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere* 81: 1084-1090.
- Solís S., L. M., y J. A. López A. 2003. *Principios Básicos de Contaminación Ambiental*. Universidad Autónoma del Estado de México, México. 397 p.
- Solís-Domínguez, F. A., M. C. González-Chávez, R. Carrillo-González y R. Rodríguez-Vázquez. 2007. Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. *Journal of Hazardous Materials* 141: 630-636.
- Sørense, J. y A. Sessitsch. 2007. Plant-Associated Bacteria: Lifestyle and Molecular Interactions. *In: Van Elsas, J. D., J. K. Janson, and J. T. Trevors. Modern Soil Microbiology. (eds) Modern soil microbiology. New York, pp: 211-236.*
- SPSS, (Statistical Package for Social Sciences). 2011. Version 20.0. SPSS Inc. Chicago, Illinois, USA.
- Stainier, Y. R., J. R. Villanueva, M. L. Wheelis y P. L. Painter. 2005. *Microbiología*. 2da. Ed. Editorial Reverté. Barcelona, España. 768 p.
- Steenhoudt, O. y J. Vanderleyden. 2000. Azospirillum, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.
- Steinmann W., V. 2008. Fascículo 154: Familia Gramineae. *In: Flora del Bajío y Regiones Adyacentes*. México. pp: 4-10.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1970. Arylsulfatase activity of soils. *Soil Science Society of America Proceedings* 34: 225-229.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1972a. Assay of urease activity in soils. *Soil Biol. Biochem.* 4: 479-487.
- Tabatabai, M. A. y J. M. Bremner. 1972b. Distribution of Total and Available Sulfur in Selected Soils and Soil Profiles. *Agronomy Journal* 4: 40-44.

- Tang, J., M. Wang, F. Wang, Q. Sun y Q. Zhou. 2011. Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 23(5) 845-851.
- Timmerman, M. D., L. G. Fuller y D. L. Burton. 2003. The effects of a crude oil spill on microbiological indices of soil biological quality. *Can. J. Soil Sci.* 83: 173-181.
- Tischer, S. 2005. Microbial biomass and enzyme activities on soil monitoring sites in Saxony-Anhalt, Germany. *Archives of Agronomy and Soil Science* 51(6): 673-685.
- Trindade, P. V. O., L. G. Sobral, A. C. L. Rizzo, S. G. F. Leite y A. U. Soriano. 2005. Bioremediation of a weathered and a recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere* 58: 515-522.
- Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M.C. y Maldonado C.E. (2006). Efecto de la restauración de suelos contaminados con petróleo en el suelo y en la vegetación en Tabasco, México. *In: Medio Ambiente en Iberoamérica. Visión desde la Física y la Química en los albores del Siglo XXI. Tomo III* (L.J.F. Gallardo Ed. y Coord.). Badajoz, España. pp. 353-361.
- Valbuena, O., J. C. Pereira, R. Daza, F. González, A. Hernández, M. Mora, G. Morales y L. Medina. 2010. Actividades sulfuroreductora y desulfurizadora por bacterias termófilas aisladas de lodos hidrotermales de las Trincheras, Venezuela. *Interciencia* 35(6): 414-420.
- Vallejo, M. M., C. R. Bonilla C. y L. A. Castilla. 2008. Evaluación de la asociación bacterias fijadoras de nitrógeno líneas interespecíficas de arroz-nitrógeno, en Typic Halplustalf. Ibagué, Colombia. *Acta Agron. (Palmira)* 57(1): 43-49.
- Vázquez-Luna, D., M. Castelán-Estrada, M. C. Rivera-Cruz, A. I. Ortiz-Ceballos y F. Izquierdo R. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 26(3): 183-191.
- Vázquez-Luna, M., A. Montiel-Flores, D. Vázquez-Luna y M. F. Herrera-Tenorio. 2011. Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems.* 13: 511-523.
- Velasco, J. A. y T. L. Volke S. 2003. El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta Ecológica* 66: 41-53.

- Vessey, K. J. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Vian O., A. 2006. *Introducción a la Química Industrial*. 2a ed. Editorial Reverté. Barcelona, España. 636 pp.
- Volke-Sepúlveda, T., J. A. Velasco T. y D. A. de la Rosa P. 2005. *Suelos* Velasco T., J. A. 2002. *Tecnologías de Remediación para Suelos Contaminados*. Instituto Nacional de Ecología. Distrito Federal, México. 61 p.
- Walkley A, Black I.A. 1934. An examinant ion of Degtjareff method for determining soil organic matter and a pro-posed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci.* 37: 29-38.
- Waller, G. R., M. C. Feng, y Y. Fujii. 2001. Análisis bioquímico de los metabolitos secundarios de plantas, microorganismos y suelo. *In: Anaya, A. L., F. Espinosa-García y R. Cruz-Ortega. (Coordns.). Relaciones Químicas entre Organismos: Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación*. Editorial Plaza y Valdés. Distrito Federal, México. pp: 163-178.
- Wang, X. y R. Bartha. 1994. Effects of bioremediation on toxicity, mutagenesis, and microbiota in hydrocarbon-polluted soils. *In: Wise, D. L. y D. J. Trantolo (eds). Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil*. New York. pp: 213-215.
- Wauquier, J. P. 2004. *El Refino del Petróleo: Petróleo Crudo, Productos Petrolíferos y Esquemas de Fabricación*. Ediciones Díaz de Santos. Distrito Federal, México. 462 pp.
- Wenzel W., W. 2009. Rhizosphere processes and management in plant-assisted bioremediation (phytoremediation) of soils. *Plant Soil* 321: 385-408.
- White, P. M., D. C. Wolf, G. J. Thoma y C. M. Reynolds. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution* 169:207-220.
- Wyszkowska, J., M. Kucharski y J. Kucharski. 2006. Application of the activity of soil enzymes in the evaluation of soil contamination by diesel oil. *Polish J. of Environ. Stud.* 15(3): 501-506.
- Xia, H. P. 2004. Ecological rehabilitation and phytoremediation with four grasses in oil shale mined land. *Chemosphere* 54: 345-353.

- Yarco, M. 2005. Los efectos de la contaminación: el caso de las sustancias tóxicas persistentes. *In: Sánchez, O., E. Peters, R. Márquez-Huitzil, E. Vega, G. Portales, M. Valdez y D. Azuara (eds). Temas sobre Restauración Ecológica. Instituto Nacional de Ecología (INE). D.F., México. pp: 231-244.*
- Yúfera P., E. 1996. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Editorial Reverté. Valencia, España. 795 p.
- Zavala, C. J. 1996. Impacto de las actividades petroleras sobre la hidrología superficial del distrito de Agua Dulce, Tabasco, México. *In: Botello, A. V., J. L. Rojas-Galaviz, J. A. Benítez y D. Zárate-Lomelí (eds). Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche, México. pp: 505-520.*
- Zavala-Cruz, J., F. Gavi-Reyes, R. H. Adams-Schroeder, R. Ferrera-Cerrato, D. J. Palma-López, H. Vaquera-Huerta, M. J. Domínguez-Ezquivel. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *TERRA Latinamericana 23(3): 293-302.*
- Zhuang, X., J. Chen, H. Shim y Z. Bai. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International 33: 406-413.*