



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

LOS SURFACTANTES COMO PRETRATAMIENTO A LA FITORREMEDIACIÓN DE UN GLEYSOL CON PETRÓLEO FRESCO EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO

MAGÍN GONZÁLEZ MOSCOSO

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2015

La presente tesis titulada "Los surfactantes como pretratamiento a la fitorremediación de un Gleysol con petróleo fresco en el Trópico Húmedo Mexicano", realizada por el alumno Magín González Moscoso, 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:



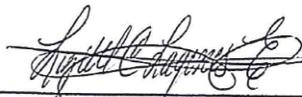
Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Asesor:



Dr. Julián Delgadillo Martínez

Asesora:



Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza

H. Cárdenas, Tabasco. 11 de Diciembre del 2015

La presente tesis titulada **Los surfactantes como pretratamiento a la fitorremediación de un Gleysol con petróleo fresco en el trópico húmedo mexicano**, se realizó en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, localizado en las instalaciones del *Campus* Tabasco, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. La tesis fue dirigida por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco.

El presente estudio fue financiado en su totalidad con cargo a las claves 40018 y 40019, apoyo a investigación científica, que el *Campus* Tabasco Colegio de Postgraduados, asigna a sus profesores investigadores y estudiantes.

LOS SURFACTANTES COMO PRETRATAMIENTO A LA FITORREMEDIACIÓN DE UN GLEYSOL CON PETRÓLEO FRESCO EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO

Magín González Moscoso

Colegio de Postgraduados, 2015

Se realizó un estudio durante 180 días en microtúnel con el objetivo de generar información básica de adaptación, recuperación biológica y química de suelos contaminados con petróleo fresco (PF), a partir de *Leersia hexandra* Swartz y Gleysol nativo de zona petrolera de La Venta, Tabasco, México. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con un arreglo factorial (5x3x2). Cinco dosis de hidrocarburos totales del PF (HTP's), 693 Biogénico, 4 000, 30 000, 60 000 y 90 000 mg kg⁻¹; tres dosis de surfactante no iónico Tween® 80 (polietileno glicol monooleato de sorbitan) (Tw) como tecnología química (QM), 0, 2.5 (QM1) 5% (QM2) y sin y con *L. hexandra*. Las combinaciones de los factores integraron seis tecnologías: Biorremediación microbiana natural (BM), fitorremediación (FR), BM+QM1, FR+QM1, BM+QM2 y FR+QM2. El petróleo (90 000 mg kg⁻¹) y 5% de Tw originó el aumento del número de plantas jóvenes en el macollo, la tasa de crecimiento, materia seca radical y volumen de raíz. Contrariamente, la materia seca foliar disminuyó en dosis altas de petróleo, pero aumentó con el Tw. Las seis tecnologías removieron HTP's, pero la tecnología BM+QM1 fue la mejor con 95% y relación positiva con bacterias heterótrofas. La fitorremediación usando *L. hexandra* demostró potencial para remover un 68% de HTP's, un 25% menos que BM+QM1, pero estimula a las bacterias hidrocarbonoclastas en la rizósfera. Se recomienda usar Tween® 80 para remover al PF de Gleysoles del sureste de México en corto tiempo, y la fitorremediación sin pretratamiento con Tween® 80 pero a mayor tiempo, se debe verificar los metabolitos químicos producto de la degradación.

Palabras clave: Bacterias, degradación, hongos, *Leersia hexandra* y polietileno glicol monooleato de sorbitan.

THE SURFACTANTS AS PHYTOREMEDIATION PRETREATMENT GLEYSOL WITH A FRESH PETROLEUM ON THE MEXICAN HUMID TROPICS

Magín González Moscoso

Colegio de Postgraduados, 2015

A study was conducted for 180 days in microtunnel in order to obtain basic information on adaptation, biological and chemistry recovery of soils contaminated with fresh petroleum (PF), using *L. hexandra* and Gleysol soil samples native of the petroleum zone of La Venta, Tabasco, México. A completely randomized design with a factorial arrangement (5x3x2) was established. Five doses of total hydrocarbons of PF (HTP's), Biogenic 693, 4000, 30 000, 60 000 or 90 000 mg kg⁻¹; three doses of nonionic surfactant Tween® 80 (polyethylene glycol sorbitan monooleate) (Tw) as chemical technology (QM), 0, 2.5 or 5% and without or with *L. hexandra*. The combinations of the factors integrated six technologies: Natural microbial bioremediation (BM), phytoremediation (FR), BM+QM1, FR+QM1, BM+M2 or FR+QM2. Petroleum (90 000 mg kg⁻¹) and 5% of Tw significantly increased the number of young plants at the tiller, the growth rate, root dry matter and root volume. Conversely, leaf dry matter significantly decreased at higher petroleum dose, although it increased with Tw. All six technologies removed HTP's, but the BM + Tw (2.5%) technology was the best with 95%, showing a positive relationship with heterotrophic bacteria. Phytoremediation using *L. hexandra* showed potential to remove 68% of HTP's, 25% less than BM + Tw, but this stimulated to the hydrocarbonoclastic bacteria in the rhizosphere. We recommend utilize Tween 80 to remove the Gleysols PF at Southeast México in a short time, and phytoremediation without pretreatment with Tween 80 but in a longer time. It is also recommended to monitor the degraded chemical metabolites.

Key words: Bacteria, degradation, fungi, *Leersia hexandra* and polyethylene glycol sorbitan monooleate

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento brindado para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, Responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, por brindarme sus conocimientos, tiempo, paciencia, apoyo y valiosa dirección de esta investigación

A la Dra. Luz del Carmen Lagunes Espinoza por sus acertadas correcciones y apoyo realizada para el desarrollo de la investigación y documento de tesis.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por su apoyo y sugerencias realizadas para el desarrollo de la investigación.

Al M.C. Antonio Trujillo Narcía por sus valiosos consejos, motivación y apoyo desde mi llegada al estado de Tabasco y durante los dos años de estudios de maestría.

A mi tío el Dr. Pedro Antonio Moscoso Ramírez por su ayuda en las traducciones al inglés de documentos de tesis y por apoyarme en cada momento.

A mis amigos de clases y del Laboratorio de Microbiología: Nímide y Alejandro, por su ayuda y por esos momentos de grata diversión y alegría.

A los estudiantes de la UPCh del servicio social: Eduardo, Cristian, Janet, Liliana, Ariana, Estefany, Azalea y Noé por su colaboración, trabajo y apoyo en las diferentes etapas de la investigación.

A mis amigos y compañeros durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados: Félix, Berenice, Leticia, Rebeca, María del Socorro, Juan Carlos, Jose, Wander, Raúl, Eduardo y Edna, por su amistad y por compartir momentos de trabajo y alegría.

A *Beatriz Garduza Acosta*. Por ayudarme en algunas etapas de mi investigación, por responder con sonrisas en cada día malo. Gracias por la convivencia en momentos de alegrías y tristezas. ***Dios te bendiga siempre.***

Gracias a todos.

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra” Claude Bernard.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi Dios todo poderoso por darme la vida y las bendiciones que han llegado con ella.

A mis Padres: José Alfredo González y Carlota Alicia Moscoso Ramírez, por su apoyo incondicional y consejos en cada momento de mi vida, ustedes son mi mayor orgullo, han pasado momentos difíciles pero siempre han salido adelante brindando una sonrisa, deseo que sepan que mi esfuerzo es inspirado en ustedes.

A mis hermanos: Carlos, Mercedes y José Alfredo, por bríndame su apoyo en cada momento, por ser parte de mi vida y por estar siempre unidos.

A la familia Moscoso Domínguez: a mis tíos Pedro Antonio Moscoso Ramírez y Bolivia Tila Domínguez de la Cruz, y a sus hijos David Antonio, Iván Alejandro y Estefanía Guadalupe. Por brindarme su apoyo desde mi llegada a Cárdenas, Tabasco; por su comprensión, valiosos consejos, ayuda y aprecio. **Dios los bendiga.**

En el pasar de mi vida he aprendido:

Que debo ser fuerte sin ser intolerante

Ser amable sin ser débil

Aprender con orgullo pero sin arrogancia

Aprender a ser gentil sin ser suave

Ser humilde sin ser tímido

Ser valioso sin ser agresivo

Ser agradecido sin ser servil

Meditar sin ser flojo

Por eso Dios te pido

Capacidad para retener

Método y la facultad para entender

Sutileza para interpretar

Gracia y abundancia para hablar

Dame acierto al empezar

Dirección al progresar

Y perfección al acabar.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
CAPÍTULO I	1
INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Introducción general	1
1.2. Objetivo general	5
1.3. Hipótesis general	5
1.4. Estructura general de la tesis	6
1.5. Literatura citada	7
CAPÍTULO II	13
REVISIÓN DE LITERATURA	13
2.1. Definición y características del petróleo	13
2.1.2. Hidrocarburos saturados	14
2.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	15
2.1.4. Asfáltenos.....	16
2.1.5. Resinas.....	17
2.2. La contaminación del suelo por petróleo fresco	17
2.2.1. Efectos del petróleo en las propiedades físicas del suelo	18
2.2.2. Efectos del petróleo en las propiedades químicas del suelo	18
2.2.3. Efectos del petróleo en la planta	19
2.2.4. Efectos del petróleo en la microflora del suelo	19
2.2.5. El petróleo en el suelo.....	20
2.3. Tecnología de remediación de suelos contaminados.....	20
2.3.1. Tecnología química	20
2.3.1.1. Importancia de los surfactantes en la remoción de petróleo.....	21
2.3.1.2. Origen de los surfactantes.....	22
2.3.1.3. Clasificación de los surfactantes	23
2.3.1.4. Propiedades de los surfactantes	24
2.3.1.5. Ventajas y desventajas de los surfactantes	25
2.3.2. Tween® 80	25
2.3.2.1. Proceso de emulsión inducido por el Tween® 80	27
2.4. Biorremediación microbiana natural de petróleo	27

2.5. La fitorremediación	29
2.5.1. Importancia de la rizosfera	31
2.6. Ruta de degradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos	32
2.7. LITERATURA CITADA	34
CAPÍTULO III	51
ANÁLISIS DE CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO VEGETAL DE <i>Leersia hexandra Swartz</i> EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO EN FUNCIÓN DE PETRÓLEO Y SURFACTANTE	51
3.1. RESUMEN	51
3.2. ABSTRACT	52
3.3. INTRODUCCIÓN	53
3.4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
3.5. RESULTADOS	59
3.5.1. Plantas jóvenes, longitud de estolones y tasa de crecimiento relativo	59
3.5.2. Concentración de pigmentos clorofilianos	62
3.5.3. Materia seca y volumen radical	64
3.6. DISCUSIÓN	68
3.6.1. Longitud de estolones, tasa de crecimiento relativo y número de plantas jóvenes	68
3.6.2. Pigmentos clorofilianos	71
3.6.3. Materia seca	72
3.7. CONCLUSIONES	74
3.8. LITERATURA CITADA	74
CAPÍTULO IV	84
ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA BIORREMEDIACIÓN NATURAL, QUÍMICA Y LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN UN GLEYSOL	84
4.1. RESUMEN	84
4.2. ABSTRACT	85
4.3. INTRODUCCIÓN	86
4.4. MATERIALES Y MÉTODOS	88
4.4.1. Características del suelo	89
4.4.2. Propiedades del petróleo y surfactante	89
4.4.3. Colecta y producción de plántulas	90
4.4.4. Diseño y configuración experimental	90
4.4.5. Variables evaluadas	92
4.4.5.1. Población de bacterias y hongos	92
4.4.5.2. Remoción de petróleo fresco	93
4.4.5.3. Biomasa del follaje y radical seca	93

4.4.6. Análisis estadístico	94
4.5. RESULTADOS	94
4.5.1. Poblaciones de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas	94
4.5.2. Poblaciones de hongos heterótrofos e hidrocarbonoclastas	96
4.5.3. Remoción de petróleo fresco	98
4.5.4. Producción de biomasa vegetal	101
4.6. DISCUSION	101
4.6.1. Microorganismos	101
4.6.2. Remoción	104
4.6.3. Materia seca	106
4.7. CONCLUSIONES	108
4.8. LITERATURA CITADA	109
CAPITULO V	120
CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES	120
5.1. Conclusiones generales	120
5.3. Recomendaciones.....	120
VI. APÉNDICES ESTADÍSTICOS	122
Apéndice A. Análisis de varianza de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de <i>Leersia hexandra</i> en suelos contaminados con petróleo fresco.....	122
Apéndice B. Análisis de varianza de las respuestas microbiológicas y químicas en suelos con planta (<i>Leersia hexandra</i>) y sin planta contaminados con petróleo fresco.....	132

ÍNDICE DE CUADROS

		Página
Cuadro 2.1.	Ventajas y desventajas de los surfactantes.....	26
Cuadro 2.2.	Características del surfactante Tween® 80.....	26
Cuadro 3.1.	Caracterización de tratamientos del experimento.....	57
Cuadro 3.2.	Análisis de varianza para longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ) y tasa de crecimiento relativo (TCR) de <i>Leersia hexandra</i> por efecto de dosis combinada de Tween® 80 e hidrocarburos totales del petróleo.....	59
Cuadro 3.3.	Longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ) y tasa de crecimiento relativo (TCR) de <i>Leersia hexandra</i> por efecto de dosis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) y de Tween® 80 (Tw).....	61
Cuadro 3.4.	ANDEVA de los factores HTP's y Tw para todos los pigmentos clorofilianos, materia seca y volumen radical en planta de <i>Leersia hexandra</i> a los 180 dds.....	64
Cuadro 3.5.	Concentración de pigmentos clorofilianos (Cl), materia seca (MS) y volumen radical (VR) de <i>Leersia hexandra</i> en dosis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) en función de la dosis de tween® 80 (Tw).....	65
Cuadro 3.6.	Correlación entre variables de la planta en respuesta a las dosis de HTP's y Tw.....	67
Cuadro 4.1.	Caracterización de los tratamientos de experimentales.....	91
Cuadro 4.2.	ANDEVA de tres factores (concentración de hidrocarburos totales del petróleo, dosis de Tween® 80 y tipo de tecnología) a los 180 días.....	95
Cuadro 4.3.	Poblaciones de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas en diferentes tecnologías de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo, a los 180 días.....	96
Cuadro 4.4.	Producción de la materia seca foliar y radical de <i>Leersia hexandra</i> a los 180 días por efecto de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo y la dosis de Tween® 80.....	102
Cuadro 4.5.	Correlación de Pearson's entre las variables de tecnologías de fitorremediación sin y combinadas con Tween® 80, remoción de hidrocarburos totales del petróleo, microorganismos y producción de <i>L. hexandra</i>	104
Cuadro 4.6.	Correlación de Pearson's entre las variables de tecnologías de biorremediación microbiana natural sin y con Tween® 80, remoción de hidrocarburos totales del petróleo y microorganismos.....	106

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco...	14
Figura 2.2. Estructura química del alcano: metano y etano.....	15
Figura 2.3. Estructura de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	16
Figura 2.4. Estructuras químicas de asfaltenos, que constituyen una clase de moléculas compuestas de anillos aromáticos, con cadenas de alcanos.....	16
Figura 2.5. Estructura química de resinas.....	17
Figura 2.6. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase.....	22
Figura 2.7. Clasificación de los surfactantes en cuanto a su carga iónica.....	24
Figura 2.8. Esquema de la posible ruta de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos.....	33
Figura 3.1. Número de plantas jóvenes de <i>Leersia hexandra</i> en suelo con petróleo fresco y pretratado con Tween® 80 a los 180 dds.....	63
Figura 3.2. Variación en la producción de materia seca radical y foliar de <i>Leersia hexandra</i> por efecto de dosis de Tw y de petróleo fresco a los 180 dds.....	68
Figura 4.1. Incorporación de petróleo crudo en el medio de cultivo en caja Petri b) colonias de hongos hidrocarbonoclastas crecidos en petróleo como fuente de carbono y energía.....	93
Figura 4.2. Poblaciones de hongos heterótrofos en diferentes tecnologías de recuperación de suelo contaminados con petróleo fresco, a los 180 días.....	97
Figura 4.3. Poblaciones de hongos hidrocarbonoclastas en diferentes tecnologías de recuperación de suelo contaminados con petróleo fresco, a los 180 días.	98
Figura 4.4. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo según los tratamientos, a los 180 días.....	99
Figura 4.5. Efecto de las tecnologías de recuperación de suelos contaminados con petróleo en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's).....	100

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. Introducción general

La industria petroquímica ha generado grandes problemas ambientales con repercusiones en el equilibrio ecológico y en la salud humana (INE, 2007). México cuenta con 9439 pozos en explotación, 232 plataformas marinas, ocho complejos petroquímicos, 36 plantas petroquímicas y seis refinerías. La producción de petróleo crudo reportada para México en 2012 fue de 2548 millones de barriles diarios (Mbd) (PEMEX, 2013). Esta producción también ha originado constantes derrames de petróleo que impactaron los ecosistemas aledaños, tan sólo durante 2012 sucedieron 370 emergencias ambientales (PROFEPA, 2012). Por ello en países productores como México, la extracción, el transporte y el procesamiento de hidrocarburos del petróleo origina la contaminación de extensas áreas de suelo y de volúmenes de agua (Gallegos-Martínez *et al.*, 2000; Banks *et al.*, 2003; García-Cuellar *et al.*, 2004). En el estado de Tabasco la contaminación con hidrocarburos del petróleo en el suelo ocurre desde hace 50 años debido a los derrames de los desperdicios de perforación acumulados en las presas de los pozos petroleros, por filtración de agua aceitosa y por rotura de los oleoductos (Trujillo-Narcía *et al.*, 2006). El petróleo contiene hidrocarburos tóxicos y cancerígenos (Dindar *et al.*, 2015), además son hidrofóbicos con capacidad de acumulación en el suelo y sedimento (Karthikeyan y Bhandari, 2001), lo que conduce a la disminución de la biodisponibilidad de estos contaminantes para la

sorción biológica (Luepromchai *et al.*, 2007). Esto ha llevado a la búsqueda de métodos sostenibles para la remediación de ambientes contaminados con hidrocarburos (Pizarro-Tobías *et al.*, 2015) de forma tal que puedan ser utilizados para la actividad agropecuaria o ecológica.

Existe una amplia gama de tecnologías de remediación de suelos. La tecnología química es una opción de eliminación de los hidrocarburos del petróleo, por lo general son técnicas que involucran reacciones de oxidación-reducción (redox) que convierten compuestos tóxicos o peligrosos a compuestos menos tóxicos o no peligrosos; menos móviles o inertes. Sin embargo, el uso de algunas sustancias químicas no mejoran la calidad de los suelos una vez que han sido restaurados (Trujillo-Narcía *et al.*, 2012). Es necesario buscar una tecnología química con efecto positivo en la calidad del suelo. Los surfactantes son compuestos químicos que incrementan la solubilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (COHs) a través de una fase micelar (hidrofílica/hidrofóbica), la cual propicia la desorción de los contaminantes del suelo hacia la fase líquida, lográndose así un incremento en la biodisponibilidad de los compuestos orgánicos hidrofóbicos (Volke y Velasco, 2003) en corto tiempo.

La remediación biológica es una tecnología que ha demostrado ser amigable con el ambiente, porque utiliza procesos metabólicos de bacterias y plantas nativas para la descontaminación. La biorremediación con bacterias, hongos y plantas nativas de los sitios contaminados tienen la ventaja que están adaptados a esas

condiciones ambientales (Pushpanathan *et al.*, 2014), y pueden usar como fuente de carbono y energía (Álvarez, 2015). Además esta técnica es limpia pero requiere de tiempos más prolongados para ser efectiva. En varias investigaciones han sido aislados e identificado bacterias y hongos de suelos contaminados con hidrocarburos, tal es el caso de las bacterias *Pseudomonas putida*, *P. aureginosa* y *P. etutzeri* (Puroshothaman, 2010; Zhang *et al.*, 2011; Abed *et al.*, 2014). Los hongos *Trichoderma* sp y *Mucor* sp han sido reportados como degradadores de petróleo crudo (Mollea *et al.*, 2005; Silva *et al.*, 2009). Entre las plantas tropicales adaptadas y bioestimuladoras de la remoción de hidrocarburos del petróleo se reportan a *Echinochloa polystachya* y *Brachiaria mutica* (Rivera- Cruz *et al.*, 2004; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

El uso de plantas estimuladoras de procesos de óxido-reducción de hidrocarburos se llama fitorremediación. Esta tecnología ha comprobado que es eficiente, sostenible y rentable (Robertson *et al.*, 2007; Pizarro-Tobias *et al.*, 2015), su éxito depende de la supervivencia, el crecimiento de las plantas en los sitios contaminados y de la capacidad de la rizosfera para promover la población microbiana (Cook y Hesterberg, 2013). No todas las plantas tienen la capacidad de tolerar y resistir contaminantes orgánicos, algunas se han adaptado a las condiciones de estrés mediante una red de sistemas de moléculas antioxidantes que reprimen o eliminan a aquellas moléculas que provocan el estrés oxidativo en la planta (Peralta-Pérez y Volke-Sepulveda, 2012). Las gramíneas, que incluye a los pastos, son los más utilizados en la fitorremediación debido al sistema radical

que les caracteriza, extenso y fibroso, pueden penetrar el suelo a una profundidad de hasta tres m (Aprill y Sims 1990). *Leersia hexandra*, *Brachiaria mutica* y *Lolium multiflorum* son algunos pastos que han sido utilizados por su capacidad de crecimiento y estimulación de la degradación de los hidrocarburos, demostrando buenos resultados hasta cierto nivel, debido a que en un tiempo de dos a seis meses remueven de 55 a 80 % del petróleo acumulado en el suelo (Arias-Trinidad *et al.*, 2012; Rivera-Cruz *et al.*, 2012; Cartmill *et al.*, 2014).

La integración de las diferentes tecnologías disponibles para recuperar el suelo de la contaminación en un mayor porcentaje y recuperar el potencial de uso como lo indica la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013), sería un gran avance en este sentido. Los ejes centrales de la tecnología química y biológica utilizada en la presente investigación se basa en el uso del surfactante no iónico Tween® 80 que ha demostrado ser efectivo en procesos de biorremediación y también es biodegradable (Torres *et al.*, 2006; Riojas *et al.*, 2011), además libera moléculas carbonadas no tóxicas para los microorganismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999). Otro elemento de nuestra propuesta es el uso del pasto *Leersia hexandra* nativo de fincas ganaderas que han recibido derrames crónicos de petróleo en el sureste de México (Trujillo *et al.*, 1990; Rivera-Cruz, 2004; Trujillo-Narcía *et al.*, 2006; Orocio, 2014). *Leersia hexandra* es un pasto semiacuatico, hidrofito, posee órganos asimiladores enraizados emergentes en el suelo (Seoáñez, 1999), que permanecen en el agua al menos durante seis meses al año y se usa como alimento para el ganado.

Por lo anterior, en la presente investigación se evaluó el potencial de dos tecnologías integradas, la surfactación y fitorremediación de petróleo fresco, para evaluar el nivel de adaptación de *L. hexandra* a diferentes dosis de petróleo fresco y del surfactante comercial Tween® 80, así como también probar la eficiencia de la combinación de las tecnologías de biorremediación microbiana natural, fitorremediación y químicas en la remoción de los hidrocarburos totales del petróleo.

1.2. Objetivo general

Evaluar el potencial de adaptación del pasto *Leersia hexandra* a suelos contaminados con petróleo fresco y el efecto combinado con un surfactante no iónico, para seleccionar la eficiencia de tecnologías integradas con Tween® 80, microorganismos nativos del suelo y el pasto *Leersia hexandra* que muestre mayor eficiencia en la descontaminación de hidrocarburos totales del petróleo.

1.3. Hipótesis general

Mientras mayor sean las dosis de petróleo crudo y de Tween® 80 a la que se expone el pasto *Leersia hexandra*, producirá mayor crecimiento y rendimiento de materia seca vegetal, lo que se verá acompañado de mayor eficiencia en la recuperación química y microbiológica del Gleysol contaminado con petróleo, respecto a la biorremediación microbiana natural y tecnología química.

1.4. Estructura general de la tesis

La tesis consta de cinco capítulos organizados de manera secuencial. El capítulo I es la introducción general, el capítulo II se refiere a la información científica que respalda la presente investigación; los capítulos III y IV contienen los resultados de experimentales efectuados en un microtúnel; por último, el capítulo V incluye las conclusiones generales y recomendaciones.

El capítulo II se titula **Revisión de literatura**, se refiere a las propiedades del petróleo fresco. Se menciona el efecto que causa el petróleo en el suelo y en la planta. Se explican las características de los surfactantes, de la biorremediación microbiana y de la fitorremediación en la recuperación de suelos contaminados con petróleo. Se explica la posible ruta metabólica de degradación de un hidrocarburo aromático.

El capítulo III se denomina **Análisis de crecimiento y rendimiento vegetal de *Leersia hexandra* en el trópico húmedo mexicano en función de petróleo y surfactante**. Son los resultados de un experimento realizado durante 180 días en invernadero con *Leersia hexandra*, se probaron cinco dosis de petróleo fresco y tres dosis de Tween® 80. Se realizaron evaluaciones fisiológicas y bioquímicas.

El capítulo IV se titula **Análisis comparativo de la biorremediación natural, química y fitorremediación de hidrocarburos del petróleo en un Gleysol**. Se evaluaron las bacterias y hongos heterótrofos e hidrocarbonoclastas, la remoción

de hidrocarburos en seis tecnologías de recuperación de suelos contaminados durante 180 días.

El capítulo V se denomina **Conclusiones generales y recomendaciones**. Se presentan las conclusiones generales de las diferentes actividades de experimentación realizadas en microtúnel y en laboratorio. Se recomiendan experimentos a corto, mediano y largo plazos, con *Leersia hexandra*, biorremediación natural y Tween® 80, a altas concentraciones de petróleo.

1.5. Literatura citada

Abed M. M. R., J. Al-Sabahi, F. Al-Maqrashi, A. Al-Habsi, and M. Al-Hinai. 2014.

Characterization of hydrocarbon-degradig bacteria isolated from oil-contaminated in the Sultane of Oman and evaluation in bioaugmentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 89: 58-66.

Aprill W., and R. C. Sims. 1990. Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*. 20. 253-265.

Arias-Trinidad A., M. C. Rivera-Cruz, L. A. Aceves-Navarro y R. Quintero-Lizaola.

2012. Pasto japonesa (*Leersia* sp) como especie fitorremediadora en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *En: Memoria XXXVII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Zacatecas, Zacatecas. pp. 55-62.

- Banks M. K., H. Mallede, and K. Rathbone. 2003. Rhizosphere microbial characterization in petroleum-contaminated soil. *Soil Sediment Contamination*. 12: 371-385.
- Cartmill A. D., D. L. Cartmill and, A. Alarcón. 2014. Controlled release fertilizer increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil. *International Journal of Phytoremediation*. 16: 285-301.
- Cook R. L., and D. Hesterberg. 2013. Comparison of trees and grasses for rhizoremediation of petroleum hydrocarbons. *International Journal of Phytoremediation*. 15: 844–860.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2013. NOM-138-SEMARNAT/SA1-2012. *Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo y la remediación*. Diario Oficial de la Federación. México, D.F. 10 septiembre 2013. 16 p.
- Dindar E., S.F.O. Topac, and H. S. Baskaya. 2015. Variations of soils enzyme activities in petroleum-hydrocarbon contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 105: 268-275.
- Gallegos-Martínez M., A. Gómez-Santos, L. González-Cruz, M. A. Montes de Oca-G., L. Yáñez-Trujillo, J. A. Zermeño-Eguía Lis, and M. Gutiérrez-Rojas. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Science & Technology*. 42: 377-384.
- García-Cuellar J. A., F. Arreguín-Sánchez, S. Hernández Vázquez y D. B. Lluch-Cota. 2004. Impacto ecológico de la industria petrolera en la sonda de

- Campeche, México, tras tres décadas de actividad: una revisión. *Interciencia*. 29: 311-319.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2007. Fuentes de contaminación en México. Consultado el 10 de octubre del 2015. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/372/fuentes.html>
- Luepromchai E., W. Lertthamrongsak, P. Pinphanichakarn, S. Thaniyavarn, K. Pattaragulwanit, and K. Juntongjin. 2007. Biodegradation of PAHs in petroleum contaminated soil using tamarind leaves as microbial inoculums. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*. 29: 515-527.
- Mollea C., F. Bosco, and B. Ruggeri. 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosm studies. *Chemosphere*. 60: 636–643.
- Orocio C. J. A. 2014. Evaluación de los hidrocarburos de petróleo intemperizado en Histosol de un manglar en La Venta, Tabasco. Tesis Licenciado Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco. 61 p.
- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2013. (Anuario estadístico 2013). Consultado el 19 de octubre del 2015. (http://www.pemex.com/ri/Publicaciones/Anuario%20Estadistico%20Archivo/s/anuario-estadistico-2013_131014.pdf).
- Peralta-Pérez M. del 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.

- Pizarro-Tobías P. J., L. Niqui, A. Roca, J. Solano, M. Fernández, F. Bastida, C. García, and J. L. Ramos. 2015. Field trial on removal of petroleum-hydrocarbon pollutants using a microbial consortium for bioremediation and rhizoremediation. *Environmental Microbiology Reports*. 7: 85–94.
- Pushpanathan M., S. Jayashree, P. Gunasekaran, and J. Rajendhram. 2014. Microbial bioremediation: A metagenomic approach microbial. *Biodegradation and Bioremediation*. 1: 407-419.
- Purushothaman A., P. Meenatchi, and N. Saravanan. 2010. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (toluene and xylene) by a bacterial strain isolated from petroleum contaminated site in Chennai. *Asian Journal of Bio Science*. 5: 206-210.
- Riojas H. H., P. Gortares, I. Mondaca y J. Balderas J. 2011. Aplicación de Tween 80 y D-Limoneno en la biorremediación de suelo contaminado con hidrocarburos. *ide@s CONCYTEG*. 6: 571-584.
- Rivera-Cruz M. C. 2004. Clasificación de suelos tropicales influenciados por derrames de petróleo en Tabasco. *Tecnociencia Universitaria* Vol. III (7): 6-25.
- Rivera-Cruz M. C., E. Maldonado-Chávez, and A. Trujillo-Narcía. 2012. Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and micronutrients in soil and plant. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15: 30-39.

- PROFEPA (Procuraduría Federal de Protección al Ambiente). 2012. Informe anual. Consultado el 20 de octubre del 2015. (http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/5322/1/iap_2012_260813.pdf).
- Robertson S. J., W. B. McGill, H. B. Massicotte, and P. M. Rutherford. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews*. 82: 213-240.
- Shcherbakova V. A., K. S. Laurinavichius, and V. K. Akimenko. 1999. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere* 39: 1861-1870.
- Silva S.I., M. Grossman, and R. L. Durrant. 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 224-229.
- Seoánez C. M. 1999. El Gran Diccionario del Medio Ambiente y de la Contaminación. Mundi-Prensa. Reimp. Madrid, España. 807 p.
- Torres L. G., J. L. Orantes, and R. Iturbe. 2006. Biodegradation of two nonionic surfactants used for in situ flushing of oil-contaminated soils. *Tenside Surfactant Detergents*. 43: 251-255.
- Trujillo N. A., J. Zavala C. y L. Bucio A. 1990. Evaluación de la contaminación por hidrocarburos aromáticos y metales pesados en los suelos del ejido La Ceiba, Huimanguillo, Tabasco. CEICADES. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. 43 p. + anexos

- Trujillo-Narcía A., M. C. Rivera-Cruz y E. Maldonado C. 2006. Efecto de la restauración de suelos contaminados con petróleo en el suelo y en la vegetación en Tabasco, México. *En: 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.
- Trujillo-Narcía A., M. C. Rivera-Cruz, L. C. Lagunes-Espinoza, D. J. Palma-López, S. Soto-Sánchez y G. Ramírez-Valverde. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28: 361-374.
- Volke S. T. y J. A. Velazco. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. pp. 3-29.
- Zhang Z., Z. Hou, C. Yang, C. Ma, F. Tao, and P. Xu. 2011. Degradation of n-alkanes and polycyclic aromatic hydrocarbons in petroleum by a newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* DQ8. *Bioresource Technology*. 102: 4111-4116.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Definición y características del petróleo

La palabra petróleo es una palabra castellana que viene del latín “petroleum” (petra: piedra y oleum: aceite), es decir aceite de piedra (Garritz, 2001). El petróleo es el resultado de la degradación anaeróbica de materia orgánica durante largos periodos de tiempo bajo condiciones de alta temperatura y presión, que la convierten en gas natural, crudo y derivados del petróleo (Vargas *et al.*, 2004). El petróleo fresco es aquel extraído recientemente del yacimiento subterráneo, contiene entre un 60 y 90% de las diferentes fracciones de hidrocarburos (Morales, 2007); además de cicloalcanos y aromáticos hay otros compuestos orgánicos minoritarios de N, O y S (IMP, 2014); así como pequeñas concentraciones de metales pesados como V, Ni, Pb y Fe (Kirk-Othmer, 2001). La composición química de un petróleo depende de su origen y antigüedad, siendo los crudos más antiguos los que poseen un mayor contenido de hidrocarburos volátiles (Domenech y Peral, 2006).

Existen tres tipos de petróleo crudo: ligero, mediano y pesado. Estos se caracterizan por su composición química (Dorn *et al.*, 1998): crudo ligero (86.7% saturados, 6.4% aromáticos, 0.7% polares), crudo mediano (56.4% saturados, 23.7% aromáticos, 14% polares) y crudo pesado (20.3% saturados, 28.9% aromáticos, 44.1% polares)

2.1.1. Composición química del petróleo

El petróleo crudo tiene cuatro formas estructurales en función de la solubilidad en solventes orgánicos: compuestos saturados, aromáticos, asfáltenos y resinas (Figura 2.1).

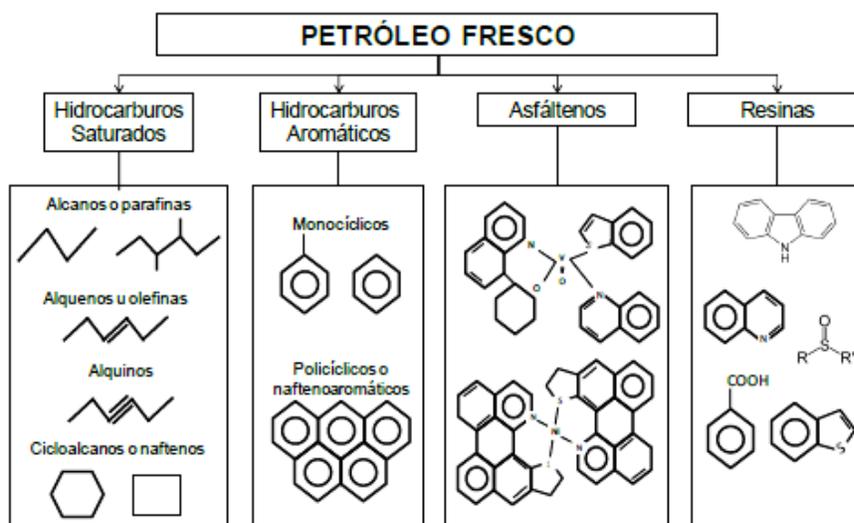


Figura 2.1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco

(Castillo-Rodríguez *et al.*, 2005).

2.1.2. Hidrocarburos saturados

Se les conoce como “saturados” porque los enlaces carbono-carbono son sencillos, son de cadena abierta porque las cadenas de átomos de carbono no se cierran en un ciclo (Figura 2.2). Estos hidrocarburos reciben también el nombre de alcanos o parafinas (Garritz y Chamizo, 1998).

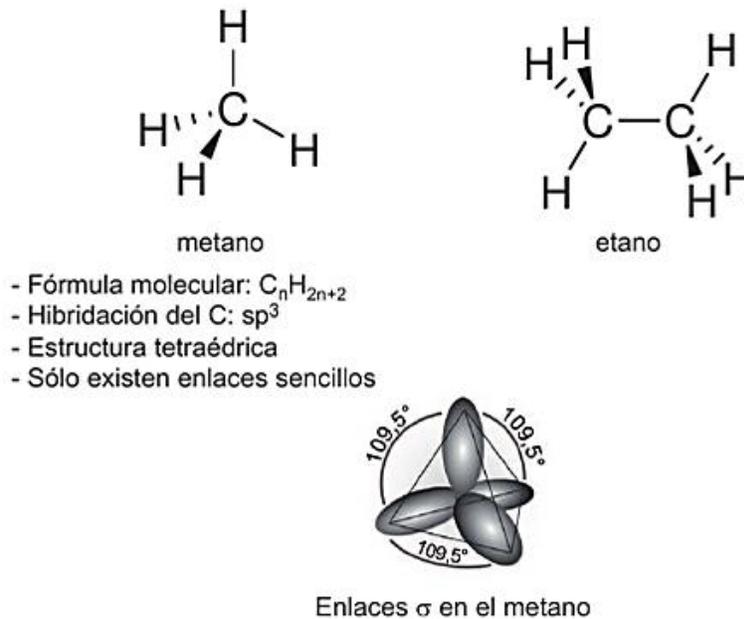


Figura 2.2. Estructura química del alcano: metano y etano

(Climent *et al.*, 2013).

2.1.3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los hidrocarburos aromáticos forman una gran familia de compuestos con un núcleo común, el núcleo bencénico (Yufera, 1996), que tiene la estructura de un anillo con tres dobles enlaces de carbono (C_6H_6) (Figura 2.3) (Leung *et al.*, 2007). El benceno es el más simple, y junto al tolueno, el etilbenceno y los tres xilenos, son conocidos como BTEX. Son relativamente solubles en agua, además poseen potencial contaminante elevado, especialmente el benceno que es cancerígeno (Eweis *et al.*, 1999). Los hidrocarburos con varios anillos aromáticos como el antraceno y fenantreno, son en general poco solubles en agua y poco volátiles, y los incrementos en la masa molecular y el número de anillos decrece aún más la volatilidad y solubilidad (Largo-Pereda, 2010).

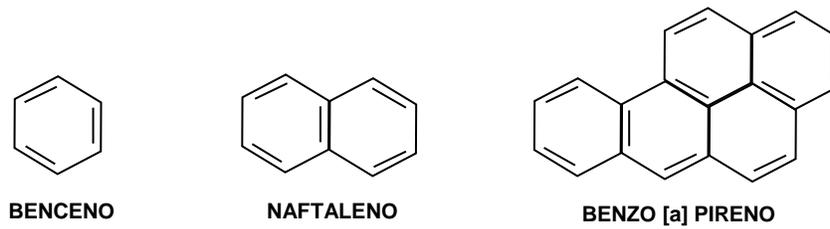


Figura 2.3. Estructura de hidrocarburos aromáticos policíclicos

(Vives *et al.*, 2001).

2.1.4. Asfáltenos

Los asfáltenos se consideran como los componentes de menor valor de un aceite crudo, ya que causan un marcado aumento de su viscosidad haciéndolo difícil de transportar y de procesar. Tienen un peso molecular aparente alto, que va desde 1000 hasta 20000 y un punto de ebullición por arriba de 540 °C. La estructura de los asfáltenos es una lámina formada por anillos poliaromáticos y compuestos heterocíclicos (Figura 2.4) (Centeno *et al.*, 2004).

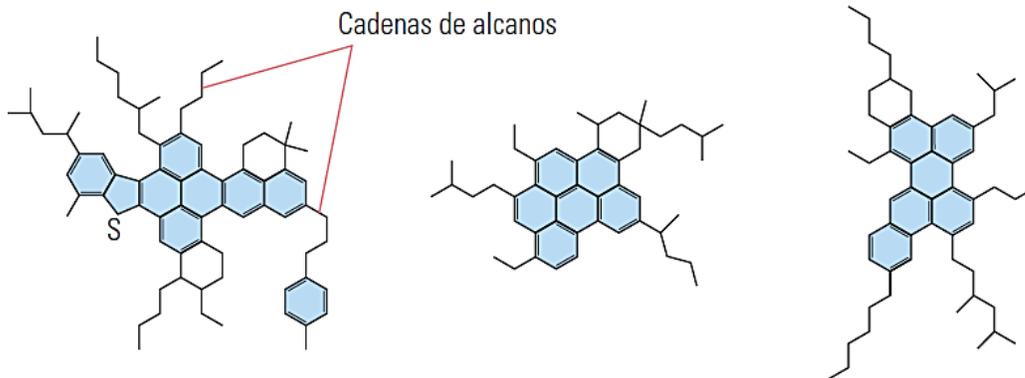


Figura 2.4. Estructuras químicas de asfaltenos, que constituyen una

clase de moléculas compuestas de anillos aromáticos, con

cadena de alcanos (Akbarzadeh *et al.*, 2007).

2.1.5. Resinas

Son agregados con una gran cantidad de estructuras policíclicas de alto peso molecular, tales como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y aminas (Leahy y Colwell, 1990). Las resinas son sustancias semilíquidas de color café oscuro a negro, tienen una gravedad específica alrededor de 1.0 y peso molecular de 500 a 2000 kg/kgmol (Marroquín, 2007). En la Figura 2.5 se muestra la estructura química de dos resinas.

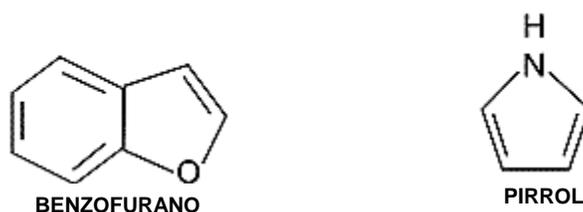


Figura 2.5. Estructura química de resinas (Largo-Pereda, 2010).

2.2. La contaminación del suelo por petróleo fresco

La contaminación del suelo se produce por la incorporación de cualquier tipo de energía, organismo o sustancia, que afecta sus características y modifique negativamente sus propiedades (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos (Zamora *et al.*, 2012), causan efectos importantes sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Martínez y López, 2001; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012).

2.2.1. Efectos del petróleo en las propiedades físicas del suelo

Cuando los hidrocarburos se acumulan o son absorbidos por la matriz del suelo, ocasionan la ruptura de los agregados del suelo, modifican su estructura (Ortínez *et al.*, 2003). La retención del agua disminuye a causa de las características no polares o de baja polaridad de los hidrocarburos, que al cubrir la superficie del suelo interrumpen la interacción electrostática entre las partículas del suelo y el agua (Adams *et al.*, 2008; Dorantes, 2008; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012). Las películas de petróleo existentes en la superficie del suelo, reducen la transmisión de luz y reducen el contenido de oxígeno (López *et al.*, 2006).

2.2.2. Efectos del petróleo en las propiedades químicas del suelo

De acuerdo a Ortínez *et al.* (2003) las propiedades químicas del suelo más afectadas por un derrame de hidrocarburos son: 1) aumento de carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable; 2) disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos; 3) aumento del manganeso y hierro intercambiable y 4) aumento del fósforo disponible. Sin embargo otros autores (Dorantes, 2008) reportan que el pH aumenta, de ácido a ligeramente alcalino; el contenido del carbono orgánico si aumenta, además el color del suelo cambia a más oscuro según los colores de Munsell. El contenido de fósforo (P) en suelos contaminados con petróleo puede variar en relación al tipo de petróleo y contenido de humedad (Dorantes, 2010).

2.2.3. Efectos del petróleo en la planta

La contaminación con hidrocarburos del petróleo fresco puede inhibir la germinación, inducir un inadecuado desarrollo y comportamiento radicular, provocando achaparramiento, clorosis y amorfismo en las hojas (Méndez-Natera *et al.*, 2004). También necrosis vegetal por intoxicación de compuestos aromáticos de bajo peso molecular, cuando estos dañan las membranas celulares de las raíces (Olguín *et al.*, 2007). La altura de planta, germinación, número de nódulos y producción de la biomasa (radical y foliar) son características fisiológicas sensibles a la toxicidad de los hidrocarburos (Ramírez, 2012). Otras como la concentración de clorofila también se ve disminuida (Cartmill *et al.*, 2014; Jajoo *et al.*, 2014).

2.2.4. Efectos del petróleo en la microflora del suelo

El efecto de los hidrocarburos del petróleo en los microorganismos ha sido reportado por diversos investigadores, coinciden en que un efecto es la disminución y/o aumento de la microflora según el tipo de petróleo y el tiempo de derrame en el sitio (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Rivera-Cruz, 2011; Guo *et al.*, 2012). Los compuestos del petróleo influyen en el número, composición, biomasa y actividad microbiana en el suelo (Wang y Bartha, 1994), se ha observado que las comunidades microbianas presentes en los suelos contaminados son bacterias tolerantes al compuesto tóxico presente en el ambiente, siendo capaces de utilizar el contaminante para su multiplicación y crecimiento. En este sentido, el contaminante desbalancea las comunidades biológicas del suelo (Contreras, 2005).

2.2.5. El petróleo en el suelo

Típicamente al ocurrir un derrame de petróleo en el suelo los hidrocarburos se redistribuyen, quedan atrapados dentro de los poros o es adsorbido en las superficies minerales y en la materia orgánica (Dorantes, 2010), iniciando una serie de procesos físicos y químicos simultáneos como evaporación y penetración (López *et al.*, 2006). Las fracciones de hidrocarburos volátiles se evaporan con rapidez y dejan los componentes aromáticos y alifáticos de cadena media a larga (Madigan *et al.*, 2009), los cuales quedarán expuestos a procesos de lixiviación, estabilización y degradación.

2.3. Tecnología de remediación de suelos contaminados

El término tecnología de remediación se refiere al uso de cualquier operación unitaria o conjunto de ellas, que altere la composición de un contaminante peligroso a través de acciones químicas, físicas o biológicas; de manera que reduzca su toxicidad, movilidad o volumen en la matriz, o en el material contaminado (Volke-Sepulveda *et al.*, 2005).

2.3.1. Tecnología química

El tratamiento químico del petróleo en el suelo se basa en la aplicación de una sustancia química con propiedad de separar a los hidrocarburos de la matriz. Incluye procesos de óxido-reducción, estabilización y emulsión (Volke y Velazco, 2002). Estos procesos inducen la conversión química de compuestos tóxicos o peligrosos a compuestos menos tóxicos, baja estabilidad, menos móviles y más biodisponibles. Los agentes oxidantes usados para tratar contaminantes

peligrosos en el suelo son el ozono, peróxido de hidrógeno, hipocloritos, cloro, dióxido de cloro y el reactivo de Fenton (peróxido de hidrógeno e hierro) (Volke y Velazco, 2002). Entre los agentes estabilizantes es común el uso de la cal ($\text{Ca}(\text{OH})_2$), y los agentes que generan una emulsión son los jabones y surfactantes (Salager, 2002).

2.3.1.1. Importancia de los surfactantes en la remoción de petróleo

Los surfactantes inducen una emulsión en la interfase agua-aceite. La emulsión permite la dispersión termodinámica inestable de dos o más líquidos inmiscibles, o parcialmente miscibles (Coutinho *et al.*, 2013). Aunque se traten de dispersiones termodinámicamente inestables, las emulsiones pueden convertirse en cinéticamente estables gracias a la presencia de agentes tensoactivos que presentan la capacidad de absorción en las superficies de las gotas. En la mayoría de las emulsiones una de las fases es acuosa y la otra es un aceite polar. Las emulsiones con el aceite como fase dispersa se conocen como emulsiones de aceite en agua (*oil-in-water*, o/w) y las emulsiones con agua como fase dispersa se conocen como emulsiones de agua en aceite (*water-in-oil*, w/o) (Aranberri *et al.*, 2006).

Los surfactantes combinan una molécula fuertemente hidrofóbica con un grupo fuertemente hidrofílico, con ello se adhieren en la interfase entre un medio acuoso y otra fase que puede ser aire, aceite o partículas (Figura 2.6). Si el surfactante está dentro de la fase acuosa, su grupo polar puede estar rodeado de moléculas

de agua (solvatación). Si el surfactante está disuelto en una fase oleíca, su grupo apolar posee interacciones con el solvente (Celik *et al.*, 2008).

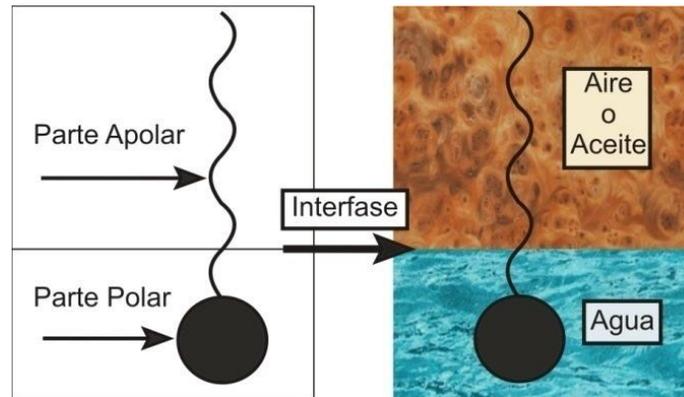


Figura 2.6. Ubicación de la molécula de surfactante en la interfase (Riojas *et al.*, 2010).

El grupo hidrofóbico por lo regular es un hidrocarburo (R) con 10 o 20 carbonos (Jiménez, 2001). Esta afinidad por las interfaces es lo que le otorga sus principales características: disminuir la tensión superficial y aumentar la solubilidad (Raiger y López, 2009).

2.3.1.2. Origen de los surfactantes

Los surfactantes son sintetizados químicamente o bien por algunos microorganismos. En este último caso, se les denomina como biosurfactantes. Estos compuestos incrementan la solubilidad de los COHs (compuestos orgánicos hidrofóbicos adsorbidos) a través de una fase micelar (hidrofílica/hidrofóbica), la cual propicia la desorción de los contaminantes del suelo hacia la fase líquida. Lográndose así un incremento en la biodisponibilidad de los COHs (Volke y

Velasco, 2003). Así, los surfactantes mejoran la absorción y biodisponibilidad de los hidrocarburos al aumentar su solubilidad y la dispersión (Cheng y Wong, 2006).

2.3.1.3. Clasificación de los surfactantes

Los surfactantes según su grupo iónico pueden ser polar y apolar.

Surfactantes aniónicos. Son sales de sodio que ionizados producen Na^+ más una carga negativa, el ión surfactante activo. Los más comunes son el sulfonato de alquilo lineal y el sulfato de alquil benceno (Ramos *et al.*, 2003).

Surfactantes catiónicos. Son compuestos cuaternarios de hidróxido de amonio que presentan actividad antimicrobiana por lo que se usan como desinfectantes (Ramos *et al.*, 2003).

Surfactantes no iónicos. En solución acuosa no forman iones, ya que su parte hidrofílica está formada por grupos polares no ionizados como: alcohol, tiol, éter o ester (Figura 2.7). Una gran parte de estos surfactantes son fenoles etoxilados (Salager y Fernández, 2004).

Surfactantes zwitteriónicos. Estos agentes tensoactivos contienen cargas positivas y negativas en la misma molécula, dándole características de moléculas neutras sin contra-iones (Aramberri *et al.*, 2006).

Los surfactantes no iónicos suelen tener menor toxicidad, mayor biodegradabilidad y valores bajos de concentración micelar crítica (CMC), por lo tanto son los más recomendados para mejorar la eficiencia de remoción (Chu, 2003). Los

surfactantes catiónicos no son adecuados en la remediación debido a su toxicidad. Igualmente los aniónicos no son recomendables debido a que pueden formar precipitados con cationes y reducir la conductividad hidráulica del suelo mediante el bloqueo de los poros (Sun *et al.*, 1995).

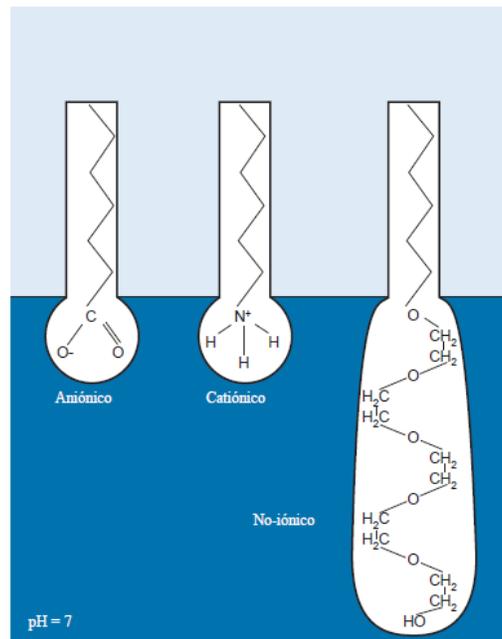


Figura 2.7. Clasificación de los surfactantes en cuanto a su carga iónica (Riojas *et al.*, 2011).

2.3.1.4. Propiedades de los surfactantes

Las propiedades de un surfactante son caracterizadas principalmente por cuatro parámetros: concentración micelar crítica (CMC), número de agregación (n_a), balance hidrofílico-lipofílico (HLB) y punto de nube (PN). Estos parámetros indican el potencial del surfactante como agente emulsificante (Jiménez *et al.*, 2010).

Concentración micelar crítica (CMC): es la concentración mínima para que el surfactante forme agregados llamados micelas, los cuales son responsables de las propiedades de solubilización y de detergencia (Riojas *et al.*, 2010).

Número de agregados (n_a): indica el promedio de moléculas de tensoactivo que se encuentran formando las micelas. Los agregados micelares están conformados generalmente de 20-100 monómeros (Jiménez *et al.*, 2010).

Punto de nube (PN): se define como la temperatura a la cual el tensoactivo (generalmente no iónico) pierde su solubilidad en una solución acuosa, la cual a nivel macroscópico presenta una apariencia turbia; es decir, en forma de nube (Kim y Shah, 2002).

Balance hidrofílico-lipofílico (HLB): es un valor que representa la capacidad de un tensoactivo para formar emulsiones estables en sistemas agua-aceite o aceite-agua (Jiménez *et al.*, 2010).

2.3.1.5. Ventajas y desventajas de los surfactantes

En el Cuadro 2.1 se muestran las ventajas y desventajas del uso de los surfactantes en la limpieza de los suelos con petróleo. Es evidente que existen más ventajas que desventajas para el ambiente. Entre las ventajas sobresale la solubilidad y biodisponibilidad del contaminante, la biodegradabilidad y la mejora de la degradación.

2.3.2. Tween® 80

El Tween® 80 es un surfactante no iónico que tiene una baja concentración micelar crítica (Cuadro 2.2) (Moreno-Medina, 2011). El Tween® 80 es altamente

biodegradable (Ghosh, 1997). Se degrada alrededor de 45 % en 168 h (Torres *et al.*, 2006). Además tiene menor efecto de toxicidad para los microorganismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999). El Tween® 80 incrementa en gran medida la biodegradación de hidrocarburos (Fransetti *et al.*, 2008).

Cuadro 2.1. Ventajas y desventajas de los surfactantes

Ventajas	Referencia	Desventajas	Referencia
Aumento de solubilidad y biodisponibilidad.	Riojas <i>et al.</i> (2010); Cheng y Wong (2006)	Su toxicidad y los efectos suelen ser más tóxicos que los compuestos originales.	Kim <i>et al.</i> (2005)
Mejora la degradación de hidrocarburos.	Volkering <i>et al.</i> (1998)	Degradación preferencial del surfactante, puede disminuir la degradación del contaminante.	Tiehm (1994)
Algunos son biodegradables.	Torres <i>et al.</i> (2006)	La degradación del surfactante reducirá el efecto de la biodisponibilidad.	Oberbremer <i>et al.</i> (1990)
Se podrían utilizar como sustrato primario cuando el contaminante se degrada.	Volkering <i>et al.</i> (1998)		

Cuadro 2.2. Características del surfactante Tween® 80.

Nombre comercial	Tween 80
Nombre químico	Monooleato de polioxietileno sorbitan
Peso molecular (g mol ⁻¹)	1309.67
Densidad (mg L ⁻¹)	1.064
CMC (mg L ⁻¹)	15
HLB	5
Tipo	No-iónico

CMC: Concentración micelar crítica, HLB: balance lipofílico-hidrofílico, por sus siglas en inglés (Lee *et al.*, 2005).

2.3.2.1. Proceso de emulsión inducido por el Tween® 80

El comportamiento combinado de dos líquidos inmiscibles, como el aceite y el agua, ocasionan una formación de emulsiones en los tratamientos de los suelos (Riojas *et al.*, 2011). Las tecnologías químicas que utilizan surfactantes, como el Tween® 80, provocan mayor emulsificación que, a su vez, mejora la solubilización de aceite en las micelas del surfactante (Deshpande *et al.*, 1999). Esto se debe al balance hidrofílico-lipofílico del surfactante que con valores entre 4 y 6 de HLB forma emulsiones (Torres y Zamora, 2002), y el Tween® 80 en este caso tiene 5 de HLB (Cuadro 2.2). Los surfactantes además de limpiar el ambiente, también contribuyen en forma importante en disponer de moléculas carbonadas (Ghosh, 1997). La emulsificación del surfactante puede aumentar el metabolismo microbiano con el hidrocarburo, puede incrementar la actividad enzimática microbiana o bien facilitar el transporte del sustrato orgánico de las células microbianas (Hadirabata y Tachibana, 2009).

2.4. Biorremediación microbiana natural de petróleo

Las técnicas de biorremediación de suelos contaminados con petróleo se basan en el metabolismo y la mineralización de los hidrocarburos del petróleo (Lin *et al.*, 2009). La biorremediación microbiana natural es la utilización de microorganismos nativos que transforman diferentes compuestos tóxicos en otros de menor impacto ambiental. Las bacterias son las más empleadas en el proceso de biorremediación, le siguen los hongos, algas, cianobacterias y actinomicetos (Torres-Rodríguez, 2003). El uso de microorganismos nativos en la

biorremediación de los sitios contaminados tienen la ventaja de que están adaptados a las condiciones ambientales (Pushpanathan *et al.*, 2014),

Los microorganismos degradadores u oxidantes de hidrocarburos crecen rápidamente sobre la superficie del petróleo y la actividad es más intensa si las condiciones ambientales, como temperatura y nutrientes orgánicos y principalmente N y P, se encuentran disponibles (Madigan *et al.*, 2009). Tienen mayor facilidad de vivir en el medio y utilizan como fuente de carbono y energía al contaminante (Álvarez, 2015). Las enzimas producidas por los microorganismos del suelo están involucradas en la transformación catalítica de contaminantes orgánicos, lo cual es crucial en la biodegradación (Huang, 2004). La degradación de estos contaminantes implica procesos de óxido-reducción, en la cual actúan principalmente las enzimas oxigenasas, deshidrogenasas y ligninolíticas (Haritach y Kaushik, 2009), mediante las cuales los microorganismos pueden oxidar los hidrocarburos hasta CO₂ y agua (Madigan *et al.*, 2009).

Diversos estudios mencionan diferentes grupos de bacterias y hongos que utilizan, como fuente de carbono y energía, a los hidrocarburos del petróleo en el suelo. Las bacterias incluyen *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pumilus* y *Pseudomona* sp (Bento, 2005), *Entorobacter* sp (Zhang *et al.*, 2010), *Pseudomonas putida* (Purushothaman, 2010); *P. stutzeri*, *Alcanivorax venustensis* (Abed *et al.*, 2014), *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium amycolatum* (Ibrahim *et al.*, 2015). Entre los hongos que crecen en petróleo y tienen la capacidad de degradarlo se han reportado *Fusarium* sp (Potin *et al.*, 2004),

Trichoderma sp (Mollea *et al.*, 2005), *Cladosporium* sp (Salvo *et al.*, 2005), *Aspergillus sydowii*, *Rhizopus* sp, *Penicillium funiculosum* (Mancera-López *et al.*, 2008), *Mucor* sp, *Aspergillus* sp, *Trichocladium canadense* y *Fusarium oxysporum* (Silva *et al.*, 2009).

2.5. La fitorremediación

La fitorremediación es una tecnología que utiliza las plantas verdes, microorganismos rizosféricos y técnicas agronómicas para degradar o transformar los contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos o menos móviles (Cunnigham *et al.* 1996; Salt *et al.*, 1998; Pilon-Smits 2005). También se ha definido como una aplicación tecnológica sustentable, de bajo costo y efectiva, que utiliza plantas con capacidad para crecer en suelos contaminados con petróleo y bioestimular la degradación de moléculas orgánicas en la zona radical (Robertson *et al.*, 2007). Mediante la fitorremediación las plantas llevan a cabo reacciones químicas, utilizando luz solar para metabolizar o mineralizar las moléculas orgánicas en el suelo (Olguín *et al.*, 2007), a partir de mecanismos como fitoextracción, rizofiltración, rizodegradación, fitoestimulación, fitoestabilización, fitovolatilización y fitodegradación (López-Martínez *et al.*, 2005). También las plantas tienen la capacidad de estabilizar al contaminante y no permiten que se traslade a otros espacios. El uso de las plantas actúa positivamente sobre el suelo mejorando sus propiedades físicas y químicas y se puede aplicar *in situ* y *ex situ* (Shaw y Burns, 2003).

Fitoextracción: se refiere a la concentración y translocación del contaminante, a través de las raíces, hacia diferentes partes de la planta (Volke-Sepúlveda *et al.*, 2005).

Rizofiltración: se refiere al proceso utilizado por las plantas para eliminar del medio hídrico el contaminantes a través de la raíz (Dushenkov *et al.*, 1995).

Rizodegradación: este mecanismo se refiere a la degradación de contaminantes orgánicos por acción de interacciones planta-microorganismos en la región de la rizósfera (Muñoz-Castellano *et al.*, 2010).

Fitoestimulación: las plantas generan exudados radiculares que estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos capaces de degradar compuestos orgánicos xenobióticos (Lopez-Martinez *et al.*, 2005).

Fitoestabilización: permite inmovilizar contaminantes en el suelo a través de su absorción y acumulación en las raíces, o bien, por precipitación en la zona de la rizósfera; este proceso reduce la movilidad de los contaminantes y evita su migración a las aguas subterráneas o al aire (Méndez y Maier, 2008).

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

Fitodegradación: consiste en el metabolismo de los contaminantes dentro de los tejidos de la planta, a través de enzimas que catalizan su degradación (Velazco y Volke, 2003).

La fitorremediación tiene como premisa principal el uso de plantas con capacidad de tolerar contaminantes. Los pastos han sido estudiados para restaurar suelos, porque producen una red de raíces que llegan hasta 2.7 m de profundidad (Gould y Shaw, 1992), que estimulan el crecimiento poblacional de microorganismos en su rizósfera, muchos de los cuales utilizan los hidrocarburos contaminantes como fuente de carbono y energía (Álvarez, 2015). Entre los pastos que han demostrado capacidad para fitorremediación se encuentran los siguientes: *Festuca arundinacea* (Huang *et al.*, 2004), *Echinochloa polystachya* (Rivera-Cruz *et al.*, 2004), *Brachiaria brizantha* (Merkl *et al.*, 2005), *Cynodon dactylon* (White *et al.*, 2006), *Lolium perenne* (Issoufi *et al.*, 2006) *Brachiaria mutica* (Maldonado-Chávez *et al.*, 2008), *Festuca pratensis* Huds (Soleimani *et al.*, 2010), *Festuca rubra* (Smith *et al.*, 2011), *Leersia hexandra* (Arias-Trinidad *et al.*, 2012) y *Lolium multiflorum* (Cartmill *et al.*, 2014).

2.5.1. Importancia de la rizosfera

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 rizosfera se define como un volumen de suelo, inmediato a la raíz en el la población de microorganismos está condicionada, tanto cuantitativa como cualitativamente, por la presencia de las raíces en la planta. Es una zona de actividad biológica intensa con una transferencia importante de agua y nutrientes (Porta *et al.*, 2003). Los microorganismos que habitan en la rizosfera juegan un papel importante en la

degradación de la materia orgánica. Los metabolitos generados de esta degradación son absorbidos por las plantas junto con nitrógeno, fósforo y otros minerales (Garbisu *et al.*, 2007).

El efecto rizosfera y la interacción planta-bacteria ocurren en el hábitat ecológico de la raíz, donde la dinámica poblacional microbiana es altamente influida por ese órgano vegetal (Peña-Castro *et al.*, 2006). Este efecto se debe a que las raíces de las plantas excretan nutrientes y agentes antimicrobianos que inhiben el crecimiento de algunos microorganismos pero no de otros. De esta manera, los microorganismos de la rizosfera benefician a la planta (Ingraham e Ingraham, 1998). Algunos de estos microorganismos utilizan los exudados de las raíces como fuente de energía para fijar gran cantidad de nitrógeno (Atlas y Bartha, 2002). La rizosfera crea un mejoramiento de las propiedades físicas y químicas de los suelos contaminados mediante la aireación e introducción de nutrimentos por la penetración radical, lo que fomenta la riqueza y diversidad microbiológica del suelo, en consecuencia existen más microorganismos y mayor degradación de hidrocarburos del petróleo (Shaw y Burns, 2003).

2.6. Ruta de degradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos

La posible ruta de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos inicia con una reacción catalizada por la enzima di-oxigenasa (Camacho-Morales *et al.*, 2010). Los electrones del NADH se transfieren a través de los diferentes componentes de la enzima para incorporar dos átomos de oxígeno en el anillo aromático (Haddock

et al., 1997), se forma di-hidroxi-dihidro-diol seguido por una reacción de deshidrogenación por una di-hidroxi-diol deshidrogenasa para obtener di-diol (catecol) con sustituyentes; sustratos que facilitan la ruptura del anillo aromático por otras oxigenasas. Tal es el caso de la enzima didiol 1,2-dioxigenasa, la cual empieza a oxidar al didiol hasta cis,cis-muconato, después una enzima lactonizante produce muconolactona que a su vez es convertida en β -ceto adipato enol lactona mediante una isomerasa, para posteriormente convertirse en β -ceto adipato (Parés y Juárez, 1997) (Figura 2.8).

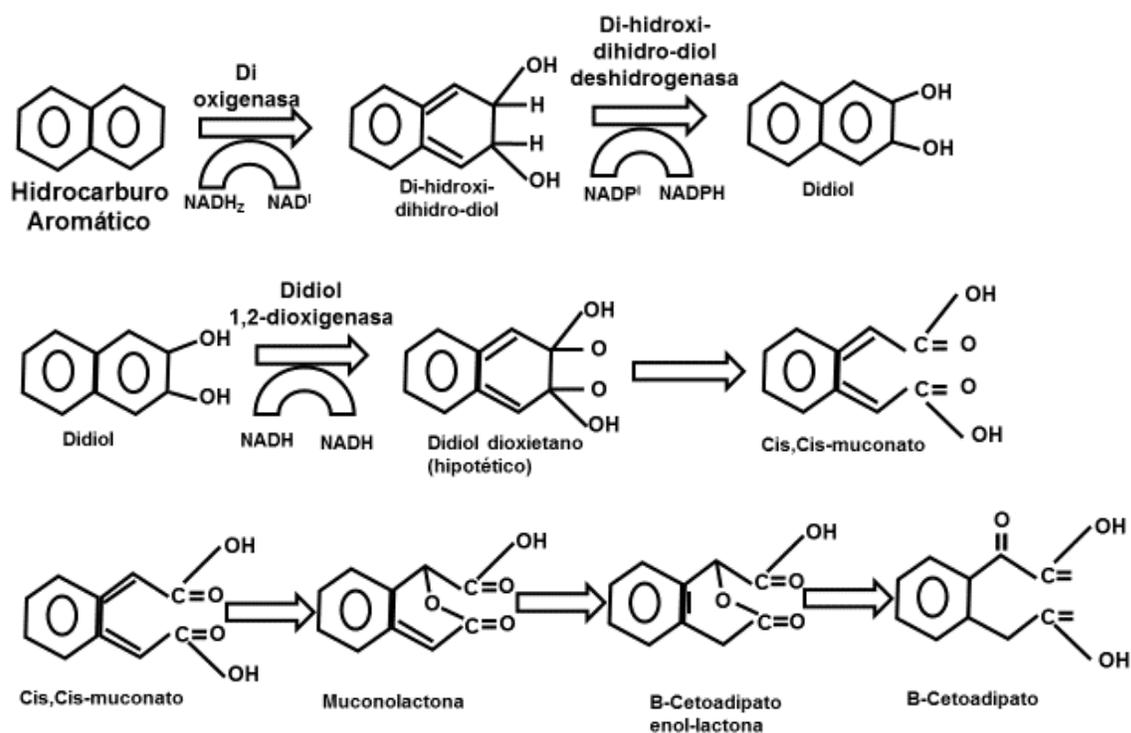


Figura 2.8. Esquema de la posible ruta de biodegradación de los hidrocarburos aromáticos (Adaptada: Pares y Juárez, 1997; Madigan *et al.*, 2009; Camacho-Morales *et al.*, 2010).

2.7. LITERATURA CITADA

- Abed M. M. R., J. Al-Sabahi, F. Al-Maqrashi, A. Al-Habsi, and M. Al-Hinai. 2014. Characterization of hydrocarbon-degrading bacteria isolated from oil-contaminated in the Sultane of Oman and evaluation in bioagumentation and biostimulation approaches in microcosm experiments. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 89: 58-66.
- Adams R., J. Zavala-Cruz y F. A. G. Morales. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico, II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*. 33: 483-493.
- Álvarez M. H. 2015. Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Revista Química Viva*. 14:18-25.
- Akbarzadeh K., A. Hammami, A. Kharrat, D. Zhang, S. Allenson, J. Creek, S. Kabir, A. Jamaluddin, A.G. Marshall, R.P. Rodgers, O.C. Mullins y T. Solbakken. 2007. Los asfaltenos: Problemáticos pero ricos en potencial. *Oilfield Review*. 1: 24-47.
- Aranberri I., B. P. Binks, J. H. Clint y P. D. I. Fletcher. 2006. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizados por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7: 211-231.
- Arias-Trinidad A., M. C. Rivera-Cruz, L. A. Aceves-Navarro y R. Quintero-Lizaola. 2012. Pasto japonesa (*Leersia* sp) como especie fitorremediadora en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *En: Memoria XXXVII*

- Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Zacatecas, Zacatecas. pp. 55-62.*
- Atlas R. M. y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 677 p.
- Bento M. F., A. O. F. Camargo, C. B. Okeke, and T. W. Frankenberger. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentationn. *Bioresource Technology*. 96: 1049-1055.
- Camacho-Morales R. L., A. Durón-Castellanos, A. Flores-Martinez y R. Zazueta-Sandoval. 2010. Actividades dihidroxidiol-deshidrogenasa en *Mucor circinelloides* YR-1 aislada de suelo contaminado con petróleo. *Acta Universitaria*. 20: 45-50.
- Cartmill A. D., D. L. Cartmill, and A. Alarcón. 2014. Controlled release fertilizer increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil. *International Journal of Phytoremediation*. 16: 285-301.
- 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.
- Celik G.Y., B. Aslim, and Y. Beyatli. 2008. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *Journal of Environmental Biology*. 29. 867-870.

- Centeno G., F. Trejo, J. Ancheyta y A. Carlos. 2004. Precipitación de asfáltenos del crudo Maya en un sistema a presión. *Revista de la Sociedad de Química de México*. 48:179-188.
- Cheng K. Y., and J. W. C. Wong. 2006. Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil-water system. *Chemosphere*. 62: 1907-1916.
- Chu W. 2003. Remediation of contaminated soils by surfactant-aided soil washing. *Practice Periodical of Hazardous, Toxic, and Radioactive Waste Management*. ASCE. 1: 19-24.
- Climent O. M. J., P. S. Encinas, R. B. Ferrer, C. S. Iborra, G. M. L. Marin, B. I. Morera, O. S. Navalón y G. F. Sacenón. 2013. *Química para Ingeniería*. Editorial Universidad Politécnica de Valencia. Valencia España. 195 p.
- Contreras A. P. A. 2005. Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto. Tesis de Ingeniería Civil en Biotecnología. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile. 75 p.
- Coutinho J. O. P. A., M. P. S. Silva, P. M. Moraes, A. S. Monteiro, J. C. C. Barcelos, E. P. Siqueira y V. L. Santos. 2013. Demulsifying properties of extracellular products and cells of *Pseudomonas aeruginosa* MSJ isolated from Petroleum-contaminated soil. *Bioresource Technology*. 128: 646-654.

- Cunningham D. S., T. A. Anderson, A. P. Schwab, and F. C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56: 55–114.
- Deshpande S., B. J. Shiau, D. Wade, D. A. Sabatini, and J. H. Harwell. 1999. Surfactant selection for enhancing ex situ soil washing. *Water Research*. 33: 351-360.
- 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.
- Domènech X. y J. Peral. 2006. Química Ambiental de Sistemas Terrestres. Editorial Reverté, España. 239 p.
- Dorantes A. R. 2008. Fitorremediación de suelos contaminados con diferentes tipos de petróleos crudos mediante el pasto azul (*Echinochloa* sp). Tesis Ingeniero Químico Petrolero. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco. 77 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.
- Dorn B. P., E. T. Vipond, P. J. Salanitro, and L. H. Wsniewski. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere*. 37: 845-860.

- Dushenkov V., P. B. Kumar, H. Motto, and I. Raskin. 1995. Rhizofiltration: the use of plants to remove heavy metals from aqueous streams. *Environmental Science & Technology*. 29:1239-1245.
- Eweis J. B., S. J. Ergas, D. P. Chang y E. D. Schroeder. 1999. Principios de Biorrecuperación: Tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y aguas subterráneas mediante procesos biológicos y fisicoquímicos. Madrid, España: McGraw-Hill / Interamericana de España. 327 p.
- Fuentes Y. J. L. 2006. Iniciación a la Botánica. 2a ed. Ediciones Mundi-Prensa. México. 230 p.
- Fransetti A., P., Di Gennaro, G. Bestetti, M. Lasagni, D. Pitea, and E. Collina. 2008. Selection of surfactants for enhancing diésel hydrocarbons-contaminated media biorremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 152: 1309-1316.
- Garbisu C., J. M. Becerril, L. Epelde y I. Alkorta. 2007. Bioindicadores de la calidad del suelo: herramienta metodológica para la evaluación de la eficacia de un proceso fitorremediador. *Ecosistemas*. 16: 44-49.
- Garriz A. y J.A. Chamizo. 1998. Química. Pearson Educación, México D.F. 855 p.
- Garriz R. A. 2001. Tú y la Química. Pearson Educación, México D.F. 848 p.
- Ghosh M. M. 1997. Kinetic consideration in surfactant-enhanced bioavailability of soil-bound PAH. The Sixth International in situ and on site Bioremediation Symposium. Battelle. Columbus E.U.A. 2: 575-580.

- Gould F. W. y R. B. Shaw. 1992. Gramíneas. Clasificación Sistemática. 1a. ed. AGT Editor, S. A. México. 381 p.
- Guo H., J. Yao, M. Cai, Y. Qian, Y. Guo, H. H. Richnow, R. E. Blake, S. Doni, and B. Ceccanti. 2012. Effects of petroleum contamination on soil microbial numbers, metabolic activity and urease activity. *Chemosphere*. 87: 1273-1280.
- Hadibarata T., and S. Tachibana. 2009. Enhanced chrysene biodegradation in presence of a synthetic surfactant. *Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry. Environmental Research in Asia. TERRAPUB*. pp. 301–308.
- Haddock J. D., D. A. Pelletier, and D.T. Gibson. 1997. Purification and properties of ferredoxin BPH, a component of biphenyl 2,3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19: 355-359.
- Haritash A., and C. Kaushik. 2009. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal Hazardous Materials*. 169: 1–15.
- Huang X. D., Y. El-Alawi, D. M. Penrose, B. R. Glick, and B. M. Greenberg. 2004. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. *Environmental Pollution*. 130, 465–476.
- Huang P. M. 2004. Soil mineral-organic matter-microorganism interactions: fundamentals and impacts. *Advances in Agronomy*. 82: 391–472.

- Ibrahim M. M., A. Al-Turki, D. Al-Sewedi, A. Arif, and I. El-Gaaly. 2015. Molecular application for identification of polycyclic aromatic hydrocarbons degrading bacteria (PAHD) species isolated from oil polluted soil in Dammam, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22: 651-655.
- IMP (Instituto Mexicano del Petróleo) 2014. El petróleo: Composición. Consultado el 13 de Noviembre del 2015. <http://www.imp.mx/petroleo/?imp=comp>
- Ingraham J. L. y C.A. Ingraham. 1998. Introducción a la Microbiología. Volumen 2. Editorial Reverte, S.A. Barcelona, España. 710 p.
- Issoufi I. R., L. Rhykerd, and K. D. Smiciklas. 2006. Seedling growth of agronomic crops in crude oil contaminated soil. *Journal of Agronomy and Crop Sciences*. 192: 310-317.
- Jajoo A. N., R. Mekala, R. S. Tomar, M. Grieco, M. Tikkanen, and E. M. Aro. 2014. Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 137: 151-155.
- Jiménez C. B. E. 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México: Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. México D.F. 926 p.
- Jiménez I. D., M. A. S. Medina y R. N. J. Gracida. 2010. Propiedades, aplicaciones y producción de biotensoactivos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26: 65-84.

- Kirk-Othmer, M. 2001. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Limusa México. Mexico D.F. 1494 p.
- Kim E. S., D. H. Lee, B. W. Yum, and H. W. Chang. 2005. The effect of ionic strength and hardness of water on the non-ionic surfactant-enhanced remediation of perchloroethylene contamination. *Journal of Hazardous Materials*. 119:195–203.
- Kim E. J., and D. O. Shah. 2003. A cloud point study on the micellar growth of an amphiphilic drug in the presence of alcohol and ionic surfactant. *The Journal Physical Chemistry B*. 107: 8689-8693.
- Largo-Pereda E. 2010. Degradación de alcanos por células de *Alcanivorax venustensis* inmovilizadas en hidrogeles adhesivos y biodegradables. Tesis doctoral. Universidad del País Vasco. España. 218 p.
- Leahy J. G., and R. R. Colwell. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiological Reviews*. 54: 305-315.
- Lee D. H., E. Kim, and C. Chang. 2005. Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene contaminated groundwater. *Geosciences Journal*. 9: 261-267
- Leung K. T., K. Nandakumar, J. Sreekumari, H. Lee, and 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.*
- Lin X., X. Li, T. Sun, P. Li, Q. Zhou, L. Sun, and X. Hu. 2009. Changes in microbial population and enzymes activities during the bioremediation of oil-

contaminated soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 83: 542-557.

López M., J. B. G. Quintero, A. L. V. Guevara, D. C. C. Jaimes, S. M. R. Gutiérrez y J. M. García. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4: 82-90.

López-Martínez S., M. E. Gallegos-Martínez, L. J. Pérez-Flores y M. Gutiérrez-Rojas. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminacion Ambiental*. 21: 91-100.

Madigan M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap y D. P. Clark. 2009. Brock. Biología de los Microorganismos. 12a. ed. Pearson Educación, S.A. España. 1219 p.

Maldonado-Chávez E., M. C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes y D. J. Palma-López. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 26: 121-136.

Mancera-López M. E., F. Esparza-García, B. Chávez-Gómez, R. Rodríguez-Vazquez, G. Saucedo-Castañeda, and J. Barrera-Cortes. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 61: 151-160.

Martínez V. E. y S. F. López. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *TERRA Latinoamericana*. 19: 9-17.

- Marroquín S. G. J. 2007. Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis Doctor en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México, D.F. 129 P.
- Méndez M. O., and R. M. Maier. 2008. Phytostabilization of Mine Tailings in Arid and Semiarid Environments - An Emerging Remediation Technology. *Environmental Health Perspectives*. 116: 278-283.
- Méndez-Natera J.R., C. Roque, K. Zapata y V. A. Otahola-Gomez. 2004. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO Agrícola*. 4: 66-71.
- Merkl N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air, and Soil Pollution*. 165: 195-209.
- Mollea C. F. Bosco, and B. Ruggeri. 2005. Fungal biodegradation of naphthalene: microcosm studies. *Chemosphere*. 60: 636-643.
- Morales G. G. 2007. La fitorremediación de suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de la planta de arroz (*Oriza sativa* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 71 p.
- Moreno-Medina U. C., L de M. Breton-Deval, E. Ríos-Leal, J. Barrera-Cortes, N. Rinderknecht-Seijas y M. Poggi-Varaldo. 2011. Incremento de la

solubilización de percloroetileno con un tensoactivo no iónico. *Interciencia*. 36: 224-228.

Muñoz-Castellanos L. N., G. V. Nevarez-Moorillon, M. L. Ballina Casarrubias y M. R. Peralta-Pérez. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica*. 1: 1-3.

Oberbremer A., R. Müller-Hurtig, and F. Wagner.1990. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 32: 485–489.

Olguín J. E., E. M. Hernández y G. Sánchez-Galvan. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 23: 139-154.

Ortíz B. O., I. L. Ize y A. G. Gavilán. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*. 69: 83-92.

Parés R., y A. Juárez. 1997. Bioquímica de los microorganismos. Ediciones Reverté, S.A. Barcelona, España. 367 p.

Peña-Castro J. M., B. E. Barrera-Figueroa, R. Ruiz-Medrano y B. Xoconostle-Cázares. 2006. Bases moleculares de la fitorremediación de hidrocarburos totales del petróleo. *Terra Latinoamericana*. 24: 529-539.

Porta J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 2003. Edafología para la Agricultura y el Medio Ambiente. 3a. edición. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona, España. 960 p.

- Potin O., C. Rafin, and E. Veignie. 2004. Bioremediation of an aged polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)-contaminated soil by filamentous fungi isolated from the soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 54: 45–52.
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review and Plant Biology*. 56: 15–39.
- Prasad M. N. V., and M. O. Freitas. 2003. Metal hyperaccumulation in plants-biodiversity prospecting for phytoremediation technology. *Journal of Molecular Biology & Genetics*. 6: 276-312.
- Pushpanathan M., S. Jayashree, P. Gunasekaran, and J. Rajendhram. 2014. Microbial bioremediation: A metagenomic approach microbial. *Biodegradation and Bioremediation*. 1: 407-419.
- Purushothaman A., P. Meenatchi, and N. Saravanan. 2010. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (toluene and xylene) by a bacterial strain isolated from petroleum contaminated site in Chennai. *Asian Journal of Bio Science*. 5: 206-210.
- Raiger L. L. J. y N. I. López. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva*. 3: 146-161.
- 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 Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 127 p.

- Ramos O. R., M. R. Sepúlveda y M. F. Villalobos. 2003. El agua en el medio ambiente: Muestreo y análisis. 1a. ed. Plaza y Valdez, S.A. de C.V. Universidad Autónoma de Baja California. 175 p.
- Riojas G. H., P. Gortares, I. Mondaca, J. J. Balderas y L. G. Torre. 2010. Efecto de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*. 3:120-145.
- Riojas G. H., M. P. Gortares, F. I. Mondanca y C. J. J. Balderas. 2011. Sinergia en surfactantes para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista: Anales de la Real Sociedad Española de Química*. 107: 243-249.
- Rivera-Cruz M. C. 2011. Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco. In: *Recursos Genéticos Microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México*. Gamboa A.M. y Rojas H.R. (Eds). Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (Subnargem). Edit Morevalladolid. pp. 78-87.
- Rivera-Cruz M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vazquez 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de Tabasco México. *Agrociencia*. 36: 149-160.
- Rivera-Cruz M. C., R. Ferrera-Cerrato, P. Sánchez-García, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vazquez. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia*. 38: 1-12.

- Robertson S. J., W. B. McGill, H. B. Massicotte, and P. M. Rutherford. 2007. Petroleum hydrocarbon contamination in boreal forest soils: a mycorrhizal ecosystems perspective. *Biological Reviews*. 82: 213-240.
- Salager J. L. 2002. Surfactantes tipos y usos. Cuaderno FIRP S300-A. Universidad de los Andes. Mérida Venezuela. 49 p.
- Salager J. L., y A. Fernández. 2004. Surfactantes, Generalidades y Materias primas. Cuaderno FIRP S301-PP. Universidad de los Andes. Merida Venezuela. 22 p.
- Salt D. E., D. R. Smith, and I. Raskin. 1998. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 49: 643-668.
- Salvo V. S., I. Gallizia, M. Moreno, and M. Fabiano. 2005. Fungal communities in PAH impacted sediments of Genoa-Voltri Harbour (NW Mediterranean, Italy). *Marine Pollution Bulletin*. 50: 553–559.
- Shcherbakova V. A., K. S. Laurinavichius, and V. K. Akimenko. 1999. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere*. 39: 1861-1870.
- Shaw L. J., and R. G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants in the rhizosphere. *Advances in Applied Microbiology*. 53: 1-60.
- Silva S. I., M. Grossman, and R. L. Durrant. 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungus. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 224-229.

- Smith M. J., T. H. Flowers, H. J. Duncan, and 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: 1219-1225.
- Soleimani M., M. Afyuni, M. A. Hajabbasi, F. Nourbakhsh, M. R. Sabzalian, and J. H. Christensen. 2010. Phytoremediation of an aged petroleum contaminated soil using endophyte infected and non-infected grasses. *Chemosphere*. 81: 1084-1090.
- Sun S., W. P. Inskeep, and S. A. Boyd. 1995. Sorption of nonionic organic compounds in soil water systems containing a micelle forming surfactant. *Environmental Science and Technology*. 29: 903–913.
- Tiehm A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 258–263.
- Torres L. G., and E. R. Zamora. 2002. Preparation and power consumption of surfactant–fuel oil–water emulsions using axial, radial, and mixed flow impellers. *Fuel* 81: 2289-2302.
- Torres L. G., J. L. Orantes, and R. Iturbe. 2006. Biodegradation of two nonionic surfactants used for in situ flushing of oil-contaminated soils. *Tenside Surfactant Detergents*. 43: 251– 255.
- Torres-Rodriguez D. 2003. El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. *Ecosistemas*: 2: 1-5.

- Trujillo-Narcía A., M. C. Rivera-Cruz, L. C. Lagunes-Espinoza, D. J. Palma-López, S. Soto-Sánchez y G. Ramírez-Valverde. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28: 361-374.
- Vargas G. P. A., R. R. Cuellar y J. Dussan. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. *Hipótesis-Apuntes Científicos Uniandinos*. 4: 44-49.
- Vives I., J. O. Grimalt y R. Guitart. 2001. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. *Apuntes de Ciencia y Tecnología*. 3: 45-51.
- Volke S. T. y J. A. Velazco. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. pp. 10-59.
- Volke S. T. y J. A. Velazco. 2003. Biodegradación de hidrocarburos del petróleo en suelos intemperizados mediante composteo. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. pp. 3-29.
- Volkering F., A. M. Breure, and W. H. Rulkens. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. 8: 401–417.
- Volke-Sepúlveda T., J. A. Velasco y D. A. de la Rosa. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Instituto Nacional de Ecología (INE-SEMARNAT). México, D.F. 57 p.
- Wang X., and R. Bartha. 1994. Effects of bioremediation on toxicity, mutagenesis, and microbiota in hydrocarbon-polluted soils. *In: Wise, D. L. and D. J. Trantolo (eds.). Remediation of Hazardous Waste Contaminated Soil*. New York. pp: 213-215.

- White P. M., D. C. Wolf, G. J. Thomas, and C. M. Reynolds. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*.169: 207-220.
- Yúfera P. E.1996. Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria. Editorial Reverté. Valencia, España. 795 p.
- Zamora A., J. Ramos y M. Arias. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*. 24: 5-12.
- Zhang Z., L. Gai, C. Hou, C. Yang, C. Ma, Z. Wang, B. Sun, X. He. H. Tang, and P. Xu. 2010. Characterization and biotechnological potential of petroleum-degrading bacteria isolated from oil-contaminated soils. *Bioresource Technology*. 101: 8452-8456.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS DE CRECIMIENTO Y RENDIMIENTO VEGETAL DE *Leersia hexandra Swartz* EN EL TRÓPICO HÚMEDO MEXICANO EN FUNCIÓN DE PETRÓLEO Y SURFACTANTE

3.1. RESUMEN

Se estudió el crecimiento y producción de la biomasa de *Leersia hexandra Swartz* en Gleysol contaminado con petróleo fresco (PF) y tratado con Tween® 80 (Tw). Se determinaron las dosis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) y de Tw que promovieron respuesta favorable de la planta. Se evaluó longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ), tasa de crecimiento (TCR), clorofilas a, b y total (Cla, Clb, Clt); volumen radical (VR), materia seca del follaje (MSF) y de raíz (MSR). Las PJ, TCR, MSF, MSR y VR aumentaron con la mayor dosis de HTP's y de Tw. En 90,000 mg kg⁻¹ HTP's y 5% de Tw se incrementaron las PJ, MSR y VR pero en LE, Cla y Clb no hubo efecto. La MSF disminuyó en dosis altas de PF, aumentó con 2.5 y 5% de Tw. Las cuatro dosis de HTP's y las dos de Tw favorecieron el crecimiento y rendimiento de *L. hexandra*, esto sugiere su uso en la recuperación de Gleysol con PF asistida con Tween® 80.

Palabras clave: Pastos, petróleo, Tween® 80, tasa de crecimiento

CHAPTER III

GROWTH ANALYSIS AND PLANT YIELD OF *Leersia hexandra* Swartz IN TROPIC WET MEXICAN IN FUCTION ON PETROLEUM AND SURFACTANT

3.2. ABSTRACT

The growth and production of *Leersia hexandra* Swartz were analyzed in contaminated soil with fresh petroleum and then treated with Tween® 80. The efficient dose of total petroleum hydrocarbons (TPH's) and Tween® 80 (Tw) was determined in order to the grass. Length of stolon (LE), number of young plants (PJ), growth rate (TCR), Chlorophyll a, b and total (Cla, Clb, CIT), leaf dry matter (MSF), root dry matter (MSR) and root volume (RV) were assessed. The PJ, TCR, MSF, MSR y VR of the plant increased at the highest dose of TPH's and Tw PJ, MSR and VR were increased by 90 000 mg kg⁻¹ TPH's and 5% Tw application, but LE, Cla y Clb, no effect, however, the MSF was decreased by high dose effect of PF, it was increased whit 2.5 y 5% of Tw. The four doses of TPH's and the two doses of Tw improved the growth and yield of *L. hexandra*. These results suggest that *L. hexandra* might be used in the Gleysol soil recovery with fresh petroleum assisted with Tween® 80.

Key words: Grass, petroleum, Tween® 80, growth rate

3.3. INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos del petróleo son contaminantes persistentes en el suelo, sus efectos tóxicos ya han sido documentados (Rivera-Cruz, 2011a; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012; Orozco-Soto *et al.*, 2014). El tratamiento de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo puede ser físico, químico y biológico. Las tecnologías asistidas con surfactantes no iónicos como el Tween® 80 (Lee *et al.*, 2005) y la fitorremediación han demostrado eficiencia en la recuperación de suelos contaminados con petróleo (Merkl *et al.*, 2005). El Tween® 80 (polietileno glicol monooleato de sorbitan) es un agente tensoactivo utilizado para retener, solubilizar y mejorar la disponibilidad de los contaminantes de una manera poco tóxica para los organismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999; Jiménez, 2001; Moreno-Medina, 2011; Farghaly *et al.*, 2015). La fitorremediación utiliza plantas y organismos del suelo; raíces y microorganismos para degradar, asimilar o metabolizar los hidrocarburos del petróleo (Merkel *et al.*, 2005), pero la remoción es lenta e incompleta. La aplicación de la fitorremediación después de la formación de la emulsión del petróleo, inducida por el surfactante, para incrementar su remoción, requiere de plantas adaptadas a estas condiciones.

Las pruebas con organismos del suelo (flora y microflora) indican que el Tween® 80 en dosis iguales y/o mayores a 3% causan toxicidad (Paria, 2008), producen daños en la cutícula de los tejidos vivos. Los hidrocarburos del petróleo fresco causan toxicidad pero también adaptación hasta cierto nivel en diferentes gramíneas, entre estas los pastos (Aprill y Sims, 1990; Chen *et al.*, 2004; Rivera-

Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Sang-Hwan *et al.*, 2007; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010).

Los pastos poseen una densa red de raíces que llegan hasta 2.7 m de profundidad, su elongación superficial y su tolerancia a condiciones de estrés (Gould y Shaw, 1992; Orozco-Soto *et al.*, 2014) causada por el petróleo. *L. hexandra* es un pasto forrajero que se encuentra en las regiones tropicales húmedas donde produce dos t ha⁻¹ año⁻¹ de materia seca; invade y atenúa humedales por la acumulación de follaje y raíz que forma sobre el suelo y el agua, lo que facilita el tránsito de animales en la pradera inundada. Presenta un follaje muy suave, semidecumbente, de tallos flexibles con hojas angostas y pequeñas (Rodríguez-Carrasquel, 1983; Vegetti, 2002). Recientemente a *L. hexandra* se le ha localizado en humedales del sureste de México contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado (Rivera-Cruz, 2011b) y con una producción de biomasa seca de 11.5 t ha⁻¹ año⁻¹ (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2013).

No obstante que los antecedentes indican que la concentración, la estructura química de los xenobióticos establecen contacto con la planta y afectan su crecimiento y fisiología. Al respecto, dosis grandes de petróleo en el suelo originan respuestas adversas en las plantas superiores (fitotoxicidad) (Kapustka y Reporter, 1998). Según Plice (1948) cuando las concentraciones son bajas se estimula el crecimiento vegetativo, pero según Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia (2004) y Cartmill *et al.* (2014) concentraciones altas del orden de 50000 y 100000 mg kg⁻¹

de hidrocarburos totales del petróleo, disminuyen el crecimiento y producción de materia seca de los pastos *Echinochloa polystachya*, *Brachiaria mutica* y *Lolium multiflorum* después de seis meses de cultivo en invernadero.

A pesar que los pastos han demostrado capacidad de adaptación a hidrocarburos del petróleo que le confieren importancia en pruebas de toxicidad, adaptación y fitorremediación de los hidrocarburos, se desconoce la respuesta a la aplicación de Tween® 80 combinado con petróleo fresco. Este conocimiento es de utilidad para la recuperación de suelo usando tecnologías combinadas. El Tween® 80 es aplicado como un remediador de emergencia *in situ* en agua y suelo, para la biodisponibilidad de los hidrocarburos en el ambiente (Kim y Weber, 2005), sin considerar los efectos en la planta. El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto de dosis combinadas de Tween® 80 e hidrocarburos totales del petróleo fresco en la expresión del crecimiento, contenido de clorofila y producción de materia seca de *L. hexandra*, cultivada en microtúnel.

3.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en el sureste de México en microtúnel en el Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados ubicado en Cárdenas, Tabasco. El clima es trópicamente húmedo con lluvias en verano (Amf). La precipitación pluvial promedio anual es 2200 mm, 1200 mm de evaporación y 32 °C la temperatura media anual (INEGI, 2005; CONAGUA, 2014). Para el bioensayo se usó un Gleysol (GL) y plántulas de *L. hexandra* (20.8 ± 3.5 cm de altura) de 30 días de edad. El suelo se colectó de un GL localizado en el ejido Blasillo 2a. Sección, municipio de

Huimanguillo, Tabasco. El sitio donde se realizó la colecta se localiza en las coordenadas 18° 03' 8" N y 93° 56' 6.3" O. El suelo tiene textura arcillosa (Método hidrométrico, Bouyoucos, 1962), el pH es 5.43 (potenciometría), la materia orgánica es 29.98%, el N total tiene 0.66% (micro Kjeldhal; Page *et al.*, 1982), el carbon orgánico es 17.39% (Walkley y Black, 1934), S-SO₄ (175.33 mg kg⁻¹, CIC 48.92 cmol kg⁻¹ (Rhoades, 1982).

El pasto japonesa *L. hexandra* se colectó del horizonte superficial (0-10/15 cm) de un Gleysol con 95 933 mg kg⁻¹ HTP's localizado en el campo petrolero La Venta, Tabasco (Rivera-Cruz, 2011b). Se seleccionaron del pasto vástagos de cinco cm de longitud con yemas maduras; con este material se estableció un almácigo en charolas de unicel 42 d antes del inicio del experimento. EL petróleo utilizado fue fresco (PF) tipo Istmo proveniente del campo petrolero Cinco Presidente del Golfo de México, localizado en la región noroeste del estado de Tabasco, en la zona limítrofe con el estado de Veracruz México; y el surfactante comercial utilizado es el denominado Tween® 80 (polietileno glicol monooleato de sorbitan) (Tw).

Se realizó un experimento en microtúnel de agosto a diciembre 2014 (180 d), en H. Cárdenas, Tabasco, México. El diseño experimental fue completamente al azar y tres repeticiones, con arreglo de dos factores (5x3): 1) concentración de petróleo Istmo: 693 (concentración basal del suelo), 4 000, 30 000, 60 000 y 90 000 mg kg⁻¹ base seca de hidrocarburos totales del petróleo; el otro factor fue la dosis de Tween® 80: 0, 2.5 y 5%. El total de tratamientos fueron 15 (Cuadro 3.1). La unidad experimental fue un contenedor de vidrio (recipiente de 40 cm de altura y 20 cm de

ancho) con 1500 g de suelo seco, molido y tamizado en malla de 5 mm de abertura. Los tratamientos con petróleo se prepararon 6, 45, 90 y 135 g de petróleo para obtener concentraciones de 4000, 30000, 60000 y 90000 mg de HTP's por kilogramo de suelo seco. Se agregaron 37.5 g de Tw en 388.5 mL de agua y 75 g en 345 mL de agua para obtener concentraciones de 2.5 y 5% por kg de suelo seco y mantener un 28% de humedad del suelo. Las variables evaluadas fueron longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ), tasa de crecimiento relativo (TCR), clorofila a, b, total; volumen de raíz (VR), materia seca radical y de follaje.

A los 30, 60, 120 y 180 días después de la siembra (dds) se midió la longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ) y tasa de crecimiento relativa (TCR). La TCR se determinó mediante la fórmula, $TCR: (\ln w_2 - \ln w_1) / (t_2 - t_1)$. Dónde: \ln = Logaritmo natural, w = altura, t = tiempo (mes). Esta fórmula se adaptado de Hunt *et al.* (2002). A los 180 dds se determinó la concentración de clorofila, cantidad de materia seca y volumen radical.

Cuadro 3.1. Caracterización de tratamientos del experimento.

	Tratamientos														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Testigo [†]	Si	Si	Si	No	No	No									
4 000 HTPs [¶]	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No	No	No	No
30 000 [¶]	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No	No	No	No
60 000 [¶]	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si	No	No	No
90 000 [¶]	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	No	Si	Si	Si
DosisTw [§] (%)	0	2.5	5	0	2.5	5	0	2.5	5	0	2.5	5	0	2.5	5

[†]Testigo: integrado con 693 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo de origen biogénico. [¶] mg kg⁻¹ de HTP's de petróleo fresco y [§]Tw: Tween® 80.

Para la concentración de clorofila a se tomó un área de 1 cm² de la cuarta hoja bien desarrollada contado del ápice hacia debajo de cada unidad experimental, y se incubó en N, N-dimetilformamida durante 24 h en la oscuridad (Morán, 1982). La absorbancia se leyó a 647 y 664 nm en un espectrofotómetro UV-Visible Marca Thermo Scientific modelo multiskan go. El cálculo de la concentración de clorofila se realizó con las fórmulas de Morán (1982): Clorofila a = 12.64 (A664)-2.99 (A647), clorofila b (C1b) = 23.26 (A647)-5.6 (A664) y clorofila total (C1t)= 7.04 (A664) + 20.27 (A647).

El material vegetal se colectó de cada unidad experimental, se realizó por separado el follaje (tallo y hojas) y la raíz. La biomasa fue secada por separado a 70 °C en una estufa de circulación de aire forzado durante 120 h y pesado para obtener la materia seca del follaje (MSF) y la de raíz (MSR). El volumen radical (VR) fue evaluado en raíces frescas con la técnica de desplazamiento de volumen de agua en probeta (Böhm, 1979). A los datos se les realizó análisis de varianza (ANDEVA), cuando existieron diferencias significativas se realizó la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) de Tukey ($p \leq 0.05$). Se realizó también el análisis de correlación de Pearson entre variables mediante el programa estadístico del SAS, versión 9.1 (SAS, 2005).

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Plantas jóvenes, longitud de estolones y tasa de crecimiento relativo

Los datos del análisis de varianza reportados en el Cuadro 3.2 de la variable LE al 30 y 60 dds mostró diferencias significativas de dosis de HTP's y del Tw y su interacción (Apéndice, Cuadro 6.2). En contraste para PJ y TCR ocurrió efecto significativo de dosis y su interacción en los cuatro tiempo evaluados (Apéndice, Cuadro 6.4, Cuadro 6.6), con excepción de la interacción HTP's x Tw a los 30 dds para PJ y del efecto de la dosis de Tw a 60 dds.

Cuadro 3.2. Análisis de varianza para longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ) y tasa de crecimiento relativo (TCR) de *Leersia hexandra* por efecto de dosis combinada de Tween® 80 e hidrocarburos totales del petróleo.

Fuente de variación	Longitud de estolones (cm) (LE)				Número de plantas jóvenes (PJ)				Tasa de crecimiento relativo (cm día ⁻¹) (TCR)			
	30	60	120	180	30	60	120	180	30	60	120	180
	-----Días después de la siembra-----											
Dosis de HTP's	**	**	NS	NS	*	**	**	**	**	*	*	**
Dosis Tween® 80	**	**	*	NS	*	**	**	**	**	NS	*	*
HTP's*Tween® 80	**	*	NS	NS	NS	*	*	**	**	**	*	*

*, ** =P≤. 0.05, 0.01, respectivamente, NS= no significativo a P≤0.05. HTP's: Hidrocarburos totales del petróleo.

Dosis de petróleo

La dosis de 4000 mg kg⁻¹ de HTP's incrementó la LE y la TCR respecto al testigo durante los primeros 30 dds (Cuadro 3.3). A partir de la dosis de 4000 mg kg⁻¹ de HTP's, conforme se incrementa las dosis, ocurrió la reducción significativa de la

LE y de la TCR en 30 y 60 dds. Los resultados a los 60 a 180 dds no tuvieron diferencias significativas por efecto de dosis en LE, pero en la TCR la respuesta evidenció contrariedad. La tendencia es creciente con el aumento de la dosis de HTP's. El mismo efecto se identificó en la cantidad de plantas jóvenes a los 180 días del experimento. La máxima TCR fue 5 a 7 cm día⁻¹, fue a los 60 dds en suelos con las cinco dosis de HTP's, disminuyó al aumentar el tiempo, alcanzando la mínima de 0.5 a 1.4 cm día⁻¹ a los 180 dds.

Dosis de Tween® 80

En el Cuadro 3.3 se observó un efecto reductor significativo de la LE por efecto de dosis de Tw desde los 30 hasta los 120 dds. A los 180 dds no se observaron diferencias en LE entre dosis. Al igual que con las dosis de HTP's, la cantidad de PJ registró efecto significativo positivo por efecto de la dosis de Tw desde los 60 hasta los 180 dds. Por otro lado, a los 120 y 180 dds, la dosis de 5% de Tw estimuló 41.2 y 36.8% la cantidad de PJ respecto al control, respectivamente. Las TCR mayores (6.6, 5.3, 6.1 cm día⁻¹) se cuantificaron a los 60 dds en todos los tratamientos (control y dosis de Tw), después disminuyó a 0.6 - 1 cm día⁻¹ a los 180 dds. Durante los primeros 60 dds ocurrió disminución significativa de la TCR por efecto del incremento de la dosis de Tw.

Cuadro 3.3. Longitud de estolones (LE), número de plantas jóvenes (PJ) y tasa de crecimiento relativo (TCR) de *Leersia hexandra* por efecto de dosis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) y de Tween® 80 (Tw).

Fuente de variación	LE (cm)				PJ				TCR (cm día ⁻¹)			
	30	60	120	180	30	60	120	180	30	60	120	180
-----Días después de la siembra-----												
HTP's¶												
693	98b	280ab	405a	455a	6b	11c	18d	21d	2b	6ab	2.6ab	0.5c
4000	128a	312a	424a	450a	8ab	14b	23cd	27c	3.5a	6ab	2b	0.6bc
30000	89b	290ab	418a	475a	9a	15ab	27bc	31bc	2b	7a	2.5ab	0.5c
60000	58c	246bc	410a	460a	8ab	16a	32ab	37ab	1.2c	6ab	3.5a	1.0ab
90000	62c	221c	379a	443a	8ab	16a	36a	39a	1.3c	5b	2.3ab	1.4a
Tw (%)												
0	104a	303a	421a	459a	7a	11b	20c	24c	2.7a	6.6a	1.7b	1.0a
2.5	101a	295a	435a	478a	9a	15a	27b	32b	2.6a	6.1a	2.9a	0.6b
5	57b	212b	366b	434a	7a	16a	34a	38a	1.2b	5.3b	3.2a	0.8ab
MG	87	270	407	457	8	14	27	31	2.2	6.0	2.6	0.8
CV (%)	15.5	12.5	13.8	12.7	25	13.1	16.7	14.5	20	13.2	33.7	45.2

En columna letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). n=3. ¶: mg kg⁻¹. MG: Media general. CV:

Coefficiente de variación.

Dosis de petróleo y Tween® 80

La interacción dosis de HTP's y de Tw sucedió en LE sólo a los 30 y 60 dds; en PJ a partir de los 60 dds y en TCR durante todo el ciclo experimental (Cuadro 3.2). La Figura 3.1 (Apéndice, Cuadro 6.4) evidencia el efecto de la interacción de PJ. Los resultados muestran que de los 15 tratamientos evaluados las medias de 14 fueron significativamente mayores que el tratamiento testigo (T1), lo que indica que la producción de brotes nuevos es estimulada por la sinergia entre los HTP's del petróleo y el Tw. El mayor número de PJ (51) se contabilizó en el tratamiento 15 constituido por 90,000 mg kg⁻¹ de petróleo combinado con 5% de Tw (Figura 3.1).

3.5.2. Concentración de pigmentos clorofilianos

Los datos del ANDEVA anotados en el Cuadro 3.4 muestran efecto significativo solo para clorofila a por efecto de las dosis de HTP's y de Tw, y también para clorofila total en respuesta a dosis de Tw (Apéndice, Cuadro 6.8). La concentración de clorofila b registrada el día 180 no mostró cambio significativo por efecto de dosis en estudio. La cantidad del Tw evidenció relación positiva significativa baja ($r=0.362^*$) respecto a la concentración de clorofila a ($r=0.310^*$) y la clorofila total ($r=0.362^*$) (Cuadro 3.6).

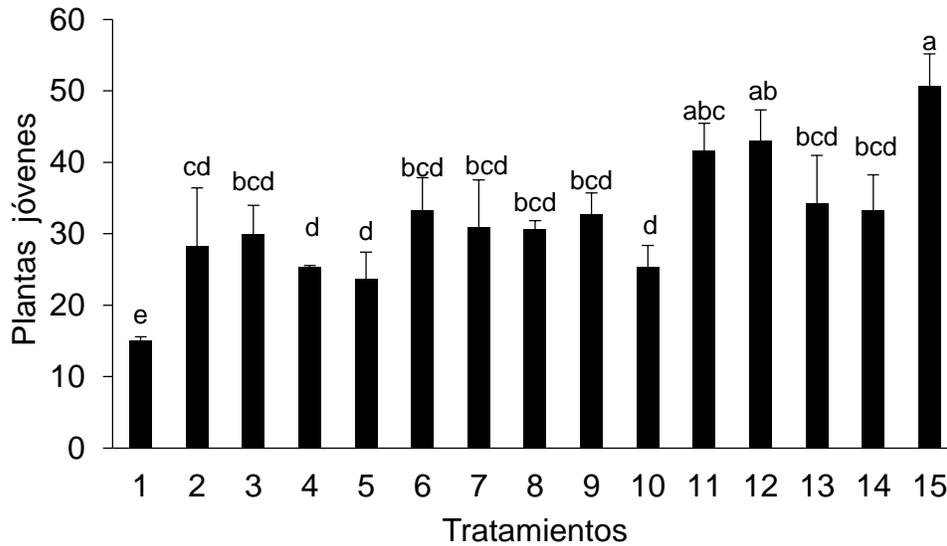


Figura 3.1. Número de plantas jóvenes de *Leersia hexandra* en suelo con petróleo fresco y pretratado con Tween® 80 a los 180 dds. Tratamiento (T). T1: 693 Biogénico. T2: 693+2.5. T3:693+5%. T4:4 000. T5:4 000+2.5. T6:4 000+5%. T7:30 000. T8:30 000+2.5. T9: 30 000+5%.T10:60 000. T11:60 000+2.5. T12:60 000+5%. T13: 90 000. T14:90 000+2.5%. T15:90 000+5% de HTP's (mg kg⁻¹) + Tween® 80 (%). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05). n=3.

Cuadro 3.4. ANDEVA de los factores HTP's y Tw para todos los pigmentos clorofilianos, materia seca y volumen radical en planta de *Leersia hexandra* a los 180 dds.

Variables	Dosis de HTP's (DHTP's)	Dosis Tween® 80 (DTw)	Interacción (DHTP's) (DTw)
Cla	*	*	NS
Clb	NS	NS	NS
Clt	NS	*	NS
MSR	**	**	*
MSF	**	**	**
MST	NS	**	**
DR	**	**	**
VR	**	**	**

*,** P ≤ 0.05, 0.01, significativa y altamente significativa respectivamente. NS= no significativo.

3.5.3. Materia seca y volumen radical

Dosis de hidrocarburos totales del petróleo

Se observaron diferencias significativas de la MS del follaje, MS radical y VR en función de las dosis de HTP's y Tw (Cuadro 3.5; Apéndice, Cuadro 6.10). La producción de MS del follaje disminuyó por efecto de la dosis de HTP's ($r=-0.425^*$) (Cuadro 3.6). La mayor cantidad de MS del follaje (55.12 y 54.5 g) se formó en la planta establecida en el suelo testigo y 4000 mg kg⁻¹ de HTPs, en cambio la menor (43.3 g) fue en suelo con 90 000 mg kg⁻¹, la disminución fue 16% respecto al testigo. Los valores de la MS radical y VR aumentaron con el incremento de la dosis de HTP's ($r=0.632^{**}$, 0.817^{**}) (Cuadro 6). La mayor cantidad de MS radical y VR (12.20 g y 188.33 cm³, respectivamente) se formó en plantas que crecieron en suelo con 90 000 mg kg⁻¹ de HTP's, el incremento fue 53.2 y 61.4% con respecto

a la planta cultivada en suelo testigo (Cuadro 3.5). La relación MS del follaje/ MS radical disminuyó por efecto del aumento de las cantidades de HTP's y de Tw.

Cuadro 3.5. Concentración de pigmentos clorofilianos (Cl), materia seca (MS) y volumen radical (VR) de *Leersia hexandra* en dosis de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) en función de la dosis de tween® 80 (Tw).

Fuente de variación	Clorofila ($\mu\text{g cm}^2$)			MS (g)		VR	MSF/MSR
	a	b	total	Follaje	Radical	(cm^3)	
<u>HTP's (mg kg^{-1})</u>							
693 Biogénico	13.76a	4.62a	18.60a	55.12a	5.71c	72.64c	9.65
4000	11.79a	4.85a	16.84a	54.58a	6.16c	70.83c	8.86
30000	11.94a	4.16a	16.29a	51.83ab	9.17b	93.33bc	5.65
60000	14.38a	5.43a	19.8a	44.99bc	10.23ab	130.56b	4.39
90000	13.80a	4.71a	18.72a	43.33c	12.20a	188.33a	3.55
<u>Tw (%)</u>							
0	11.93a	4.1a	16.16b	40.81b	6.53c	87.25a	6.24
2.5	13.62a	5.11a	18.95a	53.22a	8.06b	115.67a	6.60
5	13.85a	5.02a	19.09a	55.88a	11.50a	130.50a	4.85
Media general	13.13	4.75	18.07	49.97	8.70	111.13	6.22
CV (%)	16.32	29.10	16.06	10.63	19.35	13.31	15.85

En columna letras similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Tukey, $P \leq 0.05$). $n=3$.

Dosis de Tween® 80

La MS del follaje, MS radical y VR presentaron relación positiva con la dosis de Tw (0.545*, 0.532* y 0.332*) (Cuadro 3.6). Estas variables tuvieron relación positiva con el incremento de la dosis de Tw (Cuadro 3.5), el aumento de MS del follaje, MS radical y VR fue 26.98, 43.2 y 56.8 %, respectivamente por efecto de 5% de Tw adicionado en el suelo. La relación MS follaje/MSradical fue mayor en suelo testigo respecto a las 14 relaciones en los tratamientos con petróleo (Cuadro 3.5).

Interacción dosis de hidrocarburos totales del petróleo y Tween® 80

El ANDEVA de la MS de follaje y de la MS radical mostró diferencias altamente significativa para la interacción dosis de HTP's x dosis de Tw (Cuadro 3.4; Apéndice, Cuadro 6.10). En la Figura 3.2 se observan diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$) por efecto de esta interacción en los 15 tratamientos (Apéndice, Cuadro 6.9). Los 14 tratamientos sometidos a estos dos factores presentan mayor acumulación de MS del follaje y MS radical respecto al testigo. Se identificó tendencia directamente proporcional de la MS del follaje y MS radical con la dosis de Tw entre tratamientos, sin y con dosis de HTP's.

La mayor producción de MS del follaje (68.8 g) se observó en suelo testigo con 5% de Tw (T3) y la menor (29.6 g) en el tratamiento testigo. Sobresale que la mayor MS radical (16.5 g) se formó en el tratamiento con 90 000 mg kg⁻¹ HTP's y 5% de Tw (T15), y la menor (1.2 g) en tratamiento testigo (Figura 3.2). La relación MS follaje/ MS radical fue mayor en suelo testigo respecto a las 14 relaciones en los tratamientos con petróleo.

Cuadro 3.6. Correlación entre variables de la planta en respuesta a las dosis de HTP's y Tw.

	Tw	PJ	LE	TCR	CLa	CLb	CLt	MSF	MSR	MST	VR
HTP's	NS	**	NS	*	NS	NS	NS	-.**	**	NS	**
Tw		*	NS	NS	*	NS	*	*	*	**	*
PJ			NS	*	NS	NS	*	NS	**	*	**
LE				NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
TCR					NS	NS	NS	NS	*	NS	*
CLa						*	**	NS	NS	NS	NS
CLb							**	*	NS	*	NS
CLt								*	NS	*	NS
MSF									NS	**	NS
MSR										*	**
MST											NS

* Correlación es significativo a $P \leq 0.05$ y ** a $P \leq 0.01$. NS: no significativo.

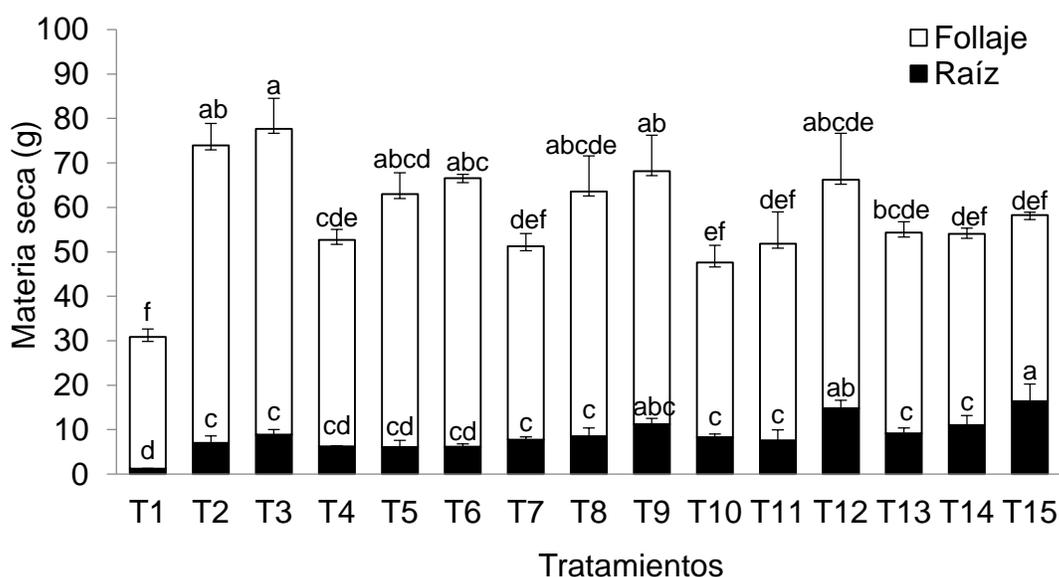


Figura 3.2. Variación en la producción de materia seca radical y del follaje de *Leersia hexandra* por efecto de dosis de Tw y de petróleo fresco a los 180 dds. Tratamiento (T). T1: 693 Biogénico. T2: 693+2.5. T3:693+5%. T4:4 000. T5:4 000+2.5. T6:4 000+5%. T7:30 000. T8:30 000+2.5. T9: 30 000+5%. T10:60 000. T11:60 000+2.5. T12:60 000+5%. T13: 90 000. T14:90 000+2.5. T15:90 000+5% de HTP's (mg kg⁻¹) y Tween 80 (%). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05).

3.6. DISCUSIÓN

3.6.1. Longitud de estolones, tasa de crecimiento relativo y número de plantas jóvenes

La presente investigación muestra la importancia del estudio del pasto *L. hexandra* en la adaptación a petróleo fresco y Tween® 80 en Gleysol en el trópico húmedo. Otros estudios en suelos contaminados con metales pesados han demostrado la

adaptación de este pasto al acumular hasta 2978 mg kg⁻¹ de cromo (Xue-Hong *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2011). En el caso de suelo con altos contenidos de HTP's pretratados con el surfactante Tween® 80, la adaptación del pasto mostró que crece a pesar de las condiciones de estrés. La LE a los 180 dds fue similar en los 15 tratamientos evaluados, y la producción de PJ y TCR fue mayor en los 14 tratamientos con petróleo y Tween® 80 respecto al tratamiento testigo.

Los resultados de TCR de 14 tratamientos registrados el día 60, fueron valores de 5 y 7 cm d⁻¹; después, a los 120 y 180 dds los valores disminuyeron y son semejantes a los valores reportados por Tejon (1978) en *L. hexandra*. Al respecto, según Grosshans y Kenkel (1997) y Awah *et al.* (2012) un factor determinante que explica la adaptación de *L. hexandra* a factores de estrés abióticos es su forma de crecimiento y multiplicación estolonífera que le permite invadir con mayor facilidad ambientes alterados por el hombre. En la formación de PJ de *L. hexandra* en suelo contaminado con petróleo y asistido con Tw, sobresalió la estimulación hasta en 70.6% cuando la planta fue expuesta a 90 000 mg kg⁻¹ HTPs y 5% de Tween® 80 (T15).

Esta estimulación positiva no ha sido mostrada en otros pastos tropicales, donde incluso se han observados efectos negativos. Al respecto Rivera-Cruz (2001) encontró disminución de 39.14% en el número de PJ en *Echinochloa polystachya* expuesta a 100 000 mg kg⁻¹ petróleo crudo.

La respuesta en el crecimiento de *L. hexandra* observado en esta investigación sugiere adaptación a petróleo y Tw. Una primera explicación de esta respuesta es que las plantas en suelos contaminados con petróleo están en condiciones similares a un estrés abiótico, ya que debido al efecto de la contaminación se presenta déficit de agua y de oxígeno así como baja disponibilidad de P en el suelo (Wyszkowska y Kucharski, 2000). Cuando las plantas están sujetas a estrés abiótico inducen aumento de moléculas reactivas de oxígeno (MRO) en sus células, lo que conduce a estrés oxidativo. Moléculas como O_2 , H_2O_2 y radicales OH^\cdot provocan daños a nivel de estructuras membranales y celulares, esto induce la inhibición del crecimiento vegetal (Liu *et al.*, 2009; Gill y Tuteja, 2010; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Oladane, 2014). En general las plantas responden a este estrés con mecanismos de defensa para protegerse del daño; pero se ha observado que las plantas con altos niveles de antioxidantes constituidos o inducidos tienen mejor resistencia al daño (Oladane, 2014). La adaptación controla los niveles de MRO por la regulación de una red de defensa antioxidantes que incluye reacciones enzimáticas, para evitar la toxicidad celular y asegurar sus funciones de señalización como son el control de la proliferación y muerte celular (Mittler, 2002). Una segunda explicación para el incremento de PJ es que la planta es estimulada por petróleo y Tw a la síntesis de etileno a nivel celular, lo que contribuye en el crecimiento vegetal, en particular el desarrollo embrionario (germinación y retoños): 1) mitosis y diferenciación celular, y 2) expansión celular y acumulación de reservas (proteínas, grasas y almidón) (Salisbury y Ross, 2000; Escaso *et al.*, 2010).

3.6.2. Pigmentos clorofilianos

La capacidad de adaptación de *L. hexandra* a las dosis de HTP's y Tw no manifestó cambios en la concentración de los pigmentos clorofilianos en esta planta por efecto de dosis del petróleo ni en la interacción (HTP's)(Tw). La disminución en clorofila es uno de los principales síntomas de clorosis manifestada por las plantas bajo estrés por niveles altos de hidrocarburos en el suelo; y ésta además de las variaciones en la relación clorofila/carotenoides está asociada al estrés ambiental, por lo que se ha considerado un buen indicador de estrés en la planta (Jangpromma *et al.*, 2010). La disminución de clorofila por exposición de la planta a hidrocarburos ha sido probado por Agnello *et al.* (2015) en hojas de *Medicago sativa* al utilizar Tween® 80 para estimular la degradación de hidrocarburos en el suelo. Otros estudios con pasto *Lolium multiflorum* evidenciaron disminución de la clorofila a al exponerlos de 3 000 a 15 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo (Cartmill *et al.*, 2014). Así mismo, Jajoo *et al.* (2014) encontraron disminución de 61.5 y 48.7% en el contenido de clorofila a en *Arabidopsis thaliana* expuesta a antraceno y pireno en el suelo, respectivamente. La concentración de clorofila en *L. hexandra* no mostró respuesta debido a la capacidad de esta planta para adaptarse al estrés por contaminación de HTP's.

En contraste, la adición de 5% de Tw indujo mayor contenido de clorofila total (19.09 µg cm²) en *L. hexandra* (Cuadro 3.5). El efecto del Tween® 80 en la concentración de clorofila total puede explicarse a la capacidad del surfactante para la degradación de las moléculas orgánicas de los HTP's y hacerlas

disponibles en la solución del suelo (Volkering *et al.*, 1998). También posiblemente a una mayor disponibilidad de N oxidado en la rizosfera (Escaso *et al.*, 2010) derivado del N fijado por las bacterias fijadoras de vida libre, el cual es utilizado por las plantas para la síntesis de la clorofila y la fotosíntesis (Salisbury y Ross, 2000), que según Cartmill *et al.* (2014) apoya el aumento de crecimiento de la planta fundamentado en la tolerancia al estrés.

3.6.3. Materia seca

Un efecto negativo de los HTP's en la MS del follaje de *L. hexandra* se identificó en esta investigación, pero en MS radical y VR de este pasto el efecto fue positivo. La disminución de MS del follaje del pasto se atribuye a que el petróleo forma una capa cerosa sobre los agregados del suelo y en la raíz, impide la disponibilidad de nutrimentos en el suelo y la asimilación por parte de la planta (Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003; Rivera Cruz *et al.*, 2004; Merkl *et al.*, 2005).

La estimulación de la MS radical y el VR posiblemente se debe que el estrés inducido en *L. hexandra* por el petróleo y el Tw estimuló la elongación celular y el crecimiento de la raíz en busca de espacios porosos y agua, debido a la biosíntesis de etileno que induce el aumento del número de raíces (Escaso *et al.*, 2010).

La dosis de Tw y la interacción (HTP's) (Tw) indican estimulación de los tres parámetros de producción en *L. hexandra*. Ambos contaminantes evaluados aparentemente estimularon el crecimiento del tejido vegetal a través de la

diferenciación de mayor cantidad de follaje y de raíces. En condiciones de estrés por petróleo se ha observado (Merkl *et al.*, 2005; Alanis y Guerrero, 2004) que si están presentes las bacterias promotoras del crecimiento vegetal, los exudados de la raíz estimulan su crecimiento, lo que a su vez disminuye el estrés al reducir la acumulación de etileno y facilita la toma de nutrientes y la degradación de contaminantes del suelo (Chaudhry *et al.*, 2005; Zhuang *et al.*, 2007). Las bacterias utilizan ACC (Enzima 1-aminociclopropano-1-carboxilato sintasa), es el precursor de etileno como fuente de N, lo que conlleva a una disminución de la síntesis de etileno; al prevenir la síntesis de etileno se ha observado tolerancia al estrés (Greenberge, 2007). La disminución del estrés se asocia a otras hormonas involucradas en el crecimiento radical como las auxinas, actúan para promover el desarrollo de los brotes y la formación de raíces laterales (Escaso *et al.*, 2010).

El resultado de la mezcla agua:aceite con el surfactante Tween® 80 es una emulsión, en donde se disuelve una parte del Tween en el agua y la otra parte en el aceite. La emulsión es un sistema estable, heterogéneo, de dispersión de un líquido a otro líquido inmiscible entre ellos, puede servir para el encapsulamiento a los hidrocarburos y después ser liberados en el sistema circulatorio de los seres vivos (Aranberri *et al.*, 2006), pero también en la solución del suelo los hidrocarburos en la emulsión se disponen como fuente de carbono y energía para los microorganismos, liberando nutrientes esenciales para la planta (Banat *et al.*, 2000). Algunos estudios indican que el uso de ácido giberélico (GA₃) y Tween® 80, para la recuperación de suelos contaminados con benzo(a)pireno, mejora el

crecimiento de *Tagetes patula* hasta en 55% con respecto al testigo. Así mismo Agnello *et al.* (2015) observaron tendencia de aumento en la biomasa de *Medicago sativa* al utilizar Tween® 80 en un suelo contaminado.

3.7. CONCLUSIONES

La elevada concentración de HTP's del petróleo fresco indujo la disminución de la producción de materia seca del follaje pero las dosis de HTP's, Tw y la interacción (DHTP's) (DTw) estimularon la longitud de estolones. La tasa de crecimiento relativo, la producción de nuevas plantas jóvenes, la materia seca radical y volumen radical aumento. Las concentraciones de clorofila a b y t no mostraron cambio alguno en *Leersia hexandra* demostrando con ello la tolerancia de este pasto a condiciones de estrés por HTP's. Los resultados de la aplicación de Tween® 80 en dosis de 2.5 y 5 % antes del transplante de *L. hexandra* permiten recomendarlo como pretratamiento en la fitorremediación de Gleysoles de fincas contaminadas hasta con 90 000 mg kg⁻¹ de HTP's del petróleo fresco para el trópico húmedo mexicano.

3.8. LITERATURA CITADA

- Agnello A. C., D. Huguenot, E. D. van Hullebusch, and G. Esposito. 2015. Phytotoxicity of Citric Acid and Tween® 80 for Potential Use as Soil Amendments in Enhanced Phytoremediation. *International Journal of Phytoremediation*. 17: 669-667.
- Alanis G. E., y L. I. Guerrero. 2004. Pseudomonas en biotecnología. *Revista Biotecnología*. 9: 26-37.

- Aprill W., and C.R. Sims.1990. Evaluation of the use of grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbons treatment in soil. *Chemosphere*. 20: 254-265.
- Aranberri I., B. P. Binks, J. H. Clint y P. D. I. Fletcher. 2005. Elaboración y caracterización de emulsiones estabilizadas por polímeros y agentes tensoactivos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. 7: 212-231.
- Awah T. M., D. Kuitcha, A. Magha, J. Ndjama, and B. V. K. Kabeyene. 2012. Occurrence of macrophytes in the Mezam river system in Bamenda (Cameroon) and their role in nutrient retention. *Syllabus Review, Science Series*.3: 1-10.
- Banat I. M., R. S. Makkar, and S. S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 495–508.
- Böhm W. 1979. Methods of studying root systems. In: ecological studies n° 33. Billing, W.D.F. Golley, O.L. Lange y J.S. Olson (Eds.). Springer Verlag. Berlin, Alemania. 188 p.
- Bouyoucos G. 1962. Hydrometer method for particle-size analysis of soils. *Agronomy Journal*. 54: 464-465.
- Cartmill A. D., D. L. Cartmill, and Alejandro-Alarcón. 2014. Controlled release fertilizer increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil. *International Journal of Phytoremediation*. 16: 285-301.
- Chaudhry Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta, and E. J. Joner. 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance

breakdown of organic pollutants in the environment. *Environmental Science and Pollution Research International* .12: 34-48.

Chen Y., X. Li, and Z. Shen. 2004. Leaching and uptake of heavy metals by ten different species of plants during an EDTA-assisted phytoextraction process. *Chemosphere*. 57: 187-196.

Chiariello N. R., H. A. Mooney, and K. Williams.1989. Growth, carbon allocation and cost of plant tissues”. *In: Percy R. W., J. Ehleringer, H. A. Mooney, P. W. Rundel. Plant physiological Ecology. Field methods and instrumentation.* Champsman Hill, London. pp. 327-366.

CONAGUA. 2014. “Normales Climatológicas por Estación”. www.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=168&tmpl=component.html. Accessed 06 enero 2015.

Escaso S. F., G. J. L. Martínez y C. M. R. Planelló. 2010. Fundamentos básicos de fisiología vegetal y animal. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 251p.

Farghaly A., A. Tawfik, and I. M. G. Eldin. 2015. Surfactant-supplemented mixed bacterial cultures to produce hydrogen from paperboard mill wastewater. *Engineering in Life Science*. 15:525-532.

Gill S. S., and N. Tuteja. 2010. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*. 48: 909-930.

Gould F. W., and R. B. Shaw. 1992. Gramíneas. Clasificación Sistemática. 1a. ed. AGT Editor, S. A. México. 381 p.

- Greenberg B. M. 2007. Field and laboratory test of multi-process phytoremediation system for decontamination of petroleum and salt impacted soils. *In: Proceeding of the 9th International in situ on site Remediation. Simposium BatellePress*.<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.503.6423&rep=rep1&type=pdf>.
- Grosshans R. E., and N. C. Kenkel. 1997. Dynamics of emergent vegetation along natural gradients of water depth and salinity in a prairie marsh: delayed influences of competition. *UFS Delta Marsh Annual Report*. 32: 83–93.
- Hunt R., D. R. Causton, B. Shipley, and P. Askew. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany*. 90: 485-488.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática). 2005. Cárdenas Tabasco. “Cuaderno estadístico municipal 2005-2004”. En: línea <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/estatal/tab/m002/index.htm>. Consultado 22 de junio de 2015.
- Jajoo A. N., R. Mekala, R. S. Tomar, M. Grieco, M. Tikkanen, and E. M. Aro. 2014. Inhibitory effects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) on photosynthetic performance are not related to their aromaticity. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 137: 151-155.
- Jangpromma N., P. Songsri, S. Thammasirirak, and P. Jaisil. 2010. Rapid assessment of chlorophyll content in sugarcane using a SPAD chlorophyll

- meter across different water stress conditions. *Asian Journal of Plant Sciences*. 9: 368-374.
- Jiménez C. B. E. 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México: Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. México DF. 926 p.
- Kim H. S., and W. J. J. Weber. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbon behavior in bioactive soil slurry reactors amended with a nonionic surfactant. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 268-276.
- Kapustka L., and M. Reporter. 1998. Terrestrial primary producers. *In*: P. Calow (ed.) Handbook of Ecotoxicology. Blackwell Science. Gran Britain. 294 p.
- Lee D. H., E. S. Kim, and H. W. Chang. 2005. Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater. *Geosciences Journal*. 9: 261-267.
- Liu H., D. Weisman, Y. Ye, B. Cui, Y. Huang, A. Colón-Carmona, and Z. Wang. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Sciences*. 176: 375-382.
- Liu J., C. Duan, X. Zhang, Y. Zhu, and X. Lu. 2011. Potential of *Leersia hexandra* Swartz for phytoextraction of Cr from soil. *Journal of Hazardous Materials*. 188: 85-91.
- Maldonado-Chávez E., M. C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes y D. J. Palma-López. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la

- biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 26: 121-136.
- Merkl N., R. Schultze-Kraft, and C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water, Air and Soil Pollution*. 165: 235-242.
- Mittler R. 2002. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*. 7: 405-410.
- Moran R. 1982. Formulae for Determination of Chlorophyllous Pigments Extracted with N, N-Dimethylformamide. *Plant Physiology*. 69: 1376-1381.
- Moreno-Medina U.C., L. M. Breton-Deval, E. Ríos-Leal, J. Barrera-Cortes, N. Rinderknecht-Seijas y M. Poggi-Varaldo. 2011. Incremento de la solubilización de percloroetileno con un tensoactivo no iónico. *Interciencia*. 36: 224-228.
- Olalekan A. 2014. The effect of palm kernel oil (PKO) biodiesel-contaminated soil on morphological and biochemical properties of *Zea mays*. *Journal Plant Biochemistry Physiology*. 2:1-6.
- Orozco-Soto M., M. Gutiérrez-Rojas y M. R. Peralta-Pérez. 2014. Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. en cultivo *in vitro*. *Polibotánica*. 38: 159-172.
- Page A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney. 1982. Nitrogen total. In: Page A. L., R. H. Miller, and D. R. Keeney (eds). *Methods of Soil Analysis*. Part 2.

- Chemical and Microbiological Properties. 2nd ed. ASA. SSSA. Madison, EEUU. pp. 595-629.
- Paria S. 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Advances in colloid and Interface Science*. 138: 24–58.
- 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.
- Plascencia J.R., E. R. Quintero y C. A. R. Quero. 2013. Fijación de nitrógeno en gramíneas de pastizal. *En: Quero CAR (ed.). Gramíneas introducidas: Importancia e impacto en ecosistemas ganaderos. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo de México. pp. 25-43.*
- Plice J. M. 1948. Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Soil Science Society American Proceedings*. 13: 413-416.
- Quiñones-Aguilar E.E., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez y A. Alarcón, 2003. Emergence and growth of maize in a crude oil polluted soil. *Agrociencia*. 37: 585-594.
- Rivera-Cruz M. 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 benzo(a)pireno. Tesis Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, México. pp. 348.
- Rivera-Cruz M. C. y A. Trujillo-Narcía. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29: 369-376.

- Rivera-Cruz M. C. 2011. Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco. In: *Recursos Genéticos Microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México*. Gamboa A.M. y Rojas H.R. (Eds). Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (Subnargem). Edit Morevalladolid. pp. 78-87.
- Rivera-Cruz M. C. 2011b. Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadores de perturbación causada por petróleo e inundación. *Agro-región*. 5: 12-15.
- Rivera-Cruz M. C. y A. Trujillo-Narcía. 2013. Dinámica de la biomasa vegetal y atenuación natural de los hidrocarburos del petróleo en un humedal del sureste de México. *En: Memoria XXXVIII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. La Paz, Baja California Sur, México. pp. 55-62.
- Rodríguez-Carrasquel S. 1983. Pasto alemán, para Caribe, Tannagrass, paja de agua, lambedora y Chi Guirera. *Revista de Difusión de Tecnología Agrícola y Pesquera del FONAIAP* No.12. Septiembre-Octubre 1983. Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas. Bolivia, Venezuela. 3 p.
- Rhoades J. 1982. Cation Exchange Capacity. In: Page A.L. (eds). *Methods of Soil Analysis. Parte 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. American Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison, WI, USA. pp. 178-190.
- Salisbury F. B. y C. W. Ross. 2000. Fisiología de las plantas: Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Thomson Editores. Madrid, España. 985 p.

- Sang-Hwan L., L. Won-Seok, L. Chang-Ho, and K. Jeong-Gyu. 2007. Degradation of phenanthrene and pyrene in rhizosphere of grasses and legumes. *Journal of Hazardous Materials*. 141: 519-525.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2005. User's Guide, Versión 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 664 p.
- Shcherbakova V. A., K. S. Laurinavichius, and V. K. Akimenko, 1999. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere*. 39: 1861-1870.
- Taiz L., and E. Zeiger. 1991. Plant Physiology. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood, California, USA. 550 p.
- Tekalign T., and P. S. Hammes. 2005. Growth and biomass production in potato grown in the hot tropics as influenced by paclobutrazol. *Plant Growth Regulation*. 45: 37-46.
- Tejo M. R. 1978. Efecto de la edad sobre el rendimiento del pasto lambedora (*Leersia hexandra* Swartz) de una sabana inundable. *Agronomía Tropical*. 28: 527-540.
- Trujillo-Narcía A., M. C. Rivera-Cruz, L. C. Lagunes-Espinoza, D. J. Palma-López, S. Soto-Sánchez y G. Ramírez-Valverde. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 28: 361-374.
- Vegetti A. C. 2002. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de Oryzeae (Poaceae). *Candollea*. 57: 251-260.

- Volkering F., A. M. Brear, and W. H. Rulkens. 1998. Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation*. 8: 401–417.
- Walkley A., and I. A. Black. 1934. An examination of Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38.
- Wyszkowska J., and S. Kucharki. 2000. Biochemical properties of soil contaminated by petrol. *Polish Journal Environ Studies*. 9: 479-485.
- Xue-Hong Z., L. Jie, H. Hai-Tao, C. Jun, Z. Yi-Nian, and W. Dun-Qiu. 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*. 67: 1138-1143.
- Zhuang X., J. Chen, H. Shim, Z. Bai. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. 33: 406-413.

CAPÍTULO IV

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA BIORREMEDIACIÓN NATURAL, QUÍMICA Y LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO EN UN GLEYSOL

4.1. RESUMEN

Se analizaron tecnologías de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) que incluyen la biorremediación microbiana natural (BM) y la fitorremediación (FR) con *Leersia hexandra* Swartz, y una combinación de dos dosis químicas (QM1, QM2) con Tween® 80 (Tw). Se evaluaron las bacterias y hongos heterótrofos (BH, HH), bacterias y hongos hidrocarbonoclastas (BHCT's, HHCT's), remoción de los HTP's (%Rem), materia seca del follaje (MSF) y de la raíz (MSR). Los resultados mostraron que las BH tuvieron mayor población en la FR, pero las BHCT's, HH y HHCT's fueron mayores en la BM+QM1 y BM+QM2. La remoción de los HTP's fue más alta en la tecnología integrada por BM+QM1 con un 93%, asociada con el aumento de la MSR estimulada por los HTP's y el Tw, pero la MSF fue reducida por el Tw. Se concluyó que la BM+QM es una tecnología efectiva y limpia para el medio ambiente. Además, el Tw estimuló el crecimiento de la raíz pero redujo significativamente la parte aérea vegetal durante el proceso de FR con *Leersia hexandra* al aumentar el contenido de HTP's.

Palabras clave: *Leersia hexandra*, microorganismos, tecnologías de recuperación, Tween® 80.

CHAPTER IV

COMPARATIVE ANALYSIS OF NATURAL BIOREMEDIATION, CHEMICAL REMEDIATION AND PHYTOREMEDIATION OF PETROLEUM HYDROCARBONS IN A GLEYSOL SOIL

4.2. ABSTRACT

Remediation technologies of contaminated soils with total petroleum hydrocarbons (HTP's) were analyzed: Natural microbial bioremediation (BM), phytoremediation (FR) with *Leersia hexandra* Swartz, and a combination between two chemical dose (QM1, QM2) and Tween®80 (Tw). Heterotrophic bacteria and fungi (BH, HH), hydrocarbonoclastic bacteria and fungi (BHCT's, HHCT's), removal of HTP's (% Rem), leaf (MSF) and root dry matter (MSR) were assessed. The results showed that the BH population was significantly higher when applied the FR technology, while BHCT's, HH and HHCT's were more superior by the BM+QM1 and BM+QM2 technology applications than the other technologies. Likewise, the removal of HTP's was significantly highest in the BM+QM1 technology with 93% Rem. The MSR was stimulated by the Tw and HTP's, but MSF was significantly reduced by Tw. It might be concluded from these results that BMN+Q is an effective and clean technology for the environment. In addition, root growth was stimulated and shoot growth was reduced with Tw application on FR using *Leersia hexandra* when the contamination was increased.

Key words: *Leersia hexandra*, microorganisms, recovery technologies, Tween®

80.

4.3. INTRODUCCIÓN

El petróleo es la principal fuente de energía para las actividades humanas. Su uso como energético y materia prima para la producción de diversos derivados genera problemas ambientales (Shanidul y Tanaka, 2004; Raiger y López, 2009). En México la industria extractiva del petróleo tiene infraestructura que interactúa con los ecosistemas terrestres que conducen petróleo crudo de los pozos de perforación a las petroquímicas (PEMEX, 2009). Algunos suelos aledaños a instalaciones petroleras contienen hidrocarburos del petróleo por arriba de los límites máximos permisibles, lo cual induce cambios en la estructura y en los bioprocesos del ecosistema (Ortíz *et al.*, 2003; López *et al.*, 2006; Adams *et al.*, 2008; Delgadillo-López *et al.*, 2011; Zamora *et al.*, 2012; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012). Los hidrocarburos derivados del petróleo son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos para los seres vivos (Pothuluri y Cerniglia 1994), por ello es necesario atenuarlos de manera natural y/o artificial. La atenuación se realiza con tecnologías físicas, químicas y biológicas. Al respecto, los microorganismos autóctonos estimulados con agua y luz solar es una tecnología pasiva debido a que depende de procesos naturales para degradar y disminuir los contaminantes en el suelo (Kao, 2001). Este proceso de remediación *in situ* es llamado biorremediación natural y/o atenuación natural, es una práctica con relación costo-beneficio óptima y de bajo riesgo (Corona-Ramírez e Iturbe-Argüelles, 2005), además depende de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores, oxígeno disuelto, del nivel de nutrientes y de la biodisponibilidad de los contaminantes (Menéndez *et al.*, 2007).

A diferencia del proceso natural, la atenuación artificial de los hidrocarburos del petróleo se realiza con tecnologías químicas y biológicas. Las químicas han demostrado que son rápidas y eficientes para removerlos, pero según el solvente que se utilice ocasionan daños colaterales al sistema (Seoáñez *et al.*, 1999). Los surfactantes son rápidos y tienen la capacidad para disminuir la tensión superficial de los líquidos, forma emulsiones en tiempos cortos, mejora la absorción y la biodisponibilidad para los microorganismos (Cheng y Wong, 2006). La biodisponibilidad ocurre por la combinación de una molécula fuertemente hidrofóbica con un grupo fuertemente hidrofílico. Esta combinación induce la interfase entre un medio acuoso y otra fase que puede ser aire, aceite o partículas (Jiménez, 2001). El Tween® 80 es un surfactante no iónico, con baja concentración micelar crítica (Moreno-Medina, 2011), no es tóxico, por lo tanto no inhibe la densidad de los microorganismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999) y su biodegradación alcanza hasta 45% en un periodo de 168 h (Torres *et al.*, 2006). La fitorremediación es una tecnología biológica lenta pero segura, que utiliza plantas verdes nativas e introducidas, microorganismos rizosféricos y técnicas agronómicas para degradar o transformar los contaminantes orgánicos e inorgánicos a compuestos menos tóxicos o menos móviles (Cunningham *et al.* 1996; Pilon-Smits, 2005). No todas las plantas toleran contaminantes, los pastos son aptos y se han probado (Rivera-Cruz, 2004; White *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2011; Rivera-Cruz *et al.*, 2012; Cartmill *et al.*, 2014) para restaurar suelos porque producen una red de raicillas que llegan hasta 2.7 m de profundidad (Gould y Shaw, 1992). Otras ventajas de las plantas es que estimulan el crecimiento

poblacional de los microorganismos, los cuales utilizan los hidrocarburos contaminantes como fuente de carbono y energía (Álvarez, 2015), oxidándolos y convirtiéndolos en otros productos menos tóxicos y en metabolitos intermediarios (Madigan *et al.*, 2004). En humedales del sureste de México contaminados con hidrocarburos del petróleo se ha reportado la presencia de *Leersia hexandra* Swartz como un pasto con rizosfera que hospeda microorganismos benéficos para las plantas (Rivera-Cruz, 2011) y tolerante a los hidrocarburos y a Tween® 80 (González-Moscoso *et al.*, 2015).

El objetivo de este estudio fue realizar un análisis comparativo del efecto de la biorremediación microbiana natural, la fitorremediación con *L. hexandra* y el efecto del surfactante Tween® 80 en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo fresco acumulado en el suelo.

4.4. MATERIALES Y MÉTODOS

El bioensayo se llevó a cabo durante 180 días bajo condiciones semicontroladas en microtúnel en el Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, localizado en H. Cárdenas, Tabasco (17° 58'36.22" N y 93° 23'11.0" O), a 10 msnm, en clima tropical húmedo con lluvias abundantes en verano y temperatura media de 26 °C. La precipitación pluvial promedio anual es de 2220 mm y altitud de 20 msnm (INEGI, 2005).

4.4.1. Características del suelo

El suelo testigo fue colectado de la capa superficial (0-30 cm) de un suelo clasificado como Gleysol en el ejido Blasillo 2a. Sección, La Venta, Huimanguillo Tabasco, en el SE de México (18° 03' 08" N y 93° 56' 6.3" O). El suelo se secó bajo sombra, se molió manualmente y se pasó por un tamiz de cinco mm de abertura. La textura es arcillo limosa (método hidrométrico; Bouyoucos, 1962), el pH es moderadamente ácido (5.43) (DOF, 2013); el contenido de materia orgánica es muy alto (29.98%) (Walkley y Black, 1934), alto contenido de sulfato (175.33 mg kg⁻¹) (Etchevers, 1992), muy alta capacidad de intercambio catiónico (48.92 cmol kg⁻¹) (Rhoades, 1982) y niveles muy bajos de HTP's (693 mg kg⁻¹) (González-Moscoso *et al.*, 2015) determinados por extracción con didiclorometano en equipo soxhlet según el método 418.1 (EPA, 1986).

4.4.2. Propiedades del petróleo y surfactante

El petróleo fresco crudo mediano Istmo (36.36 °API) fue obtenido de la Batería 5 del Campo petrolero Cinco Presidentes (18° 12' 11.8" N y 94° 08' 37.8" O), localizado en la región noroeste de Tabasco, en la zona limítrofe con el estado de Veracruz. La composición del crudo es 56.4% de hidrocarburos saturados, 23.7% de aromáticos y 14% de polares/NHC (Dorn *et al.*, 1998). El petróleo fue usado para simular la contaminación del suelo después de un derrame de aceite fresco y someterlo a tratamiento, durante seis meses consecutivos, con atenuación natural (biorremediación natural estimulada con agua) y emulsión con surfactante y plantado con *L. hexandra*.

La emulsión surfactante utilizada fue el Tween® 80 (Monooleato de sorbitan polioxietileno) que es un surfactante no iónico, también conocido como Polisorbato 80. Características: es un líquido amarillo, viscosidad a 25 Pa.s, 425 cps, balance hidrofílico-lipofílico (HLB) de 4-6.

4.4.3. Colecta y producción de plántulas

L. hexandra es un pasto forrajero perenne, tiene un sistema de raíz ramificado, fibroso y estolonífero. Se colectó en una finca con suelo contaminado con petróleo intemperizado, en el ejido José Narciso Roviroso, a dos kilómetros al suroeste del Complejo Procesador de Gas La Venta, Huimanguillo, Tabasco (18° 4' 37.05" N y 94° 2' 28.3" O). Se seleccionaron vástagos de cinco cm de longitud con yemas maduras; con este material se estableció un almácigo en charolas cónicas de plástico (52 cm de largo por 27 cm de ancho), se seleccionaron las plántulas con altura de 20.5 ± 3.5 cm.

4.4.4. Diseño y configuración experimental

El experimento se realizó bajo un diseño completamente al azar con arreglo factorial 4x3x2, con cuatro concentraciones de petróleo fresco, tres dosis de Tween® 80 y dos de planta (Cuadro 4.1). En total fueron 24 tratamiento agrupados en seis tipos de tecnologías para la recuperación del suelo con petróleo fresco: biorremediación microbiana natural (BM), fitorremediación (FR), químicas usando el Tween® 80 en dosis de 2.5 (QM1) y 5% (QM2), fitorremediación más Tween® 80 (FR+QM1 y FR+QM2).

Cuadro 4.1. Caracterización de los tratamientos de experimentales

HTPs (mg kg ⁻¹)	Tween® 80 (%)	Tecnología	Tratamiento	Tecnología	Tratamiento
		Sin planta		Con planta	
C0:693 ^{biogenico}	0	BM	1	FR	13
	2.5	BM+QM1	2	FR+QM1	14
	5	BM+QM2	3	FR+QM2	15
C1:26346	0	BM	4	FR	16
	2.5	BM+QM1	5	FR+QM1	17
	5	BM+QM2	6	FR+QM2	18
C2:48748	0	BM	7	FR	19
	2.5	BM+QM1	8	FR+QM1	20
	5	BM+QM2	9	FR+QM2	21
C3:76585	0	BM	10	FR	22
	2.5	BM+QM1	11	FR+QM1	23
	5	BM+QM2	12	FR+QM2	24

C: Concentración. BM: Biorremediación microbiana natural. FR: Fitorremediación. QM1: Química (2.5% Tween® 80). QM2: Química (5% Tween® 80).

El petróleo fue incorporado en el suelo y se homogenizó en forma manual. Se extrajo una muestra por triplicado, para determinar la concentración inicial, con equipo soxhlet (EPA, 1986), los resultados son 693 mg kg⁻¹ para los tratamientos (1,2,3,13,14 y 15); 26,346 mg kg⁻¹; para (4,5,6,16,17 y 18) tratamientos; 48,748 mg kg⁻¹ corresponden a los (7,8,9,19,20 y 21) tratamientos y 76,585 mg kg⁻¹. para (10,11,12,22,23 y 24) tratamientos. El Tween® 80 se agregaron 37.5 g de Tw en 382.5 mL de agua y 75 g en 345 mL de agua al suelo con petróleo, y se mezcló manualmente en cada unidad experimental. Cada unidad experimental fue mantenida en reposo durante 48 h en condiciones de luz. En cada unidad experimental se trasplanta una plántula de *L. hexandra* de (20.5 ± 3.5 cm de altura). Cada unidad fue mantenida bajo inundación por adicionar agua potable a un nivel de cinco cm de lámina de agua durante los 180 días, simulando las

condiciones de saturación predominantes en el humedal donde se colectó el suelo y el pasto *L. hexandra*.

4.4.5. Variables evaluadas

4.4.5.1. Población de bacterias y hongos

Se aplicó el método de cuenta viable por dilución seriada por siembra en superficie (Madigan *et al.*, 2009) para cada uno de los cuatro grupos microbianos. La población de bacterias heterótrofas (BH) se creció en agar nutritivo (Baker®), los hongos heterótrofos (HH) en papa-dextrosa agar (PDA) (Baker®), las bacterias hidrocarbonoclastas (BHCT's) y los hongos hidrocarbonoclastas (HHCT's) crecieron en medio de celulosa agar (por litro: agar 20.00 g, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g, KH₂PO₄ 0.5 g, KCl 0.2 g, MgSO₄·7H₂O 0.2 g, CaCl 0.1g, extracto de levadura 0.5 g; pH 6) (Johnson y Curl, 1972) y 200 µL de petróleo fresco como fuente de carbono y energía. La incorporación del petróleo en el medio de cultivo se ilustra en la Figura 4.1a. La cuenta viable se realizó en los 24 tratamientos por triplicado. Las cajas Petri sembradas se colocaron en bolsas de plástico para incubarlas a 28 °C durante 48 h para BH, 72 h para HH y 96 h para BCT's y HHCT's. En cada grupo microbiano se realizó el conteo de UFC g⁻¹ por gramo de suelo y/o de suelo rizosférico.

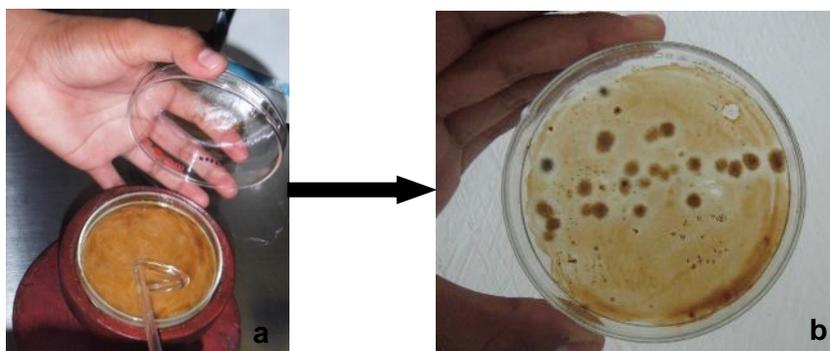


Figura 4.1. a) Incorporación de petróleo crudo en el medio de cultivo en caja Petri b) colonias de hongos hidrocarbonoclastas crecidos en petróleo como fuente de carbono y energía.

4.4.5.2. Remoción de petróleo fresco

La remoción de petróleo fresco se evaluó con la concentración de HTP's contenidos en el suelo al inicio del experimento respecto a los contenidos del día 180. La extracción se efectuó con diclorometano en equipo soxhlet durante ocho horas según la rutina de la EPA 418.1 modificado para suelo y sedimentos (EPA, 1986). Se cuantificó por gravimetría por el procedimiento adaptado de la NMX-AA-134-SCFI-2006 (Consuegra, 2006).

4.4.5.3. Biomasa del follaje y radical seca

Al día 180 fue colectada de cada unidad experimental el área del follaje (BSF) y la raíz (BSR). Las muestras fueron secadas en un horno eléctrico a 70°C por cinco días, y se pesaron en balanza semianalítica.

4.4.6. Análisis estadístico

Los datos de las variables en estudio fueron evaluados aplicando análisis de varianza (ANDEVA) para determinar las diferencias entre tratamientos aplicados al suelo. Las diferencias entre medias se realizó con la prueba de diferencia significativa (MDS) de Tukey ($P \leq 0.05$) y una correlación de Pearson mediante el programa estadístico del SAS, versión 9.1 (SAS, 2005).

4.5. RESULTADOS

4.5.1. Poblaciones de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas

El análisis de varianza mostro diferencias altamente significativas para todas las variables en estudio (Cuadro 4.2). Las medias de las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH) y bacterias hidrocarbonoclastas (BHCT's) a los 180 días tuvieron diferencias estadísticas significativas para las tecnologías de recuperación de suelos con petróleo ($p \leq 0.05$), (Cuadro 4.3; Apéndice, Cuadro 6.11). Las poblaciones más altas de BH (19×10^9 UFC g^{-1} s.s.) se encontraron en la fitorremediación (FR). Las tecnologías de FR+QM1 y FR+QM2 fueron mejores en comparación con la BM.

Cuadro 4.2. ANDEVA de tres factores (concentración de hidrocarburos totales del petróleo, dosis de Tween® 80 y tipo de tecnología) a los 180 días.

Variable	Concentración de HTPs (HTP's)	Dosis de Tween® 80 (Tw)	Tipo de tecnologías (TT)	Interacción (HTP's*Tw*TT)
BH	**	*	**	**
BHCT's	**	**	**	**
HH	**	**	**	**
HHCT's	**	**	**	**
%Rem	**	**	**	**
MSF	**	**	**	**
MSR	**	**	**	**

BH: Bacterias heterótrofas. BHCT's: Bacterias hidrocarbonoclastas. HH: Hongos heterótrofos. HHCT's: Hongos hidrocarbonoclastas. %Rem: Porcentaje de remoción. MSF: Materia seca del follaje. MSR: Materia seca radical. *.** P ≤ 0.05, 0.01. Significativa y altamente significativa.

La población de BHCT's fue mayor (15×10^3 UFC g⁻¹ s.s.) en suelo con 76,585 mg kg⁻¹ de HTP's respecto a la BMN+QM1. La BM tuvo una población (14×10^3 UFC g⁻¹ s.s.) en 26,346 mg kg⁻¹ de HTP's. Esto indica que las BCHT's fueron estimuladas por las concentraciones de HTP's y mayor población que la FR.

Cuadro 4.3. Poblaciones de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas en diferentes tecnologías de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo, a los 180 días.

HTP's (mg kg ⁻¹)	Bacterias heterótrofas (BH)					
	BM	FR	BM +QM1	FR +QM1	BM +QM2	FR +QM2
10 ⁴ UFC g ⁻¹ suelo seco.....					
693	9d¶	340000cd	29d	23000d	19d	1630000ab
26346	115d	1980000a	36d	180000cd	23d	1190000b
48748	78d	590000bc	40d	130000cd	45	1620000ab
76585	113d	1210000b	51d	1550000ab	83d	280000cd
	Bacterias hidrocarbonoclastas (BHCT's)					
	BM	FR	BM +QM1	FR +QM1	BM +QM2	FR +QM2
10 ¹ UFC g ⁻¹ suelo seco.....					
693	945cd	218j	865fghi	357ij	430hij	505ghij
26346	989c	612efgh	696fghij	535fghij	491ghij	408hij
48748	1481a	1456a	1017bcde	1117abc	980bcd	625efghij
76585	799cdef	1094abcd	1524a	976bcde	1266ab	1196abc

¶ Letras diferentes por columna son estadísticamente diferentes (Tukey P ≤ 0.05, n=3).

4.5.2. Poblaciones de hongos heterótrofos e hidrocarbonoclastas

Las poblaciones de hongos heterótrofos (HH) y hongos hidrocarbonoclastas (HHCT's) a los 180 días tuvieron diferencias estadísticas significativas en los tipos de tecnologías de recuperación de suelos contaminados (p≤0.05), (Figura 4.2. Cuadro 4.3; Apéndice, Cuadro 6.11). La población de HH fue mayor (40 x 10¹ UFC g⁻¹ s.s.) en 693 mg kg⁻¹ HTP's con la BM+QM2, aunque disminuyó conforme

aumentó la concentración de HTP's. La BM en 48748 mg kg⁻¹ de HTP's tuvo la mayor población (34x10¹ UFC g⁻¹ s.s.).

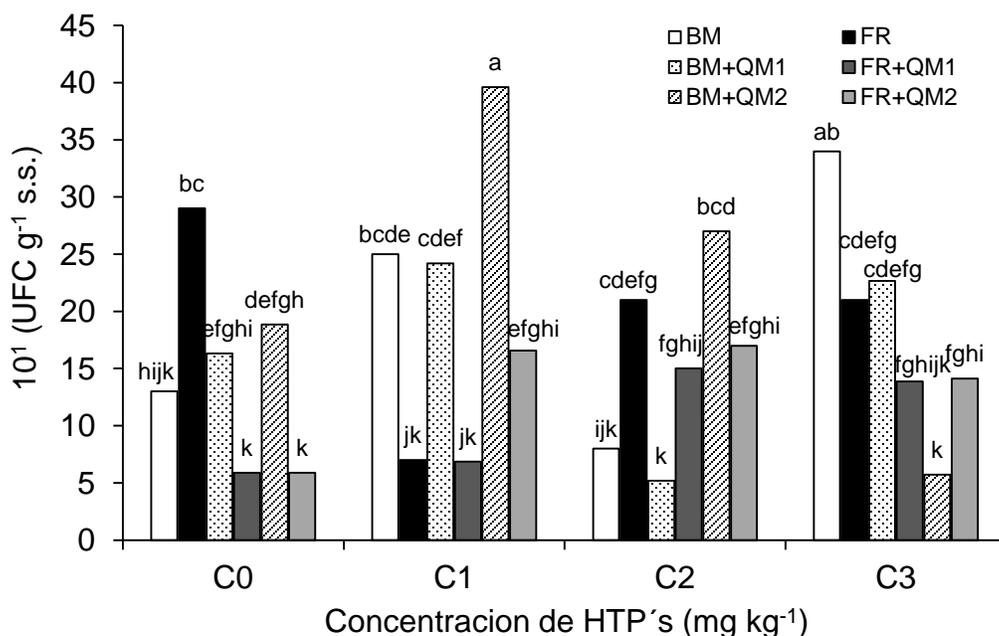


Figura 4.2. Poblaciones de hongos heterótrofos en diferentes tecnologías de recuperación de suelo contaminados con petróleo fresco, a los 180 días. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$, $n=3$). Concentración de HTP's. C0: 693 mg kg⁻¹. C1: 26346 mg kg⁻¹. C2: 48748 mg kg⁻¹. C3: 76585 mg kg⁻¹.

La mayor población de HHCT's (57X10¹ UFC g⁻¹ s.s.) se encontró en 693 mg kg⁻¹ (testigo de la BM) sin embargo ésta disminuyó conforme aumentó la concentración de HTP's. Aún con la disminución la población de HHCT's fueron mayores que las poblaciones que crecieron en suelo tratado con FR. En la BM+QM1 creció la

segunda mayor población de HHCT's (43×10^1 UFC g^{-1} s.s.) en 693 mg kg^{-1} de HTP's, y disminuyó por efecto de altas concentraciones de HTP's.

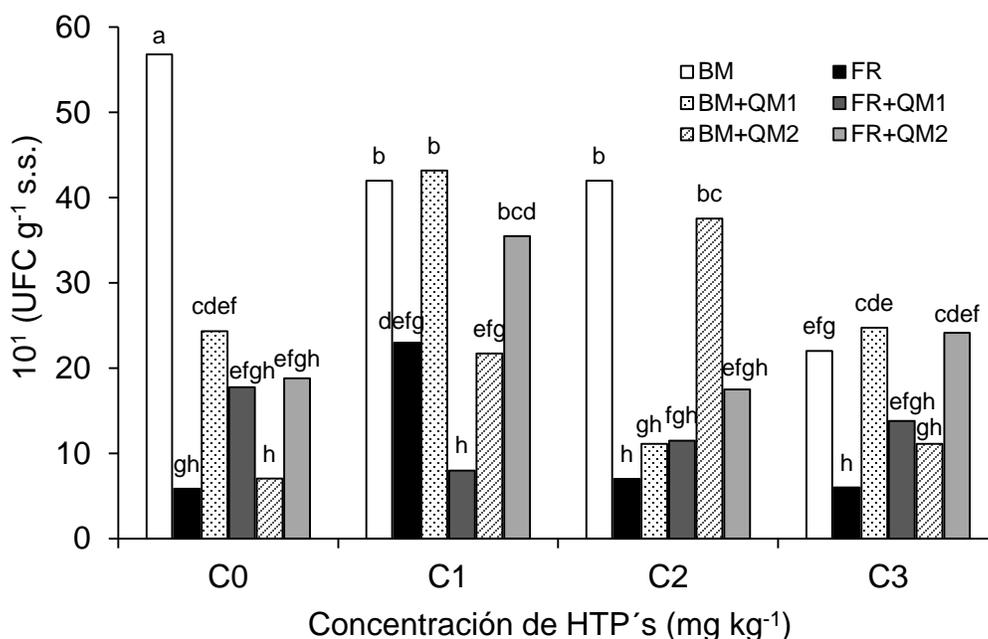


Figura 4.3. Poblaciones de hongos hidrocarbonoclastas en diferentes tecnologías de recuperación de suelo contaminados con petróleo fresco, a los 180 días. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$, $n=3$). Concentración de HTP's. C0: 693 mg kg^{-1} . C1: 26346 mg kg^{-1} . C2: 48748 mg kg^{-1} . C3: 76585 mg kg^{-1} .

4.5.3. Remoción de petróleo fresco

La remoción del petróleo a los 180 días mostró diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) (Figura 4.4. Cuadro 4.3; Apéndice, Cuadro 6.11). La mayor remoción fue del 95% y se presentó con la concentración C2 (48748 mg kg^{-1} HTP's) y 2.5% de Tw en suelo sin planta. En general todos

los tratamientos sin planta tuvieron mayor remoción en comparación con los de planta. La menor remoción fue del 37.3% en el tratamiento con planta en C3 y 5% Tw (*Leersia hexandra* y 79521 mg kg⁻¹ de HTP's).

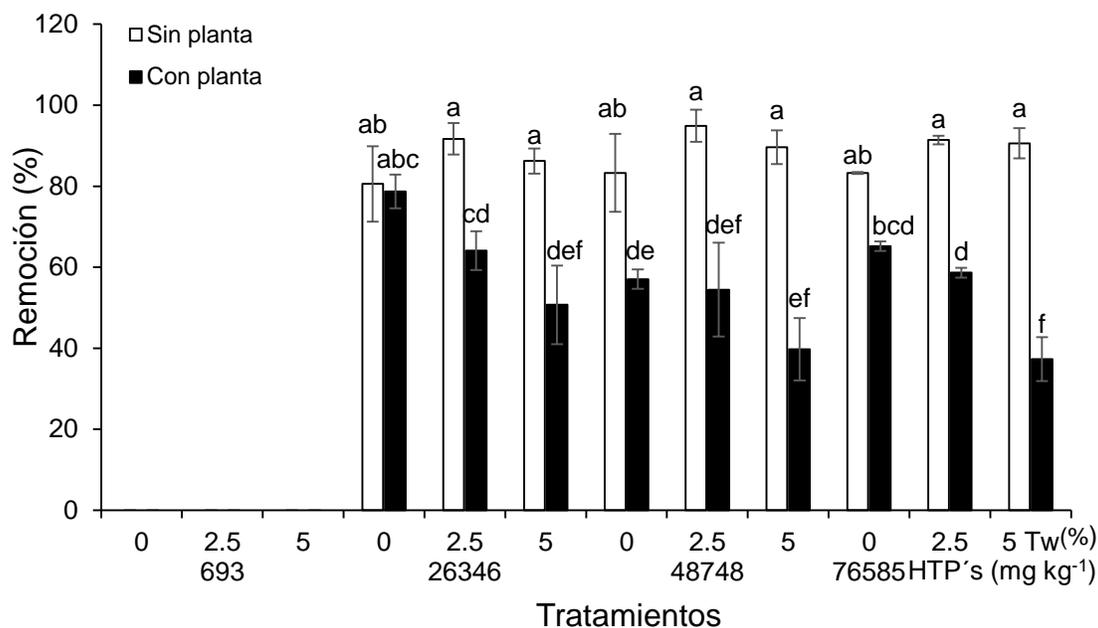


Figura 4.4. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo según los tratamientos, a los 180 días. Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $P \leq 0.05$, $n=3$).

En la Figura 4.5 se muestran diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de los tipos de tecnología de recuperación de suelos contaminados con petróleo fresco y el efecto de estas mismas sobre la remoción. La mejores tecnologías fueron la BM+QM1 removió un 93% y la BM+QM2 indujo una menor remoción un 89% de la

concentración de HTP's. La tecnología de FR con *L. hexandra* fue menor en un 18.2% de remoción que la BMN, sin embargo las tecnologías de FR+QM1 y FR+QM2 removieron la menor cantidad de HTP's. La tecnología con menor remoción (43%) fue FR+QM2 y la remoción es menor en un 53.7% en comparación con la mejor tecnología (BM+QM1).

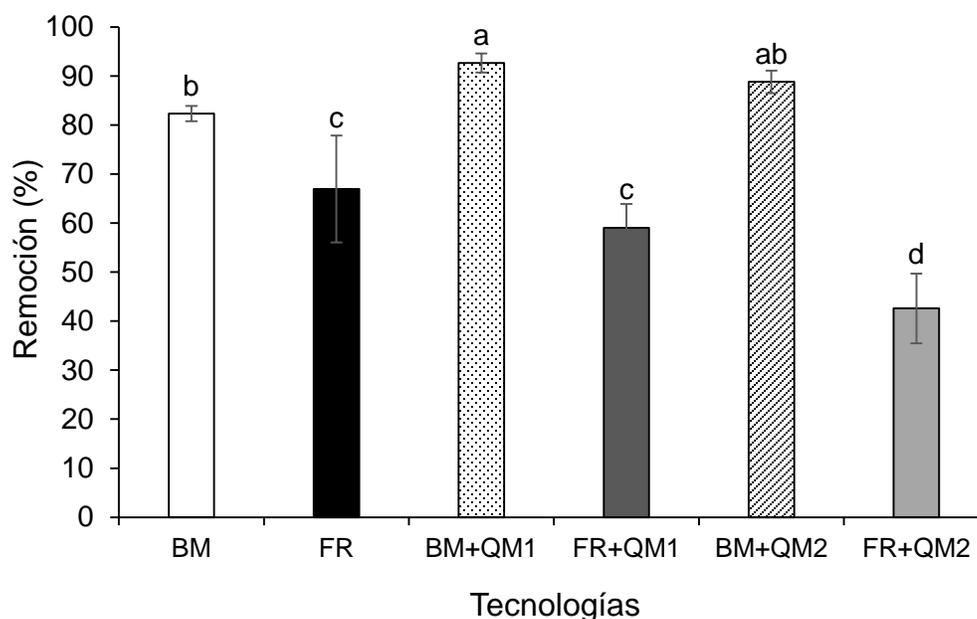


Figura 4.5. Efecto de las tecnologías de recuperación de suelos contaminados con petróleo en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's). Barras con diferentes letras son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$). **BMN:** Biorremediación microbiana nativa. **FR:** Fitorremediación. **BMN+QM1:** Biorremediación microbiana nativa + 2.5% de Tween® 80. **FR+QM1:** Fitorremediación + 2.5% de Tween® 80. **BMN+QM2:** Biorremediación microbiana nativa + 5% de Tween® 80. **FR+QM2:** Fitorremediación + 5% de Tween® 80.

4.5.4. Producción de biomasa vegetal

El Cuadro 4.4 muestra diferencias significativas ($p \leq 0.05$), en la producción de MSF y MSR de *Leersia hexandra* a los 180 días, así como el efecto que causaron las diferentes concentraciones de HTP's y las dosis de Tw. La mayor producción de MSF se observó en el control (C0: 693 mg kg⁻¹ de HTP's) + 5% de Tw, fue de 68.8 g tejido vegetal seco. El aumento de la concentración de HTP's y de la dosis de Tw originaron efecto tóxico, disminuyendo la MSF. En contraste la MSR tuvo un efecto positivo por las concentraciones altas de HTP's y las dosis de Tw. El aumento fue directamente proporcional a lo que se aplicó. La mayor producción de MSR fue de 16.3 g en 48748 mg kg⁻¹ de HTP's y 5% de Tw.

4.6. DISCUSION

4.6.1. Microorganismos

Las BH incrementaron su población en suelos probados con las tecnologías FR, FR+QM1 y FR+QM2; la mayor población creció en la FR (19x10⁹ UFC g⁻¹ s.s) (Cuadro 4.2). Las poblaciones de BH en la BM fueron bajas en comparación con las de FR. Esto se debe a que la fitorremediación utiliza plantas y bioestimula al suelo con el sistema rizosférico en donde los exudados radicales orgánicos derivados de la fotosíntesis se depositan (Barea y Azcón-Aguilar, 1982). El espacio rizosférico contiene; aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, proteínas, compuestos fenólicos entre otros, que es benéfico para que se establezcan y desarrollen procesos metabólicos microorganismos benéficos para la planta y el

ambiente (López-Martínez *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2007; Muñoz-Castellanos *et al.*, 2010).

Cuadro 4.4. Producción de la materia seca del follaje y radical de *Leersia hexandra* a los 180 días por efecto de la concentración de hidrocarburos totales del petróleo y la dosis de Tween® 80.

Dosis de Tween® 80 (%)	Concentración de HTP's (mg kg ⁻¹)							
	C0		C1		C2		C3	
	MSR (g)	MSR	Efecto& (%)	MSR	Efecto (%)	MSR	Efecto (%)	
0	1.24c¶	7.7b	+521	8.2b	+561	7.2b	+480	
2.5	7b	8.5b	+21	10.4b	+48	11ab	+57	
5	8.2b	11.2ab	+36	14.8a	+80	16.3a	+99	
	MSF (g)	MSF		MSF		MSF		
0	29.6e	43.5cde	+47	39.3de	+33	45.1cde	+52	
2.5	66.9ab	55abcd	-18	44.2cde	-34	42.9cde	-36	
5	68.8a	56.9abc	-17	42.9bcd	-38	41.8cde	-39	

C0: 693 mg kg⁻¹. C1: 26346 mg kg⁻¹. C2: 48748 mg kg⁻¹. C3: 76585 mg kg⁻¹. & Efecto positivo (+) o negativo (-) en relación con el tratamiento con 693 mg kg⁻¹ de HTP's y las dosis de Tween® 80. ¶ Valores con diferente letra son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05, n=3).

También se ha reportado que el sistema radical mejora las propiedades físicas y químicas de los suelos contaminados mediante su aireación (Shaw y Burns, 2003). En particular, los pastos con un sistema radical denso favorecen este mecanismo por lo que han sido utilizados en la fitorremediación (Rivera Cruz *et al.*, 2012; Cartmill *et al.*, 2014).

Las BHCT's formaron la mayor población (15x10³ UFC g⁻¹) a una concentración alta de petróleo (76585 mg kg⁻¹ de HTP's) en BM+QM1 en comparación con la FR (Cuadro 4.2). Las tecnologías sin planta indujeron poblaciones mas grandes

comparadas con la tecnología con *L. hexandra*. Esta misma respuesta sucedió para los HH y los HHCT's, donde las poblaciones fueron más grandes en la BM+QM2 (40×10^1 UFC g⁻¹ s.s) y BM (57×10^1 UFC g⁻¹ s.s), respectivamente (Figura 4.2. Figura 4.3). Esto parece indicar que hay una estimulación de microorganismos del suelo por efecto del Tw como tecnología química, en combinación con la BM.

La estimulación puede ser debido a que las dosis de Tw y las concentraciones de HTP's forman emulsión que mejora la disponibilidad de los contaminantes para ser utilizados como fuente de carbono y energía por los microorganismos (Banat *et al.*, 2000). Además, el Tw es poco tóxico para los microorganismos del suelo (Shcherbakova *et al.*, 1999). Los surfactantes son sustancias cuyas moléculas poseen un grupo polar y un grupo apolar. El grupo polar es en general un grupo funcional que contiene heteroátomos como O, S, N o P (Vokering *et al.*, 1998), los cuales son compuestos que después de un proceso de mineralización pueden ser asimilados por los microorganismos (Celaya-Michel y Castellanos-Villegas., 2011). Al parecer la sinergia entre la planta con el surfactante Tween® 80 induce competencia por nutrientes entre la planta y los microorganismos.

Cuadro 4.5. Correlación de Pearson´s entre las variables de tecnologías de fitorremediación sin y combinadas con Tween® 80, remoción de hidrocarburos totales del petróleo, microorganismos y producción de *L. hexandra*.

	BH	BHCT´s	HH	HHCT´s	MSR	MSF	%Rem
FR							
TPH	NS	*	NS	NS	*	*	*
BH		NS	_*	*	NS	*	*
BHCT´s			NS	NS	*	NS	*
HH				*	NS	_*	_*
HHCT´s					NS	NS	NS
MSR						*	**
MSF							*
FR+QM1							
TPH	*	*	*	NS	NS	*	NS
BH		NS	NS	NS	NS	NS	NS
BHCT´s			**	NS	NS	*	*
HH				NS	NS	_*	NS
HHCT´s					NS	NS	_*
MSR						NS	NS
MSF							_*
FR+QM2							
TPH	_*	*	NS	NS	*	_*	NS
BH		_*	NS	NS	NS	*	NS
BHCT´s			NS	NS	*	_*	NS
HH				NS	NS	_*	*
HCT´s					NS	NS	NS
MSR						_*	NS
MSF							_*

* Correlación significativo a $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. NS: no significativo

4.6.2. Remoción

La remoción de HTP´s fue estimulada por las seis tecnologías usadas en la presente investigación. La BMN+QM1 indujo la mayor remoción de HTP´s (93%) (Figura 4.5), además registró relaciones significativas entre HTP´s ($r=0.767^*$) y con BH ($r=0.654^*$) respecto al porcentaje de la remoción (Cuadro 4.5). La eficiencia de la biorremediación microbiana natural combinada con Tween® 80 fue previamente reportada por Lee *et al.* (2005), Cheng y Wong (2006), Zhang y Zhu

(2012) y también por Yanto y Tachibana (2014). Varios autores mencionan que la adición del surfactante en el suelo con petróleo fresco tiene varias funciones: 1) coadyuvante a los microorganismos del suelo para la degradación de los hidrocarburos y utilizarlos para su crecimiento (Corona-Ramírez y Iturbe-Argüelles, 2005); 2) forma una emulsión petróleo-agua que aumenta el metabolismo microbiano con el hidrocarburo, incrementa la actividad enzimática microbiana o bien facilita el transporte del sustrato orgánico de las células microbianas (Hadirabata y Tachibana, 2009), y 3) traslada el contaminante de una fase sólida a una fase acuosa, esta modificación incrementa la biodisponibilidad del hidrocarburo mediante la acción paralela de la desorción y solubilización del contaminante, permitiendo la transferencia de masa y biodegradación (Chu y Kwan, 2003; Urum et al., 2004; Cheng y Wong, 2006; Riojas *et al.*, 2010).

La fitorremediación de petróleo con *L. hexandra* y sin pretratamiento con Tw a los 180 dds logró remover 68% de HTP's, fue 25% menos que la biorremediación microbiana natural. La remoción inducida por FR indujo relaciones altamente significativas positivas con los HTP's ($r=0.639^*$), BH ($r=0.754^*$), BHCT's ($r=0.584^*$) y con la MSR ($r=0.923^{**}$), pero al pretratar el suelo con Tw antes de la fitorremediación, originó el decremento de la remoción y solo hubo relación positiva con BHCT's ($r=0.599^{**}$) y con HH ($r=0.789^*$) (Cuadro 4.6). Los niveles de remoción de hidrocarburos por pastos ha sido reportado por diversos autores, reconocen que es una tecnología de largo plazo (Rivera-Cruz *et al.*, 2004;

Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Liao *et al.*, 2015), y solo alcanza a remover entre 60 y 80% de HTP's a los 180 dds (Arias-Trinidad *et al.*, 2012).

Cuadro 4.6. Correlación de Pearson's entre las variables de tecnologías de biorremediación microbiana natural sin y con Tween® 80, remoción de hidrocarburos totales del petróleo y microorganismos.

	BH	BHCT's	HH	HHCT's	%Rem
BM					
TPH	*	NS	NS	-*	*
BH		NS	NS	-*	**
BHCT's			-*	NS	NS
HH				NS	NS
HHCT's					-*
BM+QM1					
TPH	*	*	NS	NS	*
BH		*	NS	NS	*
BHCT's			NS	NS	NS
HH				*	NS
HHCT's					NS
BM+QM2					
TPH	**	*	NS	NS	*
BH		*	-*	NS	NS
BHCT's			NS	NS	NS
HH				NS	NS
HCT's					*

* Correlación significativo a $P \leq 0.05$ y ** $P \leq 0.01$. NS: no significativo

4.6.3. Materia seca

El petróleo adicionado al suelo en cada una de sus dosis tuvo efecto positivo en la producción de MSR. La concentración de HTP's y las dosis de Tw estimularon la producción de la MSR, sin embargo la MSR solo se correlacionó (0.923** Cuadro 4.6) con la remoción en la FR sin Tw. La estimulación del Tw puede atribuirse a que es una fuente de carbono disponible (Ghosh, 1997), que libera nutrientes

esenciales (Banat *et al.*, 2000) que posiblemente fueron absorbidos por la planta de *L. hexandra*. Al respecto, Sun *et al.* (2013) mostraron que la aplicación de ácido giberélico (GA3) en suelos contaminados con benzo(a)pireno, el crecimiento de *Tagetes patula* aumentó 23% con respecto al testigo, pero el crecimiento aumentó hasta 55% cuando se añadió Tween® 80. Sin embargo, la MSR inducida en el suelo con tratamiento de FR con Tw no tuvo correlación con el porcentaje de remoción, tampoco con los microorganismos, sólo se correlacionó con la tecnología constiuida con FR+QM2 con las BHCT's (0.599*) (Cuadro 4.6). Esto se puede atribuir a que la degradación del surfactante inhibió la degradación del contaminante (Thiem, 1994), debido a que la planta lo pudo asimilar como fuente de energía, por estimuló a la MSR. La MSF solo en los tratamientos con PF y sin Tw tuvo efecto positivo, se correlaciono (0.854* Cuadro 4.6) con la remoción en la FR, sin embargo con Tw produjo efecto negativo; así mismo, la MSF se relaciono negativamente con el porcentaje de remoción alcanzado en la FR+QM1 y FR+QM2 (-0.773*, -0.589* Cuadro 4.6).

Las concentraciones de HTP's estimularon la formación de MSF y de MSR, posiblemente porque algunos contaminantes tienen efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas en concentraciones bajas, ya que éstas absorben los compuestos químicos en solución que hacen el papel de nutrientes (Pivetz, 2001). Otra posible causa es que también existe menor competencia de la planta por nutrimentos con los microorganismos del suelo, porque existen poblaciones pequeñas (Rivera-Cruz *et al.*, 2012). De acuerdo con Zhuang *et al.* (2007) diversos

metales pesados y contaminantes orgánicos promueven la síntesis de fitohormonas, las cuales, a su vez, promueven el crecimiento de las plantas. Sin embargo, la MSF al adicionarle Tw tuvo un efecto negativo, que lleva a suponer un efecto fitotóxico directo de la sustancia química que ocasiona daños en la planta (Liao *et al.*, 2015), o probablemente a la mayor competencia con los microorganismos por los compuesto degradados. Lo primero dependerá del tipo de surfactante, la dosis aplicada y el tipo de planta expuesta, también se puede deber a que la solubilización del contaminante en el suelo, en este caso el petróleo, mezclado con el surfactante, puede ocasionar toxicidad por el contaminante y no por el surfactante (Bramwell y Laha, 2000). Otras posibles causas se refieren a que el contaminante induzca efecto más tóxico del surfactante (Shin *et al.*, 2005), por lo que experimentos a más largo plazo con *L. hexandra* serán necesarios para conocer mejor el efecto del surfactante en la producción de biomasa.

4.7. CONCLUSIONES

Las tecnologías de recuperación de suelos contaminados con petróleo tuvieron efectos positivos en las poblaciones microbianas.

Las bacterias heterótrofas fue el único grupo de microorganismos con mayor población en la fitorremediación.

Las bacterias y hongos hidrocarbonoclastas, al igual que los hongos totales tuvieron la población más grande en suelos con las tecnologías de biorremediación microbiana nativa con 2.5 y 5% de Tween® 80

Las concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo y las dosis del surfactante no ocasionaron toxicidad en los microorganismos; al contrario, las dosis altas estimularon su crecimiento.

Las dosis del surfactante estimularon la remoción del petróleo en la biorremediación microbiana nativa en comparación con la fitorremediación.

La remoción de los hidrocarburos totales del petróleo fue mayor en la biorremediación microbiana nativa mas 2.5% de Tween® 80. La restauración del suelo mediante la tecnología biorremediación microbiana nativa y la adición de Tween® 80 es una alternativa segura y limpia para la remoción del petróleo en el suelo.

Estudios serán necesarios para conocer su efecto en el crecimiento de plantas que se desarrollan en sitios contaminados en campo.

4.8. LITERATURA CITADA

Adams R., J. Zavala-Cruz, y F. A. G. Morales. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico, II: afectación a la fertilidad y su recuperación. *Interciencia*. 33: 483-493.

Álvarez M. H. 2015. Biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos: un proceso complejo que involucra múltiples variables. *Revista Química Viva*. 14: 18-25.

Arias-Trinidad A., M. C. Rivera-Cruz, L. A. Aceves-Navarro, y R. Quintero-Lizaola. 2012. Pasto japonesa (*Leersia* sp) como especie fitorremediadora en suelos

- contaminados con petróleo fresco e intemperizado. EN: *Memoria XXXVII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo*. Zacatecas, Zacatecas. pp. 55-62.
- Banat I. M., R. S. Makkar, and S. S. Cameotra. 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 53: 495–508.
- Barea J. M., y C. Azcón-Aguilar. 1982. La Rizósfera: Interacciones microbio-planta. *Anales de Edafología y Agrobiología XII (7-8)*: 1517-1532.
- Bouyoucos G. 1962. Hydrometer method for particle-size analysis of soils. *Agronomy Journal*. 54: 464-465.
- Bramwell P. D., and S. Laha. 2000. Effects of surfactant addition on the biomineralization and microbial Toxicity of phenanthrene. *Biodegradation*. 11: 263-277.
- Cartmill A. D., D. L. Cartmill, and Alejandro-Alarcón. 2014. Controlled release fertilizer increased phytoremediation of petroleum-contaminated sandy soil. *International Journal of Phytoremediation*. 16: 285-301.
- Celaya-Michel H., E. Castellanos-Villegas. 2011. Mineralización de nitrógeno en el suelo de zonas aridas y semiáridas. *Terra Latinoamericana*. 29: 343-356.
- Consuegra G.R.C. 2006. NMX-AA-134-SCFI-2006. Suelos – hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría – método de prueba. Dirección de normalización. SEMARNAT- México. 23 p.

- Corona-Ramírez L., y R. Iturbe-Argüelles. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ingeniería investigación y tecnología*. 6:119-126.
- Cheng K. Y., and J. W. C. Wong. 2006. Combined effect of nonionic surfactant Tween 80 and DOM on the behaviors of PAHs in soil-water system. *Chemosphere*. 62: 1907-1916.
- Chu W., and C. Y. Kwan. 2003. Remediation of contaminated soil by a solvent/surfactant system. *Chemosphere*. 53: 9–15.
- Cunningham D. S., T. A. Anderson, A. P. Schwab, and F. C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56: 55–114.
- CNA (Comisión Nacional del Agua). 2014. Temperatura media a nivel nacional y por entidad federativa. En línea: <http://smn.cna.gob.mx/climatologia/TempsyPrecip/Mensuales/2014Tmed.pdf> Consultado el 8 de octubre de 2015.
- 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.
- DOF. 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y Lineamientos para el Muestreo en la Caracterización y Especificaciones para la Remediación. Segunda sección. México, D.F. 10 septiembre 2013. 16 p.

- Dorn B. P., E. T. Vipond, P. J. Salanitro, L. H. Wsniewski. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere*. 37: 845-860.
- Etchevers B. J. D. 1992. Manual de métodos para análisis de suelos, plantas agua y fertilizantes. Análisis rutinarios en estudios y programas de fertilidad. Laboratorio de Fertilidad, Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos. edo. México.
- EPA .1986. Method 418.1 modif. Petroleum Hydrocarbons Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency. Wahsington, DC, USA. 8 p.
- Fransetti A., P. Di Gennaro, G. Bestetti, M. Lasagni, D. Pitea, E. Collina. 2008. Selection of surfactants for enhancing diésel hydrocarbons-contaminated media biorremediation. *Journal of Hazardous Materials*. 152: 1309-1316.
- Gao Y. Z., W. T. Ling, L. Z. Zhu, B. W. Zhao, Q. Z. Zheng. 2007. Surfactant-Enhanced phytoremediation of soils contaminated with hydrophobic organic contaminants: potential and assessment. *Pedosphere*. 17: 409-418.
- Ghosh M. M. 1997. Kinetic consideration in surfactant-enhanced bioavailability of soil-bound PAH. The Sixth International in situ and on site Bioremediation Symposium. Battelle. Columbus E.U.A. 2: 575-580.

- González-Moscoso M., M. C. Rivera-Cruz, J. Delgadillo-Martínez. L C. Lagunes-Espinoza. 2015. Crecimiento y Producción de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo y surfactante. En: XL Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. 30 agosto a 4 septiembre 2015. San Luis Potosí México. pp. 185-189.
- Gould F. W., y R. B. Shaw. 1992. Gramíneas. Clasificación Sistemática. 1a. ed. AGT Editor, S. A. México. 381 p.
- Hadibarata T., and S. Tachibana. 2009. Enhanced Chrysene Biodegradation in Presence of a Synthetic Surfactant. Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry-Environmental Research in Asia. *TERRAPUB*. pp. 301-308.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística Geografía e informática). 2005. Cárdenas Tabasco. Cuaderno estadístico municipal 2005-2004. En línea <http://www.inegi.org.mx/est/contenidos/espanol/sistemas/cem05/estatal/tab/m002/index.htm>. Consultado 22 de junio de 2015.
- Jiménez C. B. E. 2001. La contaminación ambiental en México: causas, efectos y tecnología apropiada. México: Limusa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. 926 p.
- Johnson L. F. and E. A. Curl. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 247 P.
- Kao C. 2001. Application of microbial enumeration technique to evaluate the occurrence of natural bioremediation. *Water Research*. 35: 1951-1960.

- Lee D. H., E. S. Kim, and H. W. Chang. 2005. Effect of Tween surfactant components for remediation of toluene-contaminated groundwater. *Geosciences Journal*. 9: 261-267.
- Liao C., Liang X., Lu G., T. Thai, W. Xu, and Z. Dang. 2015. Effect of surfactant amendment to PAHs-contaminated soil for phytoremediation by maize (*zea mays L.*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 112: 1-6.
- López M., J. B. Quintero, A. L. V. Guevara, D. C. C. Jaimes, S. M. R. Gutiérrez y García J. M. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *Nova*. 4: 82-90.
- López-Martínez S., M. E. Gallegos-Martínez, L. J. Pérez-Flores, y M. Gutiérrez-Rojas. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21: 91-100.
- Madigan M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap, y D. P. Clark. 2009. Brock. Biología de los Microorganismos. 12a. ed. Pearson Educación, S.A. España. 1219 p.
- Maldonado-Chávez 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. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 26: 121-136.
- Menéndez D., J. L. Gallego, A. I. Peláez, G. Fernández de Córdoba, J. Moreno, D. Muñoz, y J. Sánchez. 2007. Engineered in situ bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*. 43: 310-321.

- Moreno-Medina U. C., L. M. Breton-Deval, E. Rios-Leal, J. Barrera-Cortes, N. Rinderknecht-seijas, y M. Poggi-Varaldo. 2011. Incremento de la solubilización de percloroetileno con un tensocativo no iónico. *Interciencia*. 36: 224-228.
- Muherei M. A., and R. Junin. 2009. Investigation Synergism in critical micelle concentration of anionic-no ionic surfactant mixtures: Surface versus Interfacial tension techniques. *Asian Journal of Applied Sciences*. 2: 115-127.
- Muñoz-Castellanos L. N., G. V. Nevarez-Moorillon, M. L. Ballina Casarrubias, M. R. Peralta-Pérez. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. *Revista Internacional de Ciencia y Tecnología Biomédica*. 1: 1-9.
- Ortíz B. O., I. L. Ize, y A. G. Gavilán. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*. 69: 83-92.
- Page A. L., R. H. Miller, y D. R. Keeney. 1982. Nitrogen total. In: Page Miller ALRH, Keeney DR (Eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2nd ed. ASA. SSSA. Madison, EEUU. pp. 595-629.
- PEMEX, (Petróleos Mexicanos). 2009. http://www.pemex.com/files/content/tabasco_0903271.pdf (Revisado: abril, 2015).
- Pilon-Smits E. 2005. Phytoremediation. *Annual Review of Plant Biology*. 56: 15–39.

- Pivetz B. E. 2001. Phytoremediation of contaminated soil and ground water at hazardous waste sites. Technology Innovation Office. Office of Soil Waste and Emergency Response, US EPA. Washington, DC, USA. 36 p.
- Pothuluri B. J., and E. C. Cerniglia. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In: R.G. Chaudry (ed). Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. Dioscorides Press, Portland, Oregon. Department of Biological Sciences Oakland University. pp. 92-123.
- Raiger L. L. J., y N. L. López. 2009. Los biosurfactantes y la industria petrolera. *Revista Química Viva*. 8: 146-161.
- Rivera-Cruz M. C., R. Ferrera-Cerrato, P. Sanchez-Garcia, H. Volke-Haller, L. Fernández-Linares, R. Rodriguez-vazquez. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán (*Echinochloa polystachya* [H.B.K.] Hitchc). *Agrociencia*. 38: 1-12.
- Rivera-Cruz M. C. 2011. Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadores de perturbación causada por petróleo e inundación. *Agroregión*. 5: 12-15.
- Rivera-Cruz M. C., E. Maldonado-Chavez, y A. Trujillo-Narcia. 2012. Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and on soil and plant macronutrients. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15: 30-39.
- Rhoades J. 1982. Cation Exchange Capacity. In: A. L. Page (ed.). Methods of Soil Analysis. Parte 2. Agronomy Monograph N° 9. ASA & SSSA. Madison, WI. pp. 178-190.

- Riojas H. H., P. Gortares, I. Mondaca, J. J. Balderas, y L. G. Torre. 2010. Efecto de los surfactantes en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Revista Química Viva*. 9: 120-145.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2005. User's Guide, Versión 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 664 p.
- Shanidul I. and M. Tanaka. 2004. Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin*. 48: 624-649.
- Shaw L. J., and R. G. Burns. 2003. Biodegradation of organic pollutants the rhizosphere. *Advances in Applied Microbiology*. 53: 1-60.
- Shcherbakova V. A., K. S. Laurinavichius, and V. K. Akimenko. 1999. Toxic effect of surfactants and probable products of their biodegradation on methanogenesis in an anaerobic microbial community. *Chemosphere*. 39: 1861-1870.
- Shin K. H., Y. Ahn, and K. W. Kim. 2005. Toxic effect of biosurfactant addition on the biodegradation of phenanthrene. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 2768–2774.
- Smith M. J., T. H. Flowers, H. J. Duncan, and 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: 1219-1225.

- Seoáñez C., A. J. Chacón, A. Gutiérrez, y I. Angulo. 1999. Contaminación de suelos: estudios, tratamiento y gestión. Mundi-Prensa. Madrid, España. 352 p.
- Sun Y., Y. Xu, Q. Zhou, L. Wang, D. Lin, and X. Liang. 2013. The potential of gibberellic acid 3 (GA3) and Tween-80 induced phytoremediation of co-contamination of Cd and Benzo[a]pyrene (B[a] P) using *Tagetes patula*. *Journal of Environmental Management*. 114: 202-208.
- Tiehm A. 1994. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of synthetic surfactants. *Applied and Environmental Microbiology*. 60: 258–263.
- Torres L. G., J. L. Orantes y R. Iturbe. 2006. Biodegradation of Two Nonionic Surfactants Used for In Situ Flushing of Oil-Contaminated Soils. *Tenside Surfactants Detergents*. 43: 251– 255.
- Urum K., T. Pekdemir, and M. Copur. 2004. Surfactants treatment of crude contaminated soils. *Journal of Colloid and Interface Science*. 276: 456-464
- Walkley A. and I. A. Black. 1934. An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38.
- White P. M., D. C. Wolf, G. J. Thomas, and C. M. Reynolds. 2006. Phytoremediation of alkylated polycyclic aromatic hydrocarbons in a crude oil-contaminated soil. *Water, Air and Soil Pollution*. 169: 207-220.

- Yanto Y. D. H. and S. Tachibana. 2014. Enhanced biodegradation of asphalt in the presence of Tween surfactants, Mn_2+ and H_2O_2 by *Pestalotiopsis* sp. In liquid medium and soil. *Chemosphere*. 103: 105-113.
- Zamora A., J. Ramos y M. Arias. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*. 24: 5-12.
- Zhang D. and L. Zhu. 2012. Effects of Tween 80 on the removal, sorption and biodegradation of pyrene by *Klebsiella oxytoca* PYR-1. *Environmental Pollution*. 164: 169-174
- Zhuang X., J. Chen, H. Shim, and Z. Bai. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environment International*. 33: 406-413.

CAPITULO V

CONCLUSIONES GENERALES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones generales

Leersia hexandra es una planta que se adapta a Gleysoles contaminados con altas dosis de petróleo, se manifestó en su crecimiento.

Las dosis de petróleo fresco menores e iguales a 90 000 mg kg⁻¹ y de Tween® 80 2.5 y 5%, a la que se expuso *Leersia hexandra* durante 180 días indujeron efecto positivo en el crecimiento y producción vegetal, además removi6 entre 67 y 70% de los hidrocarburos totales del petr6leo, remoci6n inferior a la obtenida con la biorremediaci6n microbiana natural, que fue de 82%.

5.3. Recomendaciones

Los resultados obtenidos en esta investigaci6n permiten recomendar lo siguiente:

- *Leersia hexandra* es una planta fitorremediadora y adaptada a la contaminaci6n con hidrocarburos totales del petr6leo.
- El uso de surfactantes no i6nico, como el Tween® 80, a dosis bajas en la biorremediaci6n microbiana nativa.
- El uso de la tecnología integrada por el surfactante + *Leersia hexandra* puede aplicarse por que garantiza la acumulaci6n de biomasa vegetal en el ecosistema.
- No utilizar el surfactante en dosis de 2.5 a 5% como tecnología integral a la fitorremediaci6n

- Realizar estudios del efecto de dosis menores a 2.5% Tween® 80 integrada a la fitorremediación con *Leersia hexandra*.
- Realizar investigaciones respecto a acumulación de hidrocarburos en follaje, exudados radicales, enzimas y bacterias anaeróbicas que participan en el proceso de biorremediación.

VI. APÉNDICES ESTADÍSTICOS

Apéndice A. Análisis de varianza de las respuestas fisiológicas y bioquímicas de *Leersia hexandra* en suelos contaminados con petróleo fresco.

Cuadro 6.1. Análisis de varianza de la longitud de estolones de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo fresco y Tween® 80, durante 180 d.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
Tratamiento	14	63898.57	4564.18	24.84	<.0001
Error	30	5512.83	183.76		
Total	44	69411.41			
R cuadrada	0.92				
60 d					
Tratamiento	14	166489.20	11892.08	10.41	<.0001
Error	30	34284.00	1142.80		
Total	44	200773.20			
R cuadrada	0.82				
120 d					
Tratamiento	14	74866.53	5347.60	1.69	0.1107
Error	30	94776.66	3159.22		
Total	44	169643.20			
R cuadrada	0.44				
180 d					
Tratamiento	14	59647.24	4260.51	1.30	0.2648
Error	30	98397.33	3279.91		
Total	44	158044.57			
R cuadrada	0.37				

Cuadro 6.2. Análisis de varianza de la longitud de estolones de *Leersia hexandra* por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween 80 (DTw) y la interacción entre ellos, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
DPF	4	29942.74	7485.68	40.74	<.0001
DTw	2	21359.34	10679.67	58.12	<.0001
DPF*DTw	8	12596.48	1574.56	8.57	<.0001
60 d					
DPF	4	46891.42	11722.85	10.26	<.0001
DTw	2	75723.60	37861.80	33.13	<.0001
DPF*DTw	8	43874.17	5484.27	4.80	0.0007
120 d					
DPF	4	11009.86	2752.46	0.87	0.4926
DTw	2	40075.60	20037.80	6.34	0.0050
DPF*DTw	8	23781.06	2972.63	0.94	0.4985
180 d					
DPF	4	5153.91	1288.47	0.39	0.8121
DTw	2	14714.84	7357.42	2.24	0.1236
DPF*DTw	8	39778.48	4972.31	1.52	0.1934

Cuadro 6.3. Análisis de varianza del numero de plantas jóvenes de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo fresco y Tween® 80, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
Tratamiento	14	121.91	8.70	2.25	0.0304
Error	30	116.00	3.86		
Total	44	237.91			
R cuadrada	0.51				
60 d					
Tratamiento	14	492.31	35.16	9.95	<.0001
Error	30	106.00	3.53		
Total	44	598.31			
R cuadrada	0.82				
120 d					
Tratamiento	14	3901.24	278.66	13.47	<.0001
Error	30	620.66	20.68		
Total	44	4521.91			
R cuadrada	0.86				
180 d					
Tratamiento	14	4518.57	322.75	15.72	<.0001
Error	30	616.00	20.53		
Total	44	5134.57			
R cuadrada	0.88				

Cuadro 6.4. Análisis de varianza del número de plantas jóvenes de *Leersia hexandra* por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween 80 (DTw) y la interacción entre ellos, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
DPF	4	48.80	12.20	3.16	0.0281
DTw	2	30.04	15.02	3.89	0.0316
DPF*DTw	8	43.06	5.38	1.39	0.2400
60 d					
DPF	4	184.97	46.24	13.09	<.0001
DTw	2	188.57	94.28	26.69	<.0001
DPF*DTw	8	118.75	14.84	4.20	0.0018
120 d					
DPF	4	1834.35	458.58	22.17	<.0001
DTw	2	1485.37	742.68	35.90	<.0001
DPF*DTw	8	581.51	72.68	3.51	0.0056
120 d					
DPF	4	1965.02	491.25	23.92	<.0001
DTw	2	1444.97	722.48	35.19	<.0001
DPF*DTw	8	1108.57	138.57	6.75	<.0001

Cuadro 6.5. Análisis de varianza de la Tasa de Crecimiento Relativo de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo fresco y Tween® 80, durante 180 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
Tratamiento	14	68.83	4.91	24.01	<.0001
Error	30	6.14	0.20		
Total	45	74.97			
R cuadrada	0.91				
60 d					
Tratamiento	14	78.70	5.62	8.70	<.0001
Error	30	19.40	0.64		
Total	44	98.17			
R cuadrada	0.80				
120 d					
Tratamiento	14	51.23	3.65	4.55	<.0001
Error	30	24.10	0.80		
Total	44	75.33			
R cuadrada	0.68				
180 d					
Tratamiento	14	13.65	0.97	6.42	<.0001
Error	30	4.55	0.15		
Total	44	18.21			
R cuadrada	0.74				

Cuadro 6.6. Análisis de varianza de la tasa de crecimiento relativo de *Leersia hexandra* por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween 80 (DTw) y la interacción entre ellos, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de medio	F calculada	P > F
30 d					
DPF	4	32.57	8.14	39.76	<.0001
DTw	2	22.54	11.27	55.04	<.0001
DPF*DTw	8	13.71	1.71	8.37	<.0001
60 d					
DPF	4	8.72	2.18	3.37	0.0216
DTw	2	11.92	5.96	9.22	0.0008
DPF*DTw	8	58.11	7.26	11.23	<.0001
120 d					
DPF	4	11.55	2.88	3.60	0.0164
DTw	2	19.80	9.90	12.33	0.0001
DPF*DTw	8	19.86	2.48	3.09	0.0115
120 d					
DPF	4	5.78	1.44	9.52	<.0001
DTw	2	1.31	0.65	4.31	0.0226
DPF*DTw	8	6.55	0.81	5.39	0.0003

Cuadro 6.7. Análisis de varianza de la clorofila a, b y total de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo fresco y Tween® 80, a los 180 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Cla					
Tratamiento	14	149.01	10.64	2.31	0.0265
Error	30	138.06	4.60		
Total	44	287.08			
R cuadrada	0.51				
Clb					
Tratamiento	14	31.39	2.24	1.17	0.3464
Error	30	57.57	1.91		
Total	44	88.96			
R cuadrada	0.35				
Clt					
Tratamiento	14	239.18	17.08	2.03	0.0511
Error	30	252.77	8.42		
Total	44	491.95			
R cuadrada	0.48				

Cuadro 6.8. Análisis de varianza de la clorofila a, b y total de *Leersia hexandra* por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween 80 (DTw) y la interacción entre ellos, a los 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Cla					
DPF	4	50.55	12.63	2.75	0.0466
DTw	2	32.98	16.49	3.58	0.0402
DPF*DTw	8	65.48	8.18	1.78	0.1210
Clb					
DPF	4	7.60	1.90	0.99	0.4277
DTw	2	8.74	4.37	2.28	0.1198
DPF*DTw	8	15.04	1.88	0.98	0.4706
Clt					
DPF	4	78.17	19.54	2.32	0.0798
DTw	2	82.21	41.10	4.88	0.0146
DPF*DTw	8	78.79	9.84	1.17	0.3495

Cuadro 6.9. Análisis de varianza de la materia seca radical, foliar y total de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo fresco y Tween® 80, a los 180 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
MSR					
Tratamiento	14	568.05	40.57	14.30	<.0001
Error	30	85.11	2.83		
Total	44	653.16			
R cuadrada	0.86				
MSF					
Tratamiento	14	4886.99	349.07	12.37	<.0001
Error	30	846.85	28.22		
Total	44	5733.85			
R cuadrada	0.85				
MST					
Tratamiento	14	5770.80	412.20	10.80	<.0001
Error	30	1144.54	38.15		
Total	44	6915.34			
R cuadrada	0.83				
VR					
Tratamiento	14	120090.06	8577.86	39.19	<.0001
Error	30	6565.62	218.85		
Total	44	126655.69			
R cuadrada	0.94				

Cuadro 6.10. Análisis de varianza de la materia seca radical, foliar y total de *Leersia hexandra* por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween 80 (DTw) y la interacción entre ellos, a los 180 días.

Fuente de variación	Grados libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de medio	F calculada	P > F
MSR					
DPF	4	271.66	67.91	23.94	<.0001
DTw	2	194.55	97.27	34.29	<.0001
DPF*DTw	8	101.82	12.72	4.49	0.0012
MSF					
DPF	4	1080.81	270.20	9.57	<.0001
DTw	2	1941.85	970.92	34.40	<.0001
DPF*DTw	8	1864.32	233.04	8.26	<.0001
MST					
DPF	4	325.30	81.32	2.13	0.1014
DTw	2	3166.89	1583.24	41.50	<.0001
DPF*DTw	8	2278.60	284.82	7.47	<.0001
VR					
DPF	4	87838.33	21959.58	100.34	<.0001
DTw	2	14490.48	7245.24	33.11	<.0001
DPF*DTw	8	17761.25	2220.15	10.14	<.0001

Apéndice B. Análisis de varianza de las respuestas microbiológicas y químicas en suelos con planta (*Leersia hexandra*) y sin planta contaminados con petróleo fresco.

Cuadro 6.11. Análisis de varianza de bacterias y hongos heterótrofos e hidrocarbonoclastas, y el porcentaje de remoción en suelos con petróleo fresco, a los 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de medio	F calculada	P > F
BH					
Tratamiento	23	310415649	134963328	40.87	<.0001
Error	48	158517288	330244346		
Total	71	326267379			
R cuadrada	0.95				
BHCT's					
Tratamiento	23	9784386.44	425408.11	22.33	<.0001
Error	48	914290.00	19047.71		
Total	71	10698676.44			
R cuadrada	0.91				
HH					
Tratamiento	23	6161.65	267.89	32.47	<.0001
Error	48	396.00	8.25		
Total	71	6557.65			
R cuadrada	0.93				
HHCT's					
Tratamiento	23	13626.44	592.45	34.02	<.0001
Error	48	836.00	17.41		
Total	71	14462.44			
R cuadrada	0.94				
%REM					
Tratamiento	17	18150.16	1067.65	28.44	<.0001
Error	36	1332.66	37.01		
Total	53	19482.83			
R cuadrada	0.93				

Cuadro 6.12. Análisis de varianza de bacterias y hongos heterótrofos e hidrocarbonoclastas, y el porcentaje de remoción por efecto de factores (dosis de petróleo fresco (DPF), dosis de Tween® 80 (DTw), tipo de tecnología de recuperación (TT) y la interacción entre ellos, a los 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado de medio	F Calculada	P > F
BH					
DPF	3	5821021517	1940340517	5.88	0.0017
DTw	2	1691888518	8459442317	25.62	<.0001
TT	3	1622313519	5407711718	163.75	<.0001
DPF*DTw*TT	18	1254443819	8362958717	25.32	<.0001
BHCT's					
DPF	3	5394489.111	1798163.037	94.40	<.0001
DTw	2	577500.111	288750.056	15.16	<.0001
TT	3	750467.333	250155.778	13.13	<.0001
DPF*DTw*TT	18	3061929.889	204128.659	10.72	<.0001
HH					
DPF	3	300.263889	100.087963	12.13	<.0001
DTw	2	451.861111	225.930556	27.39	<.0001
TT	3	810.208333	270.069444	32.74	<.0001
DPF*DTw*TT	18	4599.319444	306.621296	37.17	<.0001
HHCT's					
DPF	3	1345.000000	448.333333	25.74	<.0001
DTw	2	472.027778	236.013889	13.55	<.0001
TT	3	6622.583333	2207.527778	126.75	<.0001
DP*DTw*TT	18	5186.833333	345.788889	19.85	<.0001
%REM					
DPF	3	70388.37500	23462.79167	845.08	<.0001
DTw	2	824.25000	412.12500	14.84	<.0001
TT	3	11866.7083	3955.56944	142.47	<.0001
DP*DTw*TT	18	5162.87500	344.19167	12.40	<.0001