



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO EN EDAFOLOGÍA

***Casuarina equisetifolia* EN LA FITORREMEDIACIÓN DE  
SUELO CONTAMINADO CON DIESEL Y APLICACIÓN DE  
BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN**

MARÍA ESTHER DÍAZ MARTÍNEZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2012

La presente tesis titulada: *Casuarina equisetifolia* en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y aplicación de bioestimulación y bioaumentación, realizada por el alumno: **María Esther Díaz Martínez**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS**

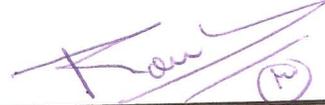
**EDAFOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

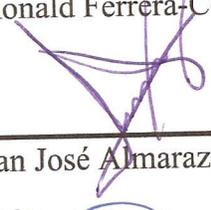
CONSEJERO

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Ronald Ferrera-Cerrato

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Juan José Almaraz Suarez

ASESOR

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Oscar García Barradas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Mayo 2012

La tesis "*Casuarina equisetifolia* en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y aplicación de bioestimulación y bioaumentación", forma parte del Proyecto: **SEP-CONACYT 79456 "Simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa-micorriza arbuscular y su respuesta a los hidrocarburos del petróleo"**. María Esther Díaz Martínez agradece a CONACYT el apoyo brindado durante sus estudios de postgrado.



# ***Casuarina equisetifolia* EN LA FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON DIESEL Y APLICACIÓN DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN**

María Esther Díaz Martínez, M. en C.

Colegio de Postgraduados, 2012

## **RESUMEN**

En este trabajo se evaluó la germinación de semillas y el crecimiento de plantas de *C. equisetifolia* L. ante diesel, y su potencial de fitorremediación en combinación de bioaumentación y bioestimulación. La primera fase experimental evaluó el efecto tóxico de 15 dosis de diesel (0, 100, 250, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>) en la germinación de semillas y la emergencia de plántulas. A los 10 días, la germinación fue mayor en concentraciones altas de diesel; la mayor geminación ocurrió en 20000 mg kg<sup>-1</sup>, y la menor se registró ante 5000 mg kg<sup>-1</sup>. La emergencia de plántulas fue mayor en las concentraciones menores a 5000 mg kg<sup>-1</sup>. A los 15 días, el crecimiento de las plántulas disminuyó ante concentraciones altas, y a los 25 días murieron. En la segunda fase experimental se evaluó el efecto de la bioaumentación con *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium* sp. y *Trichoderma viride*, y de la bioestimulación con los fertilizantes Floranid® y Triple 17 en plantas de *C. equisetifolia*, establecidas en suelo con diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) bajo condiciones de invernadero. El diesel disminuyó significativamente las variables de crecimiento y las poblaciones microbianas; mientras que la fertilización con Floranid estimuló el crecimiento vegetal y el porcentaje de degradación de diesel. En cuanto al factor inoculación, *Sphingobacterium* aumentó la altura, el número de acículas, y el contenido de nitrógeno foliar con respecto a la inoculación de *Rhizophagus* y *Trichoderma*. Sin embargo, *Trichoderma* favoreció la degradación de diesel ya sea sin fertilizar (32%) o con Floranid (38%).

**Palabras clave:** *Germinación, emergencia de plantas, simbiosis, fertilización, microorganismos, degradación de hidrocarburos.*

***Casuarina equisetifolia* IN THE PHYTOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED  
SOIL, AND APPLICATION OF BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION**

María Esther Díaz Martínez, M. Sc.

Colegio de Postgraduados, 2012

**ABSTRACT**

This study evaluated the seed germination and the growth of *Casuarina equisetifolia* L. seedlings against diesel, and its phytoremediation potential in combination of biostimulation and bioaugmentation. The first experimental stage evaluated the toxic effects of 15 concentrations of diesel (0, 100, 250, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 and 20000 mg kg<sup>-1</sup>) on seed germination and seedling emergence. At 10 days, germination was greater at high concentrations of diesel; the greatest germination was achieved at 20000 mg kg<sup>-1</sup>, and the lowest at 5000 mg kg<sup>-1</sup>. Seedling emergence was high at concentrations lower than 5000 mg kg<sup>-1</sup>. At 15 days, the seedling growth diminished at high concentrations, and at 25 days plants died. The second experimental stage evaluated the bioaugmentation with *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium* sp. and *Trichoderma viride*, and the biostimulation with the fertilizers Floranid® and Triple 17 on plants of *C. equisetifolia* grown at soil with diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) under greenhouse conditions. Diesel significantly decreased plant growth parameters and microbial populations; whereas fertilization with Floranid simulated plant growth and the diesel degradation percentage. For the inoculation factor, *Sphingobacterium* increased height, number of needles and nitrogen leaf content when compared to the inoculation of *Rhizophagus* and *Trichoderma*. Nevertheless, *Trichoderma* favored diesel degradation either without fertilization (32%) or fertilized with Floranid (38%).

**Key words:** *Seed germination, seedling emergence, symbiosis, fertilization, microorganisms, hydrocarbon degradation.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por brindarme el apoyo y las herramientas para mi formación académica.

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

A mi profesor consejero el Dr. Alejandro Alarcón por brindarme sus conocimientos, paciencia, tiempo, apoyo y valiosa dirección en la realización de esta investigación.

Al Dr. Ronald Ferrera-Cerrato, por sus enseñanzas, tiempo y apoyo brindado en todo momento para desarrollar mi proyecto de investigación.

Al Dr. Juan José Almaraz Suarez, por sus enseñanzas, paciencia, asesoramiento y disponibilidad.

Al Dr. Oscar García Barradas por el asesoramiento, apoyo y darme las facilidades para trabajar en el laboratorio de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Veracruz.

A la Dra. Remedios Mendoza López por el apoyo desmedido y colaboración en el análisis de mis muestras de suelo con diesel en el laboratorio del SARA.

A Susy por su apoyo incondicional y disposición para concluir mis análisis en mi estancia en el SARA.

Al personal del Área de Microbiología del Suelo: A Rosario Galicia López por su buena disposición y apoyo en trámites administrativos. A Manuel Solano Díaz por disponibilidad y apoyo en material de laboratorio. A Edmundo Martínez Galán por su ayuda y enseñanzas tanto en invernadero como en laboratorio (En el desarrollo y determinación de nitrógeno foliar en planta). A Lorenzo Viana Monsalvo por el apoyo en el laboratorio de Fijación de Nitrógeno. A Fernando

López Santillán por su ayuda en el laboratorio de Fijación. Sin ustedes no sabríamos que hacer, Gracias.

Al Mtro. Mejía y a la Universidad Autónoma Chapingo por brindarme un espacio para establecer mi experimento en momentos críticos de la investigación.

Al laboratorio de Fertilidad de suelos, por proporcionarme equipo e instalaciones en los momentos adecuados.

A la señora Remedios y Jacqueline, secretarias de la oficina de enlace de Edafología, por su apoyo y disponibilidad en cualquier trámite administrativo.

A la Lic. Padilla de Servicios Académicos por su amable atención y disponibilidad en todo momento.

A mis Amigos y compañeros durante mi estancia en el Colegio de Postgraduados Judith, Alicia, Mario, Esmeralda, Nadia, Miguel Ángel, Monserrat, Patricio, Yuri, Rebeca, Claudia, Vivian, Blanca, Alejandra, Alejandra, Susy, Isela, Arturo, Eliseo, Cristina, Yessica, Elvia, Yadira. Gracias por su amistad, por tenderme la mano en momentos difíciles, por sus sabios consejos, por esa parte humana que los caracteriza y por esos momentos de sano esparcimiento, grata diversión y alegría.

A mis demás amigos, por estar siempre presentes dándome ánimo, Gracias.

## DEDICATORIA

*A dios, por haberme permitido pertenecer a una gran familia, por brindarme salud, por tener poco que pedirle y mucho que agradecerle y por ayudarme a culminar una meta más en mi vida.*

*Para mis padres Juan Díaz y Ma. Esther Martínez, por su comprensión y ayuda en momentos. Me han dado todo lo que soy como persona y todo ello con una gran dosis de amor y sin pedir nunca nada a cambio. Sabiendo que jamás existirá una forma de agradecer una vida de lucha, sacrificio y esfuerzo constantes, sólo deseo que entiendan que el logro mío, es el logro de ustedes, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes.*

*A mis hermanas Elia, Silvia, Anayeli y mi sobrina Marsen, gracias por la oportunidad de existir, por su sacrificio en algún tiempo incomprendido, por su ejemplo de superación incasable, por su comprensión y confianza, por su amor y amistad incondicional, porque sin su apoyo no hubiera sido posible la culminación de este proyecto.*

*A mis tíos, primos y demás familia, por brindarme su apoyo y sabias palabras.*

*A Gerardo, por su comprensión, tolerancia y por sus múltiples consejos para nunca darme por vencida, por el apoyo moral, amor y confianza. Por lo que ha sido y será... Gracias.*

*A mi abuelo †, porque te fuiste inesperadamente dejando un gran vacío, pero damos gracias a dios, no porque te fuiste sino porque viniste un día a llenarlo de alegría y sabemos que muy pronto nos veremos nuevamente.*

## CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	III
ABSTRACT .....	IV
ÍNDICE DE CUADROS .....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
CAPÍTULO I.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II.....	5
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	5
2.1 OBJETIVO GENERAL.....	5
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	5
2.2 HIPÓTESIS GENERAL .....	5
2.2.1 HIPÓTESIS ESPECÍFICAS.....	5
CAPÍTULO III .....	6
REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
ESPECIES FORESTALES Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN LA REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL PETRÓLEO.....	6
3.1. EL PETRÓLEO Y SU IMPACTO EN EL SUELO .....	6
3.2. TÉCNICAS DE RECUPERACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS .....	7
3.3. BIORREMEDIACIÓN .....	9
3.4. PROCESOS UTILIZADOS PARA FAVORECER LA BIORREMEDIACIÓN.....	10
3.4.1. <i>Bioestimulación</i> .....	10
3.4.2. <i>Bioaumentación</i> .....	11
3.5. LA SIMBIOSIS MICORRÍZICA ARBUSCULAR Y SU FUNCIÓN EN SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS .....	15
3.6. FITORREMEDIACIÓN .....	18
3.7. PLANTAS UTILIZADAS EN LA FITORREMEDIACIÓN .....	19
3.8. <i>CASUARINA EQUISETIFOLIA</i> L. Y SUS APLICACIONES AMBIENTALES.....	23
3.9. DISCUSIÓN GENERAL DE LA REVISIÓN DE LITERATURA Y JUSTIFICACIÓN.....	26
CAPÍTULO IV .....	27
TOXICIDAD DEL DIESEL EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EMERGENCIA DE PLÁNTULAS DE <i>CASUARINA EQUISETIFOLIA</i> L.....	27
RESUMEN.....	27

<b>ABSTRACT</b> .....	<b>28</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>31</b>
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EMERGENCIA DE PLÁNTULAS .....	33
ALTURA DE PLÁNTULA, LONGITUD RADICAL Y BIOMASA SECA.....	36
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>38</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO V</b> .....	<b>43</b>
<b>FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON DIESEL UTILIZANDO CASUARINA EUISETIFOLIA Y APLICACIÓN DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN</b> .....	<b>43</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>43</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>44</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>45</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>49</b>
COLECTA DE SEMILLA .....	50
CONTAMINACIÓN DEL SUELO .....	50
PREPARACIÓN DE LOS INOCULOS MICROBIANOS.....	50
FERTILIZANTES INORGÁNICOS UTILIZADOS .....	52
ESTABLECIMIENTO DEL EXPERIMENTO .....	52
VARIABLES DE CRECIMIENTO .....	53
COLONIZACIÓN MICORRÍZICA .....	53
DETERMINACIÓN UFC DE TRICHODERMA VIRIDE (CP4) Y SPHINGOBACTERIUM SP.....	54
CONTENIDO DE NITRÓGENO FOLIAR.....	54
BIODEGRADACIÓN DE DIESEL.....	55
DISEÑO EXPERIMENTAL.....	56
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>56</b>
EFECTO SOBRE VARIABLES DEL CRECIMIENTO .....	56
EFECTOS EN LA POBLACIÓN DE MICROORGANISMOS INOCULADOS.....	64
DEGRADACIÓN DEL DIESEL .....	69
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>74</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO VI</b> .....	<b>81</b>
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b> .....	<b>81</b>
<b>LITERATURA CITADA</b> .....	<b>83</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

### Página

<b>Cuadro 3.1.</b> Tratamientos utilizados en métodos <i>in situ</i> para la remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el suelo.....	<b>12</b>
<b>Cuadro 3.2.</b> Ejemplos de tratamientos de bioestimulación durante la degradación de contaminantes orgánicos.....	<b>13</b>
<b>Cuadro 3.3.</b> Especies arbóreas utilizadas en la fitorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos.....	<b>22</b>
<b>Cuadro 4.1.</b> Principales características físicas y químicas del suelo colectado en San Diego municipio de Texcoco, Estado de México.....	<b>32</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### Página

<b>Figura 3.1</b> Representación de la forma de infección de las hifas de los HMA, mediante la formación de un apresorio sobre la epidermis y el desarrollo de sus estructuras de absorción, almacenamiento e intercambio de nutrientes dentro de la raíz.....	<b>16</b>
<b>Figura 3.2.</b> Diagrama que muestra la manera en que los contaminantes son secuestrados por las especies arbóreas a través de la fitoextracción (a), fitodegradación (b) y fitoestabilización (c).....	<b>21</b>
<b>Figura 3.2.</b> Estructuras botánicas que caracterizan del árbol de <i>Casuarina equisetifolia</i> (A), fruto y semilla (B), flores femeninas (C) y flores masculinas (D).....	<b>25</b>
<b>Figura 4.1.</b> Número de semillas de <i>Casuarina equisetifolia</i> germinadas en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), durante 25 días. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar.....	<b>34</b>
<b>Figura 4.2.</b> Emergencia de plántulas de <i>Casuarina equisetifolia</i> en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) durante 25 días. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar.....	<b>35</b>
<b>Figura 4.3.</b> Altura de planta y longitud radical de <i>Casuarina equisetifolia</i> establecida en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel ( $\text{mg kg}^{-1}$ ), durante 25 días. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar.....	<b>37</b>
<b>Figura 4.4.</b> Biomasa seca total de plántulas de <i>Casuarina equisetifolia</i> establecidas en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel ( $\text{mg kg}^{-1}$ ) durante 25 días. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar.....	<b>38</b>
<b>Figura 5.1.</b> Altura de plantas de <i>Casuarina equisetifolia</i> creciendo en ausencia y presencia de diesel ( $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos; RI = <i>Rhizophagus intraradices</i> , S = <i>Sphingobacterium</i> sp. (M2BOS1-R2); T = <i>Trichoderma viride</i> CP4.....	<b>57</b>
<b>Figura 5.2.</b> Número de acículas de plantas de <i>Casuarina equisetifolia</i> creciendo en ausencia y presencia de diesel ( $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ ), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. $n = 10$ . Medias $\pm$ error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inocular microorganismos; RI = <i>Rhizophagus intraradices</i> , S = <i>Sphingobacterium</i> sp. (M2BOS1-R2); T = <i>Trichoderma viride</i> CP4.....	<b>59</b>

**Figura 5.3.** Biomasa seca total de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con la inoculación de microorganismos rizosféricos y aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium*, T = *Trichoderma viride* CP4.....60

**Figura 5.4.** Índice de calidad de plantas de *Casuarina equisetifolia* en presencia y ausencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.....62

**Figura 5.5.** Nitrógeno foliar de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), e inoculados con microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp, T = *Trichoderma viride* CP4.....63

**Figura 5.6.** Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Sphingobacterium*, en la rizósfera de plantas de *Casuarina equisetifolia* que crecieron en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) con la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones: S = *Sphingobacterium* sp, RI = *Rhizophagus intraradices*, T = *Trichoderma* CP4.....65

**Figura 5.7. Figura 5.7.** Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma viride* CP4 en la rizósfera de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (500 mg kg<sup>-1</sup>), y la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones: RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium*, T = *Trichoderma* CP4.....66

**Figura 5.8.** Colonización micorrízica arbuscular en plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (500 mg kg<sup>-1</sup>), y el efecto de la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4. ....68

**Figura 5.9.** Porcentaje de degradación de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) en suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* por efecto de la inoculación con microorganismos rizosféricos, y la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero.

n= 4. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp, T = *Trichoderma viride* CP4.....70

**Figura 5.10.** Cromatograma que muestra los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel en muestras de suelo rizosférico de plántulas de *Casuarina equisetifolia*, inoculada con microorganismos rizosféricos sin aplicación de fertilizante, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.....71

**Figura 5.11.** Cromatograma que muestra los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) en muestras de suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* inoculada con microorganismos rizosféricos y la adición del fertilizante Floranid, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.....72

**Figura 5.12.** Cromatograma que muestra los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) en muestras de suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* inoculada con microorganismos rizosféricos y la aplicación del fertilizante Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4....73

# CAPÍTULO I

## INTRODUCCIÓN

El suelo es una mezcla de partículas sólidas, agua y aire, que tiene un papel importante en el ecosistema terrestre. Dentro de las principales características del suelo se encuentran las químicas, físicas y biológicas, y sus principales funciones se relacionan con el soporte de las plantas y el suministro de elementos necesarios para su desarrollo, así como albergar diversos microorganismos (Navarro y Navarro, 2003).

Las actividades industriales están provocando grandes daños al suelo; una de ellas es la industria petroquímica, la cual ha sido una de las actividades más importantes para nuestro país, teniendo destacada relevancia en diversas cadenas productivas y actividades de nuestra vida moderna. El petróleo crudo y las fracciones que provienen de él, está conformado de moléculas denominadas hidrocarburos (Primo, 1996). La producción de petróleo crudo reportada para México en 2009 fue de 1,524 millones de barriles diarios (Mbd), dentro de los cuales se encuentra principalmente la producción de combustóleo, gas y diesel. La producción de diesel es una de las más importantes, reportándose una producción de 337 Mbd (PEMEX, 2010).

La industria petroquímica ha generado grandes problemas ambientales, con repercusiones en el equilibrio ecológico y en la salud humana (INE, 2007). Estos problemas se deben en gran medida por el manejo inadecuado y abandono de materiales y residuos peligrosos, por el limitado mantenimiento o falta de éste en instalaciones petroleras, por las explosiones en instalaciones de alto riesgo, así como por fugas en las líneas de conducción de los hidrocarburos (INE, 2007).

Los hidrocarburos son acumulados en el suelo, y algunos otros pueden llegar a los mantos freáticos y formar capas en formas de nata. Los hidrocarburos en el suelo fragmentan los agregados del suelo, modifican su estructura y disminuyen la capacidad del suelo para retener agua disponible para las plantas (López-Martínez *et al.*, 2005; Adams y Morales-García, 2008).

En los últimos años se han aplicado técnicas de remediación de suelos contaminados, las cuales representan el conjunto de operaciones que alteran la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas, de manera que se reduzca su toxicidad, su movilidad o bien, el volumen del material contaminado (Campbell y Reece, 2007). La biorremediación de sitios contaminados es una opción que representa ventajas con respecto a los métodos físicos o químicos, debido a su bajo costo, su beneficio ambiental, y en algunos casos se requiere de un mínimo o ningún tratamiento posterior (Volke *et al.*, 2005).

La fitorremediación consiste en el uso de plantas para la remoción de contaminantes en suelos y aguas, y se lleva a cabo a través de los procesos fisiológicos y las respuestas bioquímicas de las plantas (Pernía *et al.*, 2008). La fitorremediación se clasifica con base en la actividad fisiológica que tienen las plantas en presencia de los contaminantes. En muchos estudios se han utilizado gramíneas y leguminosas, probando ser excelentes en la disminución de contaminantes (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia 2004; Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Sangabriel *et al.*, 2006). El sistema radical de las gramíneas es extenso y fibroso, lo que permite tener mayor área de superficie de raíz en el suelo, penetrando en algunos casos hasta tres metros (Hernández y Mager, 2003), mientras que las leguminosas tienen la habilidad de fijar nitrógeno, por lo que no compiten con los microorganismos por el suministro de nitrógeno disponible en suelos contaminados (Sangabriel *et al.*, 2006).

Recientemente las especies arbóreas se han utilizado para descontaminar suelos, a lo cual se ha denominado como dendroremediación en la que los árboles tienen la función de extraer, secuestrar o degradar químicamente al contaminante (Schoenmuth y Pestemer, 2004a; Tamas y Gullner, 2006). Entre las especies arbóreas que han sido reportadas como tolerantes y acumuladoras de contaminantes se encuentran a *Cupressus*, *Populus*, *Eucalyptus*, *Erythrina*, *Pinus*, *Salix*, *Angophora*, *Acacia* y *Casuarina* (Aitchison *et al.*, 2000; Grant *et al.*, 2001;

Palmroth *et al.*, 2002; Schoenmuth y Pestemer 2004b; Alcalá *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010). Esta última especie arbórea es susceptible de utilizarse para la reforestación rural y urbana, debido a su rápido crecimiento, y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Valdés *et al.*, 2004), además de tener buena adaptabilidad a condiciones adversas; lo que la hace ser una excelente candidata para la remediación de suelos contaminados o erosionados (Moezel *et al.*, 1989; Ndiaye *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 2010). Algunas especies de casuarinas han sido combinadas con microorganismos para transformar compuestos orgánicos e integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales a lo cual es conocido como biorremediación (Garbisu *et al.*, 2002).

Dentro de los principales tratamientos de biorremediación se encuentran la bioestimulación y la bioaumentación. La bioestimulación es una técnica que consiste en la activación de los organismos nativos a través de la adición de nutrientes y oxígeno al suelo. Por otra parte, cuando los microorganismos nativos no son capaces de degradar contaminantes, se puede proceder a la bioaumentación, que consiste en la introducción de microorganismos previamente seleccionados (Zhang *et al.*, 2008; Mancera *et al.*, 2008; Argumedo-Delira *et al.*, 2012).

Entre los grupos de microorganismos que se han desempeñado con éxito en la bioaumentación encontramos a los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), los cuales promueven la recuperación de suelos con presencia de contaminantes orgánicos, ya que esta simbiosis tiene un efecto benéfico en la planta al favorecer el aumento de su biomasa, la tolerancia al estrés inducido por el contaminante, el aumento de actividades enzimáticas y la mayor degradación de hidrocarburos del petróleo (Debiane *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009; Hernández-Ortega *et al.*, 2012;).

Uno de los hongos filamentosos que tiene desempeños positivos en suelos contaminados con hidrocarburos es *Trichoderma* sp. el cual ha sido aislado de sitios tanto fríos como tropicales que están contaminados con petróleo (Hughes *et al.*, 2007), y cuyas especies presentan diferentes grados de degradación o tolerancia a la presencia de hidrocarburos (Silva *et al.*, 2009; Argumedo-Delira *et al.*, 2012). De igual manera, las bacterias también juegan un papel importante en la remediación de suelos debido a su capacidad de degradar hidrocarburos totales de petróleo (Boonchan *et al.*, 2000).

Con base en lo anterior, en la presente investigación se evaluó la capacidad de remediar un suelo contaminado con diesel, mediante la inoculación de bacterias tolerantes a contaminantes orgánicos, del hongo filamentoso *Trichoderma viride*, y del hongo micorrízico arbuscular (*Rhizophagus intraradices*) en plantas de *Casuarina equisetifolia* L.

## CAPÍTULO II

### OBJETIVOS E HIPÓTESIS

#### 2.1 Objetivo general

- Evaluar el potencial de la bioestimulación y de la bioaumentación en el desempeño de *Casuarina equisetifolia* L. durante la fitorremediación de un suelo contaminado con diesel.

#### 2.1.1 Objetivos específicos

- Estimar la toxicidad de un suelo contaminado con diferentes concentraciones de diesel en la germinación de semillas y en la emergencia de plántulas de *Casuarina equisetifolia* L.
- Estimar la efectividad de la aplicación de fertilizantes (bioestimulación) y de la inoculación de microorganismos benéficos (bioaumentación) en el crecimiento de *Casuarina equisetifolia* L., y su desempeño durante la fitorremediación del suelo contaminado con diesel.

#### 2.2 Hipótesis general

- La bioestimulación y la bioaumentación permitirán que *Casuarina equisetifolia* L. se desarrolle, tolere y degrade hidrocarburos del diesel en el suelo contaminado.

#### 2.2.1 Hipótesis específicas

- La presencia de diesel inhibe la germinación de semillas y la emergencia de plántulas de *Casuarina equisetifolia* L. a medida que aumenta su concentración en el suelo.
- El sinergismo entre la bioestimulación y la bioaumentación favorecerá el crecimiento y el desarrollo de *Casuarina equisetifolia*, y estimulará la fitorremediación del suelo contaminado con diesel.

**CAPÍTULO III**  
**REVISIÓN DE LITERATURA**  
**ESPECIES FORESTALES Y MICROORGANISMOS RIZOSFÉRICOS EN LA**  
**REMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS DEL**  
**PETRÓLEO**

**3.1. El petróleo y su impacto en el suelo**

En México, cerca del 88% de la energía primaria que se consume por la población deriva del petróleo. El petróleo es la principal fuente de insumos para generar energía eléctrica, al permitir la producción de combustibles para el sector industrial y transporte, y además, es materia prima de diversos productos como telas, medicinas y objetos de plástico (PEMEX, 2010).

Desde el punto de vista químico, el petróleo es una mezcla de hidrocarburos que corresponden a compuestos formados principalmente por carbono e hidrógeno, y dependiendo de su lugar de origen presentan contenidos menores de otros elementos como azufre, oxígeno, nitrógeno o trazas de metales (Primo, 1996; Pardo *et al.*, 2004). Dependiendo del número de átomos de carbono y de la estructura de los hidrocarburos que integran al petróleo, se tienen diferentes propiedades que los caracterizan y que determinan su comportamiento como combustibles, lubricantes, ceras o disolventes (Jiménez, 2002). Los hidrocarburos constituyen del 50 al 98% de la composición total del petróleo, y están formados por alcanos, cicloalcanos y compuestos aromáticos con al menos un anillo bencénico en su estructura química (Primo, 1996; Cognetti *et al.*, 2001). La producción de petróleo crudo reportada para México en el 2010 fue de 1,524 millones de barriles diarios (Mbd), dentro de los cuales se deriva la producción de gas, diesel y combustóleo, principalmente (PEMEX, 2010).

La producción de diesel es una de las más importantes, reportándose una producción de 337 Mbd, cuyas fracciones pueden contener de 10 a 20 carbonos, los cuales ebulen a 350 °C;

además, contiene abundantes hidrocarburos de densidad variable. El diesel también se manufactura en muchos casos, a partir de mezclas de gasóleos con querosenos y aceite cíclico ligero (PEMEX, 2010).

Los problemas de contaminación de suelo y de agua por hidrocarburos se deben principalmente a la falta de mantenimiento de instalaciones petroleras, explosiones en instalaciones de alto riesgo, y fugas en las líneas de conducción (Jiménez, 2002; INE, 2007). Algunos hidrocarburos son depositados y acumulados en el suelo y otros pueden alcanzar los mantos freáticos y formar capas en forma de nata. Los hidrocarburos rompen los agregados del suelo y modifican su estructura, disminuyen la capacidad de retención de agua disponible para las plantas y, como consecuencia de su composición química, modifican la relación carbono nitrógeno (C/N) propiciando la inmovilización de N y mayor liberación de CO<sub>2</sub> a la atmósfera (Gutiérrez y Zavala, 2002; López-Martínez *et al.*, 2005; Adams y Morales-García, 2008).

El impacto negativo que provocan los contaminantes en el suelo es muy grave, ya que reducen e inhiben la cobertura vegetal, la fauna y la microfauna, y provocan contaminación por infiltración hacia los mantos freáticos (Pardo *et al.*, 2004). Además, esta contaminación tiene impacto de tipo económico, social y de salud pública en zonas aledañas a la contaminación, provocando enfermedades como cáncer, el cual ha aumentado significativamente en los últimos años como consecuencia de la contaminación por hidrocarburos y otros compuestos tóxicos liberados al ambiente (Adams y Morales-García, 2008).

### **3.2. Técnicas de recuperación de suelos contaminados**

Uno de los problemas ambientales más importantes es la contaminación de ecosistemas terrestres por derrames de hidrocarburos del petróleo y sus derivados, los cuales ocurren por explotación y transporte de los mismos (Pardo *et al.*, 2004). Las técnicas de remediación representan el conjunto de operaciones que alteran la composición de una sustancia peligrosa o

contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas (Cuadro 3.1), de manera que se reduzca su toxicidad, su movilidad, y el volumen del material contaminado (Harrison, 1999).

El tratamiento de suelos contaminados se realiza mediante métodos *ex situ* e *in situ*. El uso del método depende de las condiciones del área contaminada, el volumen de suelo y espacio necesario para aplicar la técnica adecuada. En el tratamiento *ex situ* el suelo se excava y se transporta, y su manejo es controlado durante corto tiempo; sin embargo, su costo es más elevado (Volke y Velasco, 2002). Dentro de los tratamientos que destacan se encuentra la incineración a 1,000 °C ó 2,500 °C, en suelos que se encuentran severamente contaminados con dioxinas. Además, la solidificación es una técnica que comúnmente se hace con cemento u otros agentes aglomerantes, y se utiliza principalmente para metales pesados (Harrison, 1999). Algunos suelos son transportados a una planta de limpieza o a un biorreactor. El suelo se lava con un producto extractor (generalmente es un ácido, un agente de formación de quelatos o un surfactante) para eliminar determinados contaminantes orgánicos e inorgánicos. Los biorreactores disponen por lo general de un recipiente en el que se puede agitar una suspensión de suelo y agua, que se somete a las mejores condiciones para la degradación de contaminantes orgánicos. Generalmente, los organismos ya existentes en los biorreactores son suficientes para llevar a cabo la degradación; sin embargo, también se pueden inocular microorganismos alóctonos (Castillo *et al.*, 2005). Además, la biodegradación se puede lograr al extender el suelo en camas o en pilas denominadas biopilas, en una zona en la que se maneja fácilmente y permanezca a una temperatura constante (Gómez, 2004).

El método *in situ* corresponde a tratamientos que no requieren excavación y transporte del suelo, por lo que sus costos son menores (Harrison, 1999; SEMARNAT, 2010), y está representado por tratamientos físicos, químicos y biológicos (Cuadro 3.1). Dentro de los métodos físicos o químicos destacan los siguientes tratamientos:

- Lavado. El lavado del suelo puede realizarse estableciendo sistemas de riego por aspersión que permitan irrigar el suelo con diferentes soluciones extractantes que pueden ser ácidos diluidos o agentes quelantes para lavar metales pesados. Los lixiviados son llevados a una laguna en donde se extrae el contaminante por medio de resinas intercambiadoras de iones, quelatación, o por precipitación (Volke *et al.*, 2005).
- Aplicación de vapor al suelo. Este tratamiento se aplica a suelos contaminados con compuestos volátiles, y es solamente válido para suelos con una permeabilidad relativamente alta, macroporosidad elevada y/o fisuras. El tratamiento inserta un sistema de tuberías en el suelo contaminado de modo que permita la entrada de aire a través del suelo mediante el uso de una bomba de vacío. El aire extraído contiene los compuestos volátiles y posteriormente, se hace pasar a través de una columna de carbono activado en la que se absorben los contaminantes orgánicos (Volke y Velasco, 2002).

Por su parte, los métodos biológicos más usados hoy en día para la recuperación de suelos contaminados con sustancias químicas orgánicas e hidrocarburos de petróleo corresponden a la biorremediación y la fitorremediación.

### **3.3. Biorremediación**

La biorremediación de sitios contaminados es una opción que representa ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos, debido a que es de bajo costo, beneficia al ambiente, y requiere de un mínimo o ningún tratamiento posterior (Volke y Velasco, 2002). La biorremediación se centra en la explotación de la diversidad genética y versatilidad metabólica que caracteriza a los microorganismos los cuales transforman los contaminantes y los integran a los ciclos biogeoquímicos naturales (Garbisu *et al.*, 2002). Muchos contaminantes orgánicos pueden ser degradados de forma muy efectiva optimizando las condiciones del suelo para los microorganismos, mediante el ajuste de pH, temperatura y el suministro de nutrientes, al mismo

tiempo que se favorece la aireación del suelo con técnicas de cultivo adecuadas (Harrison, 1999). La aplicabilidad de esta técnica depende de las propiedades del contaminante (biodegradabilidad) (Volke *et al.*, 2005).

Los hidrocarburos lineales como los alcanos sufren una biodegradación más rápida al igual que aquellos que tienen una longitud de cadena menor, ya que su hidrosolubilidad aumenta y la microbiota los toma fácilmente como fuente de carbono. En contraste los hidrocarburos constituidos por estructuras aromáticas, así como los que presentan configuraciones ramificadas, son más resistentes a estos mecanismos de biodegradación por la energía que se requiere para romper los enlaces (Botello *et al.*, 2006). La biorremediación se puede realizar *ex situ* mediante el uso de biorreactores e *in situ* por medio de la bioestimulación y la bioaumentación con microorganismos nativos o incluso con aquellos modificados genéticamente (Castillo *et al.*, 2005).

### **3.4. Procesos utilizados para favorecer la biorremediación**

#### **3.4.1. Bioestimulación**

La bioestimulación es una técnica de biorremediación que consiste en la modificación del medio para reforzar el crecimiento de los microorganismos nativos a través de la adición de nutrientes, aceptores de electrones, surfactantes y oxígeno al suelo, y con ello, estimular el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos degradadores (Castillo *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2011). Para el éxito de esta técnica se reporta que debe tener por lo menos  $1 \times 10^8$  UFC  $g^{-1}$  de suelo, aunque otros factores como la estructura molecular y la biodisponibilidad del contaminante en el suelo pueden afectar la efectividad de la bioestimulación (Juhász y Naidu, 2000).

La adición de fertilizantes orgánicos e inorgánicos en el suelo contaminado aumenta la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo hasta en 90% (Cuadro 3.2) (Pardo *et al.*,

2004). Así, el uso de diferentes dosis de fertilización con N-P-K en suelo contaminado con petróleo es importante en la bioestimulación. Por ejemplo, en un estudio la aplicación de 60 g de fertilizante N-P-K eliminó 55% del petróleo crudo, mientras que el suelo no fertilizado solo removió 29%. La bioestimulación depende de la relación C:N:P y del tipo de suelo, por lo que la presencia de estos elementos ayudan a la estimulación de microorganismos y de plantas (Ubochi *et al.*, 2006).

Los fertilizantes inorgánicos contribuyen en la degradación de mayor cantidad de hidrocarburos totales de petróleo, debido a su disponibilidad y solubilidad en el suelo, lo que permite que los microorganismos degradadores nativos no tengan limitaciones nutrimentales (Vallejo *et al.*, 2005). La labranza es otra de las técnicas de bioestimulación que también ayuda a incorporar oxígeno al suelo y en combinación con la adición de nutrimentos, estimula la actividad microbiana encargada de degradar los hidrocarburos del petróleo (Ayotamuno *et al.*, 2009).

#### 3.4.2. Bioaumentación

Esta técnica se utiliza cuando se requiere un tratamiento inmediato de un sitio contaminado, o cuando los microorganismos autóctonos son insuficientes en número o presentan limitada capacidad degradadora. Esta práctica consiste en adicionar microorganismos alóctonos o modificados genéticamente, capaces de degradar o transformar algún contaminante orgánico (Volke y Velasco, 2002; Castillo *et al.*, 2005). Estos cultivos microbianos deben tener la capacidad de soportar las condiciones del suelo y ambientales, a la vez de competir con los microorganismos nativos (Gentry *et al.*, 2004; Mancera *et al.*, 2008). En muchos casos, los microorganismos aislados de sitios contaminados no son aplicables para otros sitios, debido al efecto adverso de las condiciones ambientales (Volke y Velasco, 2002). Los microorganismos modificados genéticamente y con capacidad degradadora bajo condiciones de laboratorio, no siempre son eficientes al aplicarlos *in situ* (Sayler y Ripp, 2000).

Cuadro 3.1. Tratamientos utilizados en métodos *in situ* para la remediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos en el suelo.

Tratamientos físicos y químicos	Características	Ventajas	Desventajas
<b>Extracción con vapor</b> <b>Lavado</b> <b>Solidificación y estabilización</b> <b>Oxido-reducción</b> <b>Deshalogenación química</b>	Utilizan las propiedades físicas y/o químicas de los suelos contaminados para destruir o separar la contaminación.	No son efectivos en cuanto a costos. Se puede realizar en periodos cortos, no se requiere de ningún tratamiento posterior.	Los residuos generados deben disponer de tratamientos posteriores. Algunos fluidos de extracción pueden aumentar la movilidad del contaminante.
Tratamientos Biológicos (Biorremediación)	Características	Ventajas	Desventajas
<b>Fitorremediación</b> <b>Bioaugmentación</b> <b>Bioestimulación</b> <b>Laboreo agrícola</b> <b>Biopilas</b> <b>Bioventeo</b> <b>Biorreactores</b> <b>Biofiltros</b>	Se utilizan actividades metabólicas de organismos (plantas, hongos, bacterias) para remover, transformar o degradar los contaminantes a productos inocuos.	Efectivos en cuanto a costos. Benefician al ambiente. Los contaminantes generalmente son degradados. Se requiere de un mínimo o ningún tratamiento posterior.	Requiere mayor tiempo. No se puede usar si el tipo de suelo no favorece el crecimiento y actividad del microorganismo o de la planta utilizada.

Fuente: Martínez y López, 2001; Volke y Velasco, 2002).

Estudios recientes reportan que tanto los hongos filamentosos como las bacterias tienen la capacidad de degradar hidrocarburos del petróleo (Boonchan *et al.*, 2000), en particular el uso de microorganismos nativos, ya que tienen potencial de adaptarse a las condiciones de los suelos contaminados con hidrocarburos (Bento *et al.*, 2005).

Cuadro 3.2. Ejemplos de tratamientos de bioestimulación durante la degradación de contaminantes orgánicos.

Contaminante orgánico	Bioestimulantes	Referencia
Hidrocarburos totales de petróleo	Fertilizantes inorgánicos compuestos y sales simples	Vallejo <i>et al.</i> (2005)
	Labranza y aplicación de N-P-K relación (20-10-10)	Ayotamuno <i>et al.</i> (2009)
	Fertilización con C-N-P en relación (100:5:1)	Karamalidis <i>et al.</i> (2010)
	Aplicación de surfactantes (1:10) en suelo contaminado	Menendez-Vega <i>et al.</i> (2007)
	Solucion mineral de Rennie modificada.	Salinas-Martínez <i>et al.</i> (2008)
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Aplicación de nitrógeno y fósforo.	Jiménez <i>et al.</i> (2007)
Petróleo crudo	Aplicación de Inipol EPA-22 (Elf Atochem, C:N:P relación 62:7.4:0.7)	Delille <i>et al.</i> (2003)
Combustible diesel	Aplicación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y $\text{K}_2\text{HPO}_4$	Bento <i>et al.</i> (2005)
Lodos de petróleo	Fertilización con C-N-P relación (100:10:1)	Hutchinson <i>et al.</i> (2001)

En el caso de hongos aislados de sitios contaminados se han identificado *Rhizopus* sp., *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus sydowii*, cuya capacidad de remover hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA) fue de 36%, 30% y 17%, respectivamente (Mancera *et al.*, 2008). Otros hongos usados en la bioaumentación son *Absidia*, *Achremonium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Mortierella*, *Trichoderma*, *Fusarium* y *Mucor* (Hughes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010).

*Trichoderma* es un hongo filamentoso que se ha destacado por su capacidad de degradar compuestos orgánicos debido a su habilidad enzimática, capacidad de reproducción, predominancia en diversos ecosistemas terrestres, así como por sus bajos requerimientos nutrimentales y sobrevivencia a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Jackson *et al.*, 1991). *Trichoderma* se ha aislado de sitios contaminados con petróleo en la Antártida; sin embargo, no tolera altas concentraciones de hidrocarburos del petróleo, ya que se inhibe el desarrollo de sus hifas (Hughes *et al.*, 2007). *Trichoderma harzianum* degradó pireno entre un 33.7% y 65% (Saraswathy y Hallberg, 2002). Además, diversas cepas de *Trichoderma* presentan tolerancia a altas concentraciones de fenantreno y de benzo[*a*]pireno (Argumedo-Delira *et al.*, 2012).

Las bacterias utilizan el petróleo crudo y sus derivados como fuente carbono y energía y lo oxidan hasta CO<sub>2</sub> y agua. Las fracciones ligeras de hidrocarburos se evaporan y el resto es degradado (entre 40% y 90%), dependiendo de su composición y de la capacidad del consorcio bacteriano (Gómez, 2004). Como bacterias degradadoras de hidrocarburos de petróleo se encuentran *Bacillus cereus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus fusiformis*, *Bacillus pumilus*, *Acinetobacter junii* y *Pseudomonas* sp. las cuales se aislaron de suelos contaminados de Long Beach, California (Bento *et al.*, 2005). Además, *Pseudomonas putida* aislada de un suelo contaminado con petróleo en Chennai (India) demostró

tolerancia y degradación de tolueno y xileno (Purushothaman *et al.*, 2010). Otros géneros de bacterias utilizadas con éxito en la bioaumentación son *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sinorhizobium*, *Paracoccus* y *Achromobacter* (Singh *et al.*, 2004; El Fantroussi y Agathos, 2005; Keum *et al.*, 2006; Teng *et al.*, 2010).

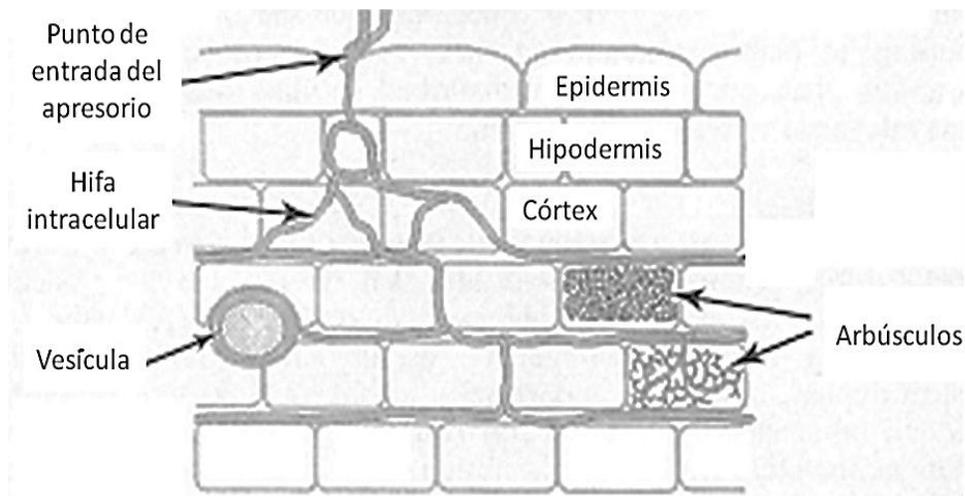
La asociación entre hongos y bacterias presentan mayores tasas de degradación, y acumulación de materia seca (Rivera-Cruz *et al.*, 2004). La degradación de hidrocarburos de petróleo bajo el consorcio hongo-bacteria (*Enterobacter cloacae* y *Cunninghamella echinulata*) fue de 81%, mostrando potencial en la biorremediación (Zhang *et al.*, 2008). La asociación de *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp. aisladas de la rizosfera de *Chamaecrista nictitans* y *Panicum* sp. presentaron las mayores tasas de degradación en suelos contaminados con hidrocarburos de Minatitlán, Veracruz (Hernández-Acosta *et al.*, 2003).

La bioaumentación es un método de biorremediación prometedor y de bajo costo, en el que los microorganismos aplicados son capaces de degradar hidrocarburos de petróleo en el suelo (Gentry *et al.*, 2004). La combinación de la bioestimulación y bioaumentación podría ser una estrategia efectiva para acelerar el proceso de biorremediación de suelos contaminados, aumentando las posibilidades de éxito (Singh *et al.*, 2011).

### **3.5. La simbiosis micorrízica arbuscular y su función en suelos contaminados con hidrocarburos**

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) realizan una de las simbiosis más importantes en más del 80% de las plantas superiores (Sieverding, 1986). Los registros fósiles y datos moleculares, reportan que la asociación de las plantas con los HMA se remonta a más de 400 millones de años (Harrison, 1999; Redecker, 2002). Los HMA son biótrofos obligados y se caracterizan por presentar un crecimiento intra e intercelular en el

tejido cortical de la raíz por medio de hifas y la formación de estructuras llamadas arbuscúlos y vesículas (Smith y Read, 1997). Las hifas externas se desarrollan en el suelo, formando un sistema complejo de redes de hifas responsables de la absorción de nutrimentos, distribución de la asociación y formación de esporas. Los arbuscúlos están encargados de la absorción de C derivado de la planta y del intercambio de nutrimentos como fósforo y nitrógeno (Figura 3.1) (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007; Sivasithamparam *et al.*, 2002). Los HMA confieren a las plantas mayor aprovechamiento de elementos poco móviles en el suelo como P, Cu y Zn, protección contra agentes patógenos, atenuación del estrés causado por altas temperaturas, sequía, salinidad y acidez, además de aumentar la diversidad de microorganismos en la micorrizosfera, favorecer la productividad de las plantas en el ecosistema, y mejorar la calidad del suelo (Azcón-Aguilar y Barea, 1997; Smith y Read, 1997).



**Figura 3.1** Representación de la forma de infección de las hifas de los HMA, mediante la formación de un apresorio sobre la epidermis y el desarrollo de sus estructuras de absorción, almacenamiento e intercambio de nutrientes dentro de la raíz (Sivasithamparam *et al.*, 2002).

Los HMA han sido estudiados ampliamente como una herramienta de recuperación de suelos contaminados con agentes orgánicos e inorgánicos (Leyval *et al.*, 2001). En el caso de contaminantes inorgánicos se ha comprobado que esta simbiosis tiene un efecto benéfico ya que inmoviliza a metales pesados en la raíz y reduce su traslado hacia la parte aérea de la planta (Pawłowska *et al.*, 2000; Leyval *et al.*, 2001). Además, los HMA tienen potencial para estabilizar contaminantes orgánicos como los hidrocarburos totales de petróleo (Kirk *et al.*, 2005).

Los HMA tienen la capacidad de aumentar actividades enzimáticas (peroxidasa, oxidasa, catecol oxidasa, entre otras) cuando se encuentran sometidas a altas concentraciones de un contaminante orgánico (Liu *et al.*, 2004) e inducir la resistencia de *Zea mays* y *Cichorium intybus* ante el estrés causado por diesel y antraceno, respectivamente (Debiane *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009).

Asimismo, los HMA mejoran el crecimiento de Jute (*Corchorus capsulari*) ante concentraciones de antraceno de 50 y 100 mg kg<sup>-1</sup> (Cheung *et al.*, 2008). Los efectos de los hidrocarburos aromáticos como benceno, tolueno, etilbenceno y xileno sobre los HMA dependen de la especie del hongo y de la naturaleza del contaminante. El benceno reduce la colonización de *Glomus mosseae*, mientras que el etilbenceno, el xileno y el tolueno no afectan la colonización del hongo en la planta. Sin embargo, *Gigaspora margarita* se desarrolla satisfactoriamente en la planta bajo presencia de benceno; mientras que *Gigaspora rosea* presentó menor colonización ante concentraciones de tolueno y etilbenceno (Volante *et al.*, 2005). El benzo[a]pireno en altas concentraciones afectó la colonización, la longitud de hifas extraradicales y la formación de esporas en cultivo *in vitro* con *Cichorium intybus* (Debiane *et al.*, 2009). No obstante, las plántulas de *Medicago sativa* sometidas a varias concentraciones de benzo[a]pireno (0, 1, 10 y 100 mg kg<sup>-1</sup>) e

inoculadas con *Glomus caledonium* degradaron este contaminante en un 87% en comparación con el tratamiento sin el HMA (Liu *et al.*, 2004).

La inoculación de *M. sativa* con *Glomus mosseae* y *Glomus etunicatum* en suelo contaminado con fenantreno (103 mg kg<sup>-1</sup>) y pireno (74 mg kg<sup>-1</sup>), contribuyó en la degradación de 98.6% y 88%, respectivamente, en un lapso de 70 días bajo condiciones de invernadero (Gao *et al.*, 2011). Estudios con *Melilotus albus* demuestran que los HMA mejoran la biomasa vegetal, el contenido de nutrientes y la actividad antioxidante en plantas cultivadas en diesel a una concentración de 7,500 mg kg<sup>-1</sup>, cuya degradación fue mayor (47%) en plantas inoculadas con *Glomus Zac-19* en comparación con las no inoculadas (29.8%) (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Existen trabajos en los que se demuestra que estos hongos simbióticos son una alternativa para la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Liu *et al.*, 2004).

### **3.6. Fitorremediación**

La fitorremediación, consiste en el uso de plantas para remover contaminantes en suelos y aguas, y tiene diversas clasificaciones con base en la actividad fisiológica de las plantas en presencia de los contaminantes. Así, existen plantas capaces de acumular al contaminante en sus tejidos, es decir, se lleva a cabo una fitoextracción (Ortiz *et al.*, 2009).

Otras plantas contribuyen a la precipitación del contaminante a través de exudados radicales, lo que se le conoce como fitoestabilización. Algunas plantas tienen la capacidad de absorber, concentrar y precipitar al contaminante por medio de sus raíces, lo que se conoce como rizofiltración, mientras que otras tienen la capacidad de liberar enzimas específicas que provocan que el contaminante sea degradado, lo que se llama fitodegradación. Cuando los contaminantes orgánicos solubles y el agua son absorbidos por la planta y convertidos en sus fases volátiles (gases) que son liberadas a la atmósfera por los

estomas, se efectúa la fitovolatilización (López-Martínez *et al.*, 2005; Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

### **3.7. Plantas utilizadas en la fitorremediación**

Debido a la función vital que desempeñan las plantas en los ecosistemas, estos organismos han sido utilizados para la diagnosis o la predicción de las consecuencias negativas de actividades antropogénicas mediante el estudio de sus procesos fisiológicos, respuestas bioquímicas, mecanismos de adaptación, e incluso mortalidad (Pernía *et al.*, 2008). En muchos estudios de remediación se han utilizado gramíneas y leguminosas, probando ser excelentes en la disminución de contaminantes (Sangabriel *et al.*, 2006). El sistema radical de las gramíneas es extenso y fibroso, lo que le permite tener mayor área de superficie de raíz en el suelo (Hernández y Mager, 2003), mientras que las leguminosas tienen la habilidad de fijar nitrógeno, por lo que no compiten con otros microorganismos por este nutrimento en suelos contaminados. Sin embargo, en algunos casos las gramíneas son más tolerantes al combustóleo que las leguminosas (García-López *et al.*, 2006; Sangabriel *et al.*, 2006).

Después de un derrame de petróleo, los hidrocarburos exhiben alto grado de toxicidad al estar en contacto con porciones frágiles o jóvenes de raíces y brotes; sin embargo, tienen poco efecto sobre partes leñosas de arbustos y árboles (Adam y Duncan, 2002).

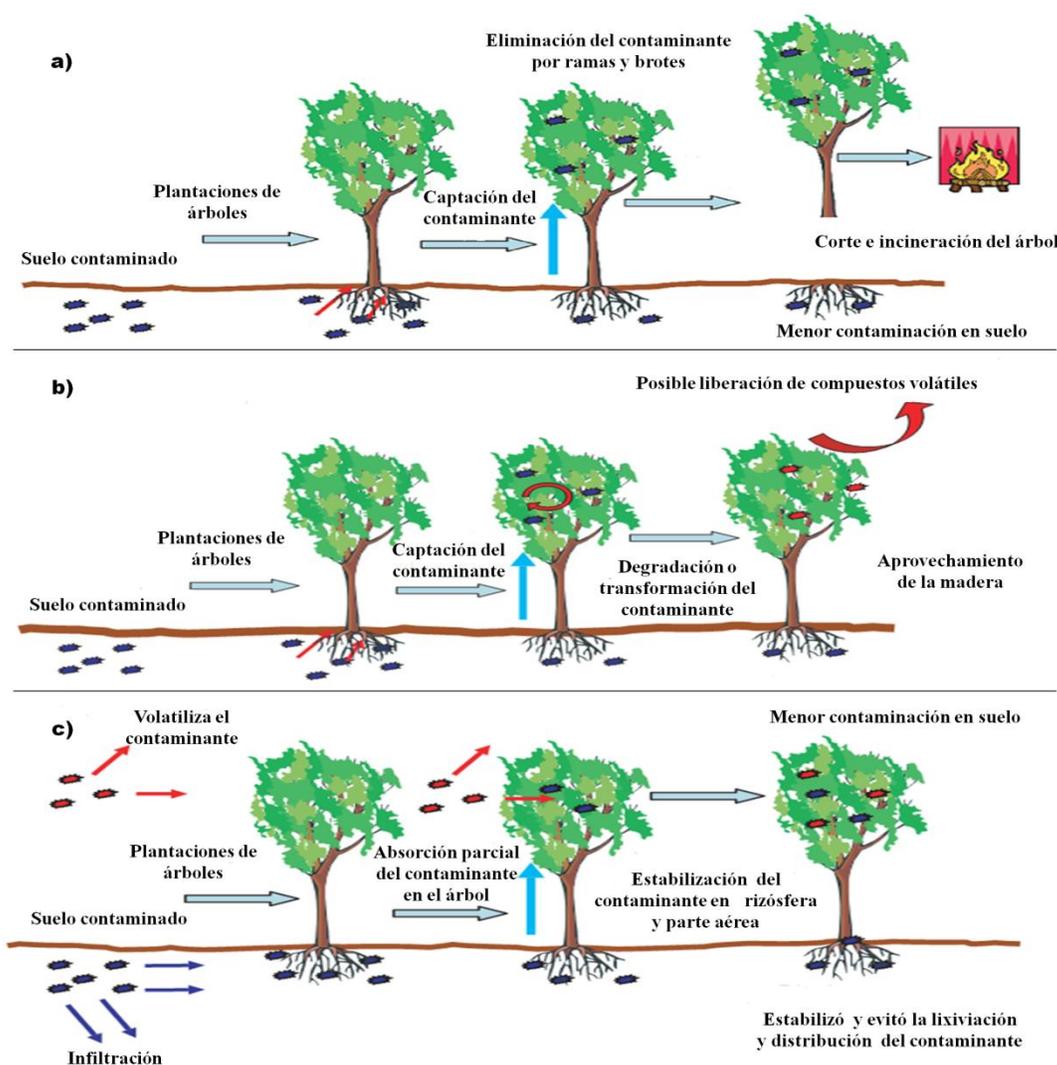
Los organismos genéticamente modificados (OGM), comúnmente conocidos como transgénicos, juegan un papel importante en diversos ámbitos de la vida actual (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Por ejemplo, el gen ACC deaminasa extraído de *Enterobacter cloacae* UW4 e insertado en plántulas de canola (*Brassica napus*), favorece la tolerancia de esta planta a la presencia de arseniato además de aumentar la biomasa en tallos y hojas en

comparación con las plantas no transformadas genéticamente (Nie *et al.*, 2002). Otro ejemplo se refiere a la expresión del gen peroxidasa básica XTP1 insertado en *Lycopersicon esculentum* (utilizando el método de transformación mediada por la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*) sometido a estrés por fenol (contaminante tóxico presente en aguas industriales), en donde mostró una acumulación de 85% de fenol comparado con el tipo silvestre (Wevar *et al.*, 2005). La ingeniería genética permite que las plantas modificadas sean más resistentes a altas concentraciones de contaminantes; sin embargo, aún existe controversia para el uso de las mismas (Dietz y Jerald, 2001).

Las especies arbóreas se han utilizado para la fitoremediación de suelo contaminado, por su capacidad de extraer, secuestrar, degradar y transformar algunos contaminantes. A esta práctica realizada con especies arbóreas se ha denominado dendroremediación (Figura 3.2) (Schoenmuth y Pestemer, 2004a; Tamas y Gullner, 2006). Los árboles contribuyen al establecimiento de mayor número de microorganismos en su rizósfera incluyendo bacterias, actinomicetos y algas verde-azules (Stomp *et al.*, 1993). Además, su sistema radical penetra capas más profundas del suelo en comparación con las plantas herbáceas. Entre las especies arbóreas tolerantes y acumuladoras de contaminantes encontramos a *Cupressus arizonica*, la cual retiene metales como níquel, cobre, plomo y cadmio (Alcalá *et al.*, 2008); *Populus deltoides* remueve 1,4-dioxano (Aitchison *et al.*, 2000); *Acacia nilotica* y *Eucalyptus camaldulensis* presentan tolerancia a residuos municipales (Singh *et al.*, 2010), y *Erythrina crista-galli* tiene potencial para la fitorremediación de sitios contaminados con petróleo (Farias *et al.*, 2009).

Por otra parte, *Pinus sylvestris* y *Populus deltoides*, favorecen mayor disipación de diesel en comparación con leguminosas y gramíneas (Palmroth *et al.*, 2002), mientras que

*Salix* (Clon EW-20) y *Picea abies* acumulan 80% de trinitrotolueno (TNT) (Schoenmuth y Pestemer 2004b). Por otra parte, *Angophora floribunda*, *Acacia implexa*, *A. longifolia*, *Casuarina cunninghamiana*, *Eucalyptus camaldulensis* y *E. melliodora* tienen excelente tolerancia a Zn, Cu, Ag, Pb en suelos contaminados por la industria minera (Cuadro 3.3) (Grant *et al.*, 2001). Lo anterior denota la importancia que tienen las especies arbóreas en la recuperación de suelos contaminados con compuestos orgánicos e inorgánicos.



**Figura 3.2.** Diagrama que muestra la manera en que los contaminantes son secuestrados por las especies arbóreas a través de la fitoextracción (a), fitodegradación (b) y fitoestabilización (c).

(Peuke y Rennenberg, 2006).

**Cuadro 3.3.** Especies arbóreas utilizadas en la fitorremediación de contaminantes orgánicos e inorgánicos

<b>Especie arbórea</b>	<b>Características del estudio</b>	<b>Principales resultados</b>	<b>Referencia</b>
<i>Cupressus arizonica</i>	Muestra de hojas tomadas de árboles establecidos en zona urbana.	Acumulan 1252 mg Cu L <sup>-1</sup> , 193 mg Ni L <sup>-1</sup> , 1,51 mg Co L <sup>-1</sup> , y 2512 mg Pb L <sup>-1</sup> .	Alcalá <i>et al.</i> (2008)
<i>Populus deltoides</i>	Cultivo hidropónico en laboratorio.	Removió Dioxano (23 mg L <sup>-1</sup> ).	Aitchison <i>et al.</i> (2000)
<i>Acacia nilotica</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Campo experimental de la India,	Toleraron y aumentaron su biomasa; y degradan residuos municipales.	Singh <i>et al.</i> (2010)
<i>Erythrina crista-galli</i>	Condiciones controladas en invernadero	Degradó hidrocarburos del petróleo de bajo peso molecular.	Farías <i>et al.</i> (2009)
<i>Pinus sylvestris</i> , <i>Populus deltoides</i>	Condiciones de invernadero	Extracción de 60% de diesel en 60 días, y 94% al finalizar el estudio.	Palmroth <i>et al.</i> (2002)
<i>Angophora floribunda</i> , <i>Acacia implexa</i> , <i>Acacia longifolia</i> , <i>Casuarina cunninghamiana</i> , <i>Eucalyptus camaldulensis</i> y <i>Eucalyptus melliodora</i>	Condiciones de invernadero	Tolerancia a suelo contaminado por la industria minera.	Grant <i>et al.</i> (2001)
<i>Salix</i> (Clon EW-20) y <i>Picea abies</i>	Condiciones de invernadero	Acumulan el 80% de TNT en raíces, tallos, madera, hojas y acículas.	Schoenmuth y Pestemer, (2004b)
<i>Prosopis pallida</i> , <i>Thespesia populnea</i> , <i>Cordia subcordata</i> , <i>Erythrina variegata</i> y <i>Casuarina equisetifolia</i> ,	Condiciones de invernadero	Toleran y acumulan concentraciones de 5 a 10 mg kg <sup>-1</sup> de diesel bajo condiciones de salinidad.	Sun <i>et al.</i> (2004)

### 3.8. *Casuarina equisetifolia* L. y sus aplicaciones ambientales

*Casuarina equisetifolia* L. es un árbol de origen australiano bien adaptado en México. Esta especie arbórea pertenece al Reino Plantae; Subreino Traqueobionta; Superdivisión Spermatophyta; División Magnoliophyta; Clase Magnoliopsida; Subclase Hamamelidae; Orden Casuarinales; Familia Casuarinaceae (SIIT, 2011). Esta especie es un excelente candidato para la reforestación rural y urbana en los trópicos debido a su rápido crecimiento y a su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al tener simbiosis con el actinomiceto *Frankia* (Valdés *et al.*, 2004). Algunos aislamientos de *Frankia*, en el Golfo de México, han demostrado que esta simbiosis ayuda al árbol a obtener mayor altura, lo que permite que *Casuarina* sea una excelente candidata para la reforestación en zonas costeras (Vázquez *et al.*, 2000). La inoculación de *Casuarina* con HMA y *Frankia* aumenta la biomasa total de la planta, el número de nódulos, y la actividad nitrogenasa en plántulas establecidas con deficiencia de fósforo (Vasanthakrishna *et al.*, 1994; Valdés *et al.*, 2004).

*Casuarina equisetifolia* L. es un árbol siempre verde de tamaño mediano y de crecimiento rápido, que alcanza una altura de hasta 45 m. Este árbol se distingue por su corteza de color marrón gris claro y textura áspera y arrugada, tiene una copa de ramas fotosintéticas de color verde oscuro que se inclinan hacia abajo, y crece mejor en las zonas climáticas tropicales y subtropicales húmedas, cuya precipitación anual varía entre 500 y 700 mm, y donde existe a menudo una temporada seca de 6 a 8 meses. En su área de distribución natural, *Casuarina* también se desarrolla en regiones costeras particularmente en dunas, en llanos arenosos y en áreas con topografías con pendientes leves de hasta 100 m de elevación (CONABIO, 2009).

Esta especie arbórea, es usualmente monoica, con flores femeninas y masculinas separadas, pero apareciendo en el mismo individuo, aunque en algunas áreas, la especie es

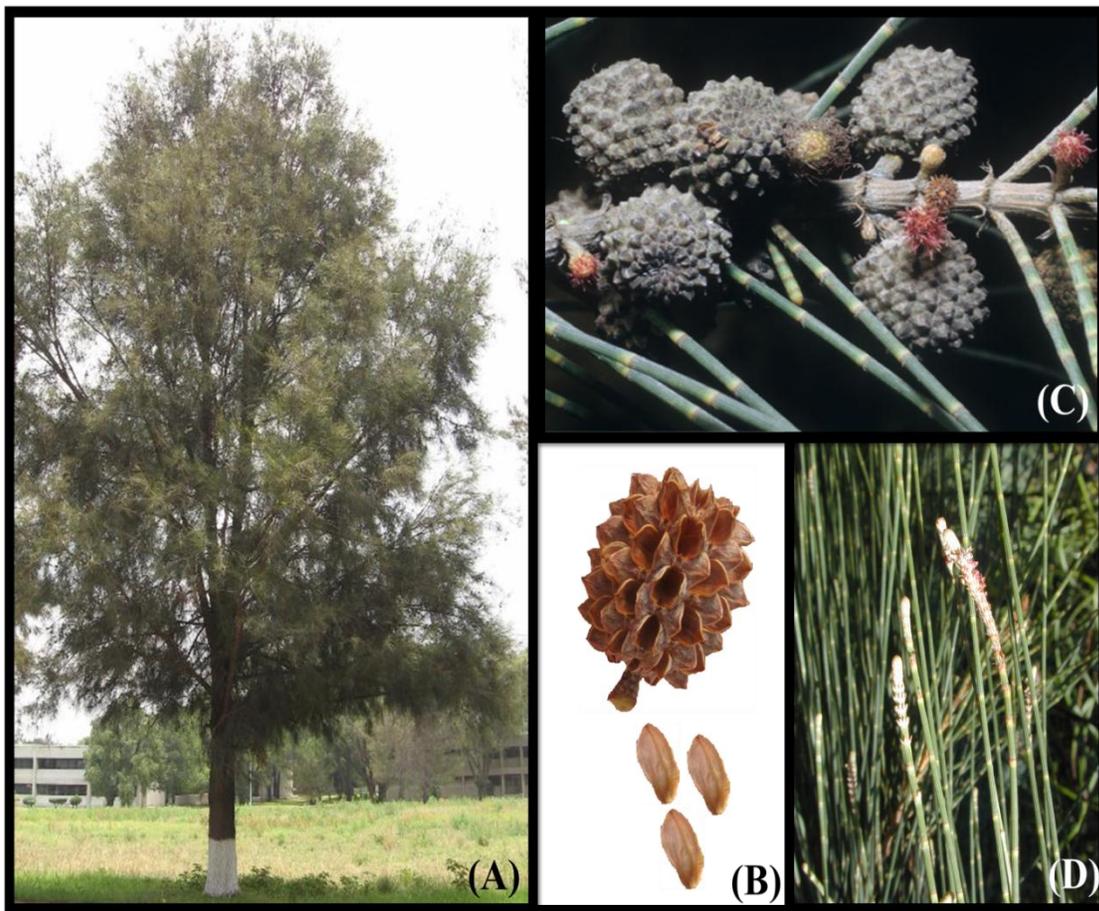
predominantemente dioica. Los racimos de flores masculinas (espigas o amentos) que crecen al final de las ramillas, son de forma cilíndrica estrecha, de 1 a 2 cm de largo y menos de 3 mm de grosor. Las flores masculinas se concentran en anillos entre escamas grisáceas, y cada flor consiste de un estambre expuesto de color marrón de menos de 3 mm de largo, y de dos escamas de sépalos de color marrón y tamaño minúsculo (Figura 3.3). Los racimos de flores femeninas consisten de espigas ovoides o globulares de menos de 3 mm de diámetro y con un pedúnculo corto. Las flores femeninas individuales consisten de un pistilo de 5 mm de largo que incluye un ovario, un estilo muy corto y dos estigmas. Las semillas aladas son dispersadas por el viento (CONABIO, 2009).

La madera de *Casuarina* es muy dura y pesada con un peso específico de entre 0.80 y 1.20 g cm<sup>-3</sup> para madera secada al aire, y 0.61 g cm<sup>-3</sup> para madera con un contenido de humedad del 46% y se caracteriza por ser excepcionalmente fuerte y tenaz. Su madera se utiliza en postes y vigas para construcción, postes de conducción eléctrica o telefónica y mangos de herramientas (CATIE, 1991). La madera y los conos de la *Casuarina* constituyen un combustible excelente (carbón en particular), producen poca ceniza, y se queman de manera satisfactoria, incluso cuando verdes, su poder calorífico es de 20,700 kJ/kg<sup>-1</sup> y produce un carbón de excepcional calidad (30,000 kJ/kg<sup>-1</sup>) (CATIE, 1991). Además, la madera es una materia prima regular para pulpas químicas y semi-químicas para la producción de papel (Villaseñor y Rutiaga, 2000).

Esta planta se utiliza ampliamente como barreras contra el viento y para el control de la erosión a lo largo de las costas arenosas (dunas) y por su adaptabilidad a zonas con altos grados de salinidad (Ndiaye *et al.*, 1993; Moezel *et al.*, 1989; Zhong *et al.*, 2010). Esta especie forestal, es valiosa por sus altas tasas de producción de hojarasca la cual protege al suelo y fauna, debido a su aporte de materia orgánica (Bruzón *et al.*, 2003). La corteza de *Casuarina* es rica en taninos

(de 6% a 8%) y se usan en algunos lugares para el curtido de pieles de animales (CONABIO, 2009).

En el caso de la remediación de sitios contaminados *Casuarina equisetifolia* ha demostrado ser muy eficaz en suelos devastados por la industria minera a cielo abierto en los cuales demostró 100% de supervivencia y mayor altura al compararse con otras especies forestales (Grant *et al.*, 2001). Además, *Casuarina* presenta tolerancia a la presencia de metales pesados, los cuales generalmente acumula en sus raíces (Shanker *et al.*, 2005). Con lo que respecta a contaminantes orgánicos existe muy poca información, por lo que la respuesta de *Casuarina* ante estos compuestos no se conoce (Sun *et al.*, 2004).



**Figura 3.2.** Estructuras botánicas que caracterizan del árbol de *Casuarina equisetifolia* (A), fruto y semilla (B), flores femeninas (C) y flores masculinas (D) (CONABIO, 2009).

### 3.9. Discusión general de la revisión de literatura y justificación

Los métodos de biorremediación y fitorremediación de suelos en los últimos años han tenido grandes aportaciones en la remoción de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, la contaminación por productos orgánicos y su efecto en especies arbóreas con capacidades excelentes para acumular y degradar contaminantes, así como de establecer simbiosis con microorganismos benéficos como bacterias, hongos filamentosos y HMA, son aspectos que han sido poco estudiados.

Las técnicas de fitorremediación de suelos se realizan generalmente con plantas de importancia agrícola o con especies de ciclos cortos (gramíneas y leguminosas), y muy poco se trabaja con especies arbóreas, las cuales pueden albergar a más plantas bajo su copa, ayudando con ello, a que el suelo contaminado se regenere con mayor rapidez.

La información recabada sobre *Casuarina* indica excelentes cualidades de adaptación a sitios poco aptos para otras plantas. En el caso de *Casuarina equisetifolia* existen pocos trabajos que estudien su respuesta a la presencia de contaminantes orgánicos. Mientras que para *Trichoderma viride* y *Sphingobacterium* sp. solo se ha observado su respuesta a hidrocarburos en medios de cultivo. Así, este trabajo determinó la respuesta de *Casuarina* en suelo contaminado con diesel en condiciones de invernadero, así como su capacidad de degradación de diesel con la ayuda de bioestimulación y de bioaumentación, técnicas que en los últimos años ofrecen alternativas de recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos de manera sustentable. Así mismo, se evaluó la inoculación (bioaumentación) de *Trichoderma viride*, *Sphingobacterium* y *Rhizophagus intraradices*, y la aplicación de fertilizantes (bioestimulación) como prácticas que contribuyen a degradar hidrocarburos del diesel durante el proceso de fitorremediación mediado por *Casuarina equisetifolia*.

## CAPÍTULO IV

### TOXICIDAD DEL DIESEL EN LA GERMINACIÓN DE SEMILLAS Y EMERGENCIA DE PLÁNTULAS DE *Casuarina equisetifolia* L.

#### RESUMEN

En este trabajo se evaluó el efecto tóxico del diesel sobre la germinación de semillas y emergencia de plántulas de *Casuarina equisetifolia*. Para ello se realizó un bioensayo bajo un diseño completamente al azar, con 15 tratamientos con tres repeticiones, en condiciones de invernadero durante 25 días. Las semillas (10 semillas por caja de Petri) fueron expuestas a concentraciones de diesel de 100, 250, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>, e incluyendo un testigo (0 mg kg<sup>-1</sup>). Se observaron efectos significativos ( $P \leq 0.01$ ) en la germinación de las semillas por efecto de la concentración de diesel. A los 10 días, la germinación fue mayor y se presentó en menor tiempo ante concentraciones de diesel más altas (2500, 7500, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>). La mayor germinación ocurrió en la concentración de 20000 mg kg<sup>-1</sup>, en tanto que la menor germinación se registró con 5000 mg kg<sup>-1</sup>. La emergencia de las plántulas fue significativamente mayor ( $P \leq 0.01$ ) en las concentraciones de 250, 500, 1500, 3000 y 5000 mg kg<sup>-1</sup>, presentando un retraso de cinco días en comparación con la emergencia obtenida ante concentraciones altas. A los 15 días, las plántulas ante las dosis de 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup> presentaban clorosis y a los 25 días murieron. En concentraciones de 5000, 7500 y 10000 mg kg<sup>-1</sup> la altura de tallo, la longitud radical y la biomasa seca total de las plantas disminuyeron significativamente. En general, las semillas de *C. equisetifolia* germinan ante concentraciones altas de diesel, produciendo síntomas de toxicidad en las plántulas, y en algunos casos su muerte.

**Palabras clave:** Clorosis, muerte, contaminación, hidrocarburos del petróleo.

## CHAPTER IV

### DIESEL TOXICITY ON SEED GERMINATION AND EMERGENCE OF SEEDLINGS OF *Casuarina equisetifolia* L.

#### ABSTRACT

This study evaluated the toxic effects of diesel on seed germination and emergence of seedlings of *Casuarina equisetifolia*. A bioassay was set under a completely randomized design including 15 treatments with three replicates under greenhouse conditions during 25 days. Seeds (ten seeds per Petri dish) were exposed to diesel concentrations of 100, 250, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 and 20000 mg kg<sup>-1</sup>, including a control (0 mg kg<sup>-1</sup>). There were significant effects ( $P \leq 0.01$ ) on seed germination due to diesel exposure. After 10 days, seed germination was greater but in less time at high diesel concentrations (2500, 7500, 15000 and 20000 mg kg<sup>-1</sup>). The greatest germination occurred at 20000 mg kg<sup>-1</sup>, whereas the lower germination was obtained at 5000 mg kg<sup>-1</sup>. Seedling emergence was significantly high ( $P \leq 0.01$ ) at concentrations of 250, 500, 1500, 3000 and 5000 mg kg<sup>-1</sup>, and showing a delay of five days when compared to higher concentrations. At 15 days, seedlings from 15000 and 20000 mg kg<sup>-1</sup> showed chlorosis and at 25 days plant died. Concentrations of 5000, 7500 and 10000 mg kg<sup>-1</sup> significantly decreased plant height, root length and total dry mass. In general, seeds of *C. equisetifolia* germinated at high concentrations of diesel, which exerted toxicity symptoms on seedlings and in some cases their death.

**Key words:** Chlorosis, plant death, contamination, petroleum hydrocarbons.

## INTRODUCCIÓN

La industria petroquímica es una actividad que tiene mucho auge en México, cuya producción de petróleo crudo se estima en 2,601 millones de barriles diarios (Mbd). El diesel se encuentra dentro de los cinco productos más comercializados a nivel nacional, y su producción para el año 2009 fue de 337 Mbd (PEMEX, 2010). El diesel se caracteriza por ser una mezcla compleja de hidrocarburos de 8 a 26 carbonos, en el cual la mayoría de los componentes son alcanos de cadena lineal, ramificada y aromática (Adam y Duncan, 1999). De manera paralela al beneficio energético, la industria petroquímica, también ha ocasionado graves problemas de tipo ambiental, ya que en los últimos años se han reportado diversos derrames en suelo y agua, generados por procesos de perforación, traslado del crudo y rompimiento de oleoductos, principalmente (Jiménez, 2002).

Para entender el efecto de los contaminantes de petróleo depositados en suelo es necesario tomar en cuenta la concentración, la composición del hidrocarburo y la toxicidad que pueda provocar sobre los organismos (Al-Mutairi *et al.*, 2008). Los hidrocarburos del petróleo provocan toxicidad en las plantas al modificar la solubilidad y la permeabilidad de las membranas celulares, y al disminuir el intercambio gaseoso e inhibir la germinación, la emergencia de plántulas, el número de brotes y la biomasa total (Adam y Duncan 1999; Lin *et al.*, 2002). Además, el hidrocarburo no permite la generación de raíces adventicias en las plantas, generando síntomas de clorosis (Cunningham *et al.*, 1996; Kechavarzi *et al.*, 2007; Mendez-Natera *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008).

En el suelo, los hidrocarburos modifican las condiciones físicas y por tanto su fertilidad, lo que hace que no se establezca la vegetación (Martínez y López, 2001). La toxicidad que genera el hidrocarburo en las plantas depende de la especie de planta (Jing *et al.*, 2008). Así, bajas concentraciones de hidrocarburos del petróleo en el suelo estimulan el crecimiento de algunas

plantas herbáceas, pero al aumentar su concentración inhibe el crecimiento vegetativo y su producción de biomasa vegetal (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Rivera-Cruz *et al.*, 2005). La germinación de semillas de *Zea mays* es inhibida por petróleo crudo ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ); sin embargo, cuando estas se encuentran en presencia de hidrocarburos aromáticos como naftaleno, fenantreno y pireno, la germinación es estimulada, aunque la emergencia de las plántulas es afectada negativamente (Baek *et al.*, 2004). La germinación de semillas de *Bouteloua curtipendula*, *Cenchrus ciliaris*, *Echinochloa crusgalli* y *Rhynchelytrum repens* en condiciones *in vitro* no presentó inhibición en presencia de hidrocarburos aromáticos y aceite crudo Maya, pero se observó disminución de altura del tallo y de la longitud de la raíz (Reynoso-Cuevas *et al.*, 2008). *Spartina alterniflora* sometida a diesel ( $456 \text{ mg g}^{-1}$ ) redujo significativamente la biomasa vegetal, la altura de tallo y el número de brotes (Lin *et al.*, 2002). En el caso de pastos, *Dactylis glomerata*, *Festuca arundinacea*, *Festuca rubra* y *Lolium perenne*, y de leguminosas como *Lotus corniculatus*, *Trifolium pratense*, y *Trifolium repens* los hidrocarburos policíclicos aromáticos ( $1000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) estimularon la germinación de las semillas y emergencia de plántulas tanto de leguminosas como de pastos (Smith *et al.*, 2006).

Algunas especies arbóreas como *Cupressus*, *Populus*, *Eucalyptus*, *Erythrina*, *Pinus*, *Salix*, *Angophora*, *Leucaena*, *Acacia* y *Casuarina* presentan tolerancia y capacidad de establecerse en suelo contaminado con hidrocarburos (Aitchison *et al.*, 2000; Alcalá *et al.*, 2008; Farías *et al.*, 2009; Grant *et al.*, 2001; Palmroth *et al.*, 2002; Schoenmuth y Pestemer 2004b; Singh *et al.*, 2010). Por ejemplo, *Erythrina crista-galli* establecida en suelo contaminado con petróleo (0, 25, 50 y  $75 \text{ g kg}^{-1}$ ), presentó aumento en la germinación de semillas ante las concentraciones más altas, y mostró una supervivencia de plántulas de 64%, 70%, 61% y 96%, respectivamente (Farías *et al.*, 2009). De igual manera, *Leucaena* sp. aumentó su germinación y emergencia de plántulas ante  $150000 \text{ mg kg}^{-1}$  de HTP (Rivera-Cruz *et al.*, 2005).

En el caso de *Casuarina equisetifolia* se ha demostrado que esta especie tolera condiciones de suelos devastados por la industria minera al mostrar 100% de supervivencia y mayor altura en comparación con otras especies forestales (Grant *et al.*, 2001). Además, *Casuarina* presenta tolerancia a la presencia de cromo (III) en el suelo ( $464 \mu\text{g g}^{-1}$ ), acumulando este contaminante en sus raíces (Shanker *et al.*, 2005). En lo que respecta a contaminantes orgánicos se han realizado pocos trabajos con *Casuarina equisetifolia* y sólo se ha reportado su tolerancia a diesel ( $5$  y  $10 \text{ g kg}^{-1}$ ) en suelos salinos (Sun *et al.*, 2004). Esta especie arbórea de origen Australiano muestra cualidades excelentes para la reforestación rural y urbana, debido a su rápido crecimiento, y capacidad de fijar nitrógeno atmosférico (Valdés *et al.*, 2004), y por su adaptabilidad a condiciones adversas (Ndiaye *et al.*, 1993; Moezel *et al.*, 1989; Zhong *et al.*, 2010). El estudio de especies arbóreas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo es un área poco explorada. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la toxicidad del diesel sobre la germinación de semillas y la emergencia de plántulas de *Casuarina equisetifolia*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El suelo utilizado en este trabajo fue recolectado en San Diego Municipio de Texcoco, Estado de México, al cual se determinaron sus características físicas y químicas (Cuadro 4.1) con métodos estandarizados del Laboratorio de Fertilidad de Suelos (Colegio de Postgraduados) (Etchevers, 1988). El suelo se tamizó y esterilizó en autoclave ( $121 \text{ }^\circ\text{C}$  durante 4 h) y posteriormente, se secó a  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  para después contaminarlo con diferentes dosis de diesel.

Para la contaminación de suelo, se pesaron 200 g de suelo seco estéril al cual se adicionó diesel en las siguientes concentraciones: 100, 250, 500, 800, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000, 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000  $\text{mg kg}^{-1}$ ; además, se incluyó un testigo sin contaminar. Al suelo

seco, se le agregaron 150 mL de acetona (Fermont®) como disolvente enriquecido con la cantidad de diesel correspondiente, con el fin de favorecer la impregnación homogénea del contaminante en el suelo, el cual una vez contaminado se dejó reposar por cinco días.

Cuadro 4.1. Características físico-químicas del suelo colectado en San Diego municipio de Texcoco, Estado de México.

<b>pH</b> 1:2 H <sub>2</sub> O	<b>Conductividad eléctrica</b> 1:5 H <sub>2</sub> O cm dS <sup>-1</sup>	<b>Materia orgánica</b> (%) Walkley-Black	<b>N</b> (%)	<b>P</b> Olsen mg kg <sup>-1</sup>	<b>K</b> NH <sub>4</sub> Oac 1 N pH 7 meq 100g <sup>-1</sup>	<b>CIC</b> 1 N	<b>N-NO<sub>3</sub> N-NH<sub>4</sub></b> KCl 2 N mg kg <sup>-1</sup>	<b>Textura</b>
7.2	0.28	2.8	0.14	34	1.5	14.8	45    6	Franco Arenoso

Las semillas de *Casuarina equisetifolia* fueron recolectadas en el Campus Montecillo, y se secaron en bolsas de papel a temperatura ambiente (18 °C). Al momento de su uso, las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10%, y se lavaron con suficiente agua destilada estéril para quitar el exceso de hipoclorito. Las semillas fueron sembradas en cajas de Petri (10 semillas por caja) por triplicado, con 70 g de suelo sin contaminar y/o contaminado con las concentraciones de diesel mencionadas. La humedad del suelo se mantuvo mediante riegos con agua destilada estéril, y diariamente se realizaron observaciones del desarrollo de la semilla.

Las variables evaluadas fueron el número de semillas germinadas, y la emergencia de plántulas, así como la biomasa seca total, la altura de tallo y la longitud de la raíz después de 25 días (finalización del bioensayo). Las plántulas fueron cosechadas de las cajas de Petri, eliminando el exceso de suelo, para separar y medir la parte aérea y la longitud de la raíz, y posteriormente, se colocaron en bolsas de papel a 70 °C, durante 48 h, para determinar la biomasa seca total de ambos órganos.

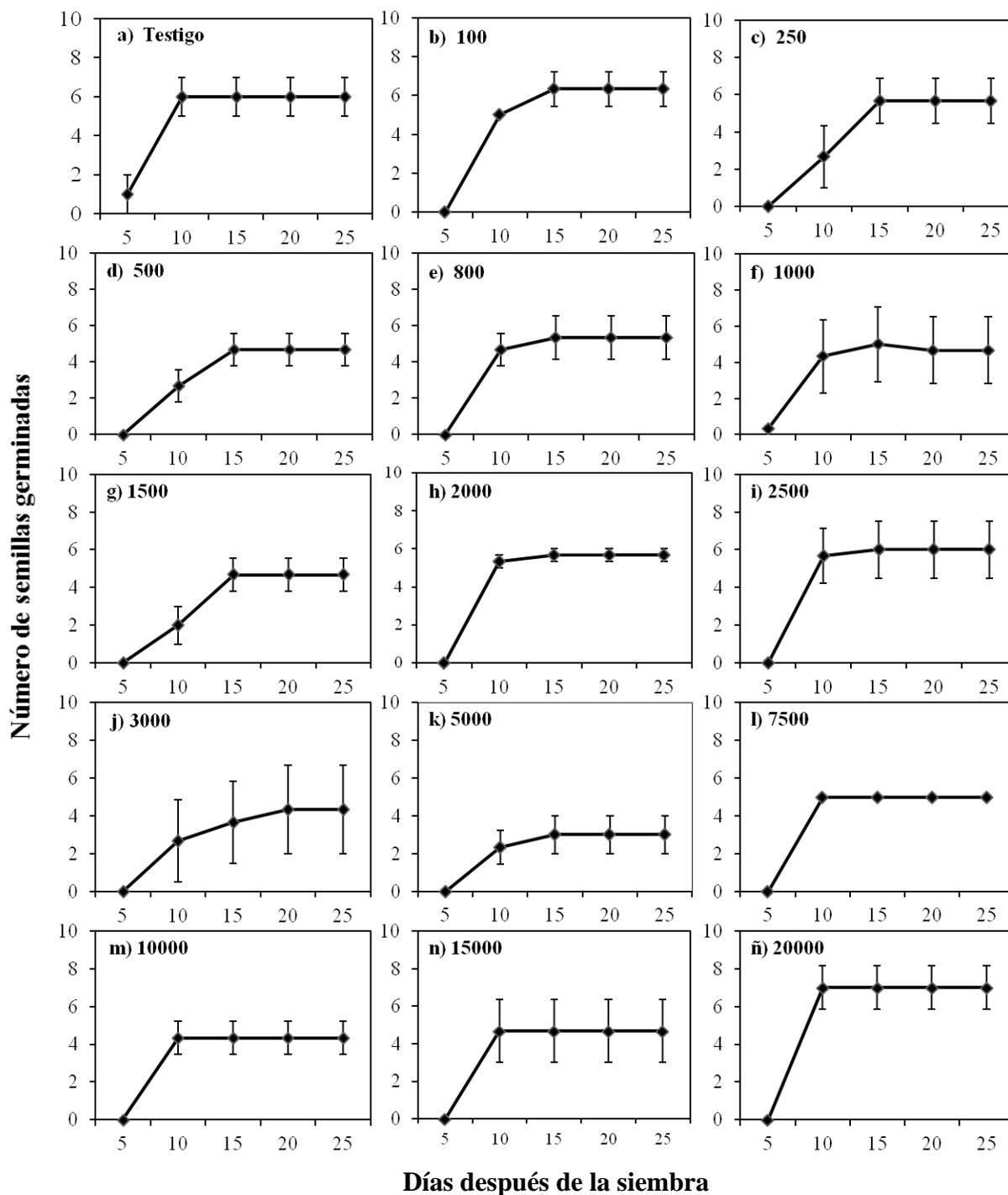
El bioensayo se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero con una temperatura máxima y mínima aproximada de 24 °C a 13 °C, y una humedad relativa máxima y mínima promedio de 30% a 38%. El experimento tuvo un diseño completamente al azar con 14 tratamientos. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $\alpha = 0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

## RESULTADOS

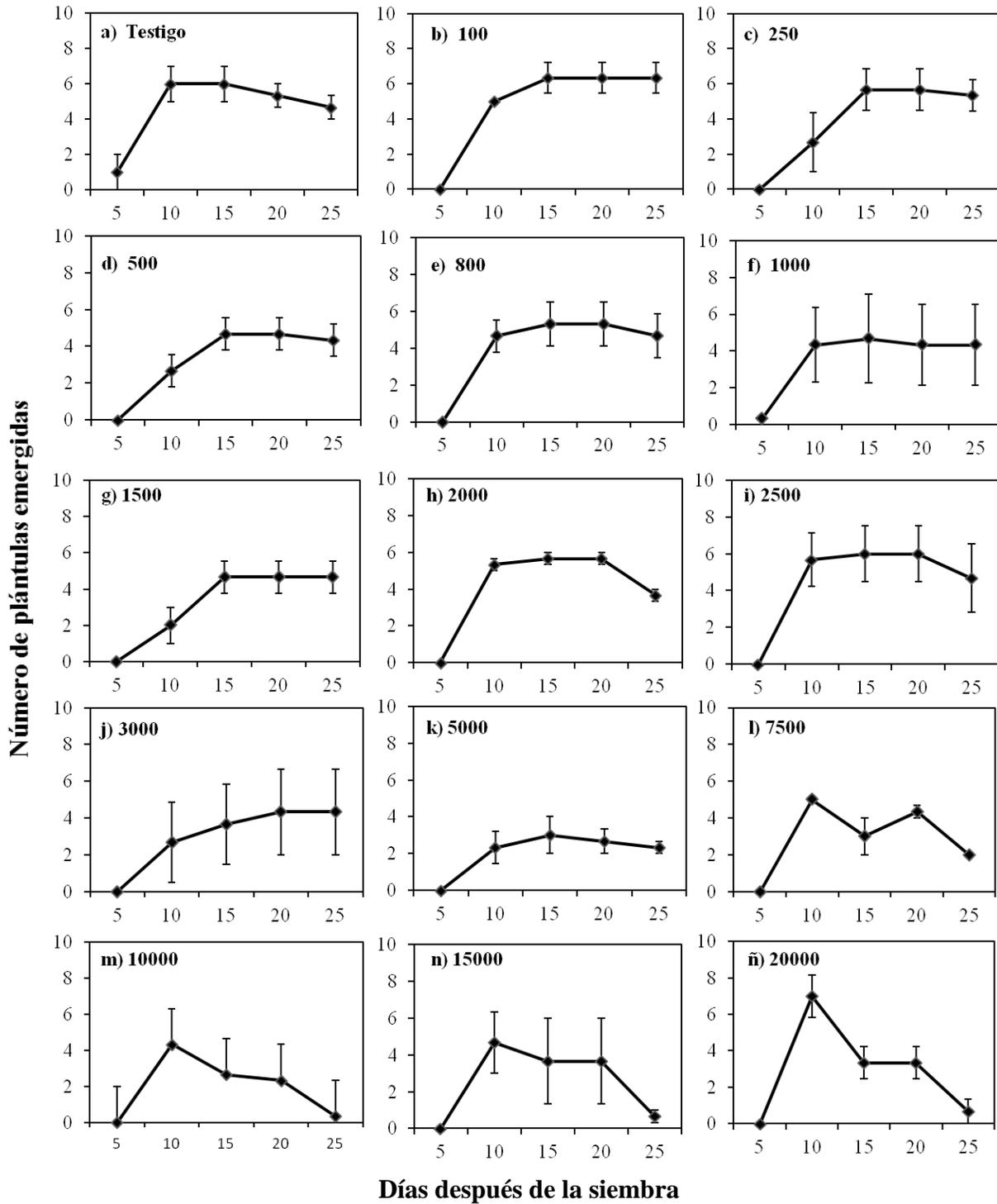
### Germinación de semillas y emergencia de plántulas

Tanto la germinación de semillas como la emergencia de las plántulas de *Casuarina equisetifolia* mostraron diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.001$ ). La mayor germinación se observó en los primeros 10 días en aquellos tratamientos con las concentraciones más altas de diesel (7500 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>), mientras que en las concentraciones de 250, 500, 1500, 3000 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> se observó un retraso de cinco días. A los 25 días de exposición al diesel, la mayor germinación se presentó ante 20 000 mg kg<sup>-1</sup>, en tanto que la menor germinación se registró ante 5000 mg kg<sup>-1</sup>(Figura 4.1).

La emergencia de las plántulas se registró a los 10 días; sin embargo, las plántulas presentaron síntomas de clorosis por efecto del diesel en las concentraciones de 5000, 7500, 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>. A partir del día 15 se presentó la muerte de plántulas ante las concentraciones de 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup>. La menor emergencia de plántulas se presentó a los 10 días en las concentraciones 500, 1500, 3000 y 5000 mg kg<sup>-1</sup> con respecto al testigo (Figura 4.2).



**Figura 4.1.** Número de semillas de *Casuarina equisetifolia* germinadas en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel (mg kg<sup>-1</sup>), durante 25 días. n=10. Medias ± error estándar.



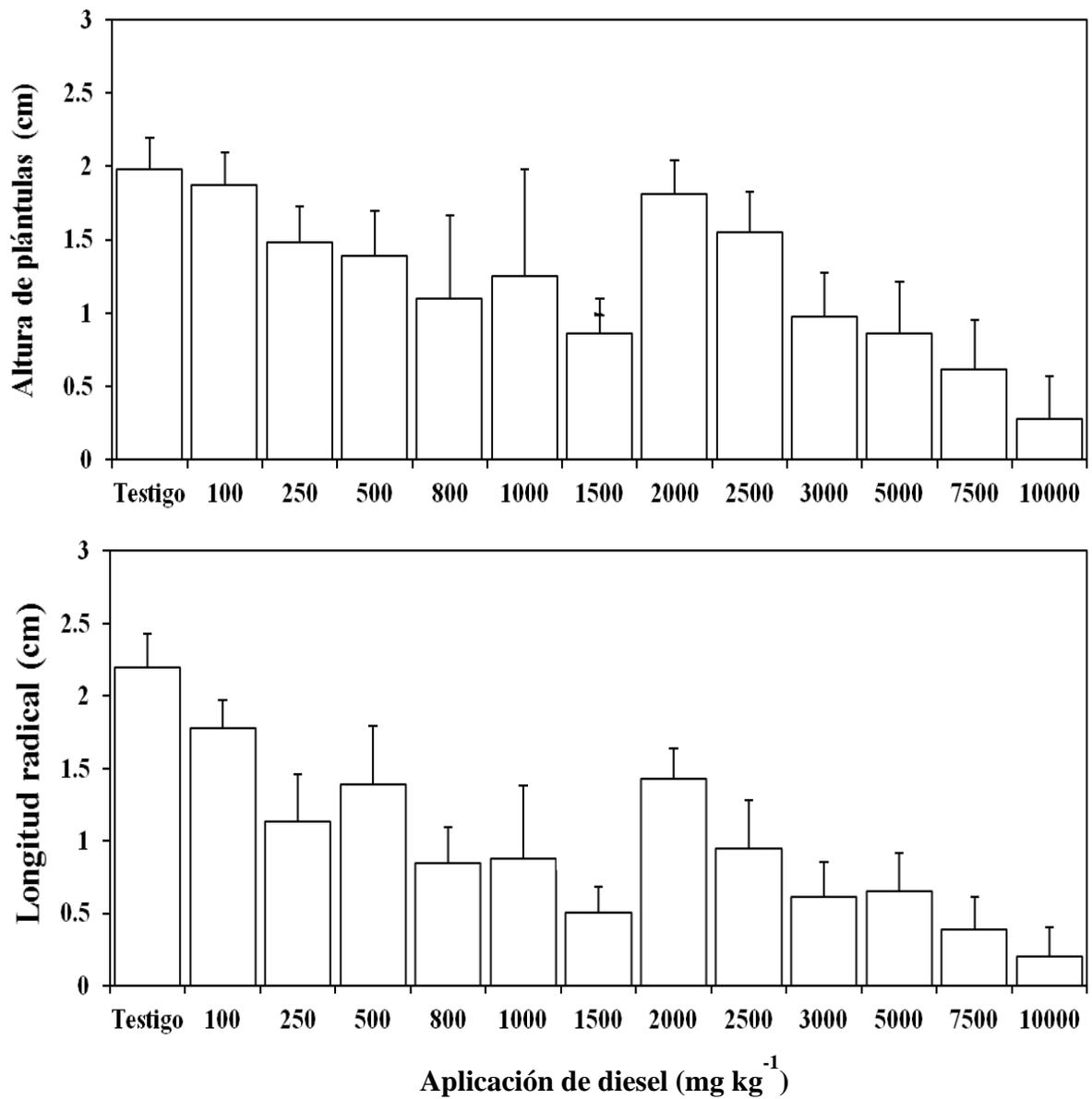
**Figura 4.2.** Emergencia de plántulas de *Casuarina equisetifolia* en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel (mg kg<sup>-1</sup>) durante 25 días. n = 10. Medias ± error estándar.

### **Altura de plántula, longitud radical y biomasa seca**

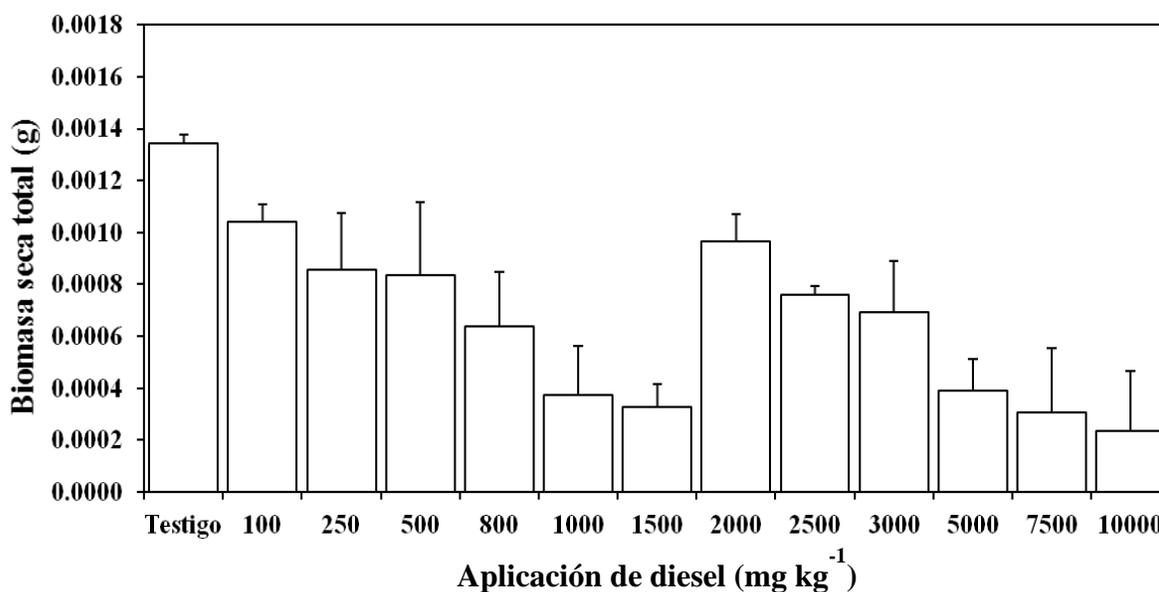
El análisis estadístico para las variables altura de plántula, longitud radical, biomasa aérea, biomasa radical y biomasa total de plántulas de *C. equisetifolia* presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) entre tratamientos. A los 25 días de exposición al diesel, los tratamientos de 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup> no presentaron plantas, indicando la sensibilidad de esta especie arbórea a estas concentraciones.

Tanto la altura de plántula como la longitud radical disminuyeron conforme la concentración del diesel (a excepción de las concentraciones de 2000 y 2500 mg kg<sup>-1</sup>) se incrementó en el suelo. Las concentraciones de 7500 y 10000 mg kg<sup>-1</sup> redujeron la altura en 69% y 86%, respectivamente, con relación al testigo. En el caso de la longitud radical, esta reducción se presentó en las concentraciones de 3000, 5000, 7500 y 10000 mg kg<sup>-1</sup>, siendo 65%, 63%, 78% y 89% menor, respectivamente, en comparación con el testigo (Figura 4.3).

De acuerdo con el análisis de varianza la biomasa seca de tallo y de raíz, (Ver gráfica del comportamiento de la biomasa seca de la parte aérea y de raíz, en el Apéndice 1) y la biomasa seca total en plántulas de *C. equisetifolia* presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). La biomasa seca total disminuyó significativamente con respecto al testigo. La menor acumulación de biomasa seca total por efecto del diesel se presentó en las concentraciones de 1000, 1500, 5000, 7500 y 10000 mg kg<sup>-1</sup>, mostrando una reducción del 72%, 76%, 71%, 77% y 83% con respecto al testigo (Figura 4.4).



**Figura 4.3.** Altura de planta y longitud radical de *Casuarina equisetifolia* establecida en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel (mg kg<sup>-1</sup>), después de 25 días. n = 10. Medias ± error estándar.



**Figura 4.4.** Biomasa seca total de plantas de *Casuarina equisetifolia* establecidas en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel (mg kg<sup>-1</sup>) después de 25 días. n = 10. Medias ± error estándar.

## DISCUSIÓN

Las concentraciones de diesel de 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup> causaron clorosis y finalmente la muerte de las plantas de *Casuarina equisetifolia* a los 25 días, lo que sugiere que estas dosis son muy tóxicas. Los hidrocarburos del petróleo forman una capa delgada en el suelo, lo que limita la absorción de agua y nutrientes por la raíz, afectando el desarrollo posterior de las plantas (Quiñones *et al.*, 2003). De igual forma, en las semillas se pueden formar películas delgadas que dificultan o impiden la entrada de agua y la difusión del oxígeno, conduciendo en muchos casos, a la muerte del embrión (Cunningham *et al.*, 1996; Serrano *et al.*, 2009; Kusic *et al.*, 2009). A su vez, la capa de hidrocarburos en el suelo disminuye la retención de agua con respecto a suelos no contaminados y afecta la hidratación de proteínas, la elongación de las células de la radícula y la emergencia de la plántula (Quiñones *et al.*, 2003). El impacto negativo que provocan los hidrocarburos del

petróleo en el suelo es muy severo ya que éstos reducen e inhiben la cobertura vegetal, la germinación de semillas, la emergencia, el número de brotes, la longitud de raíz, el número de hojas, la biomasa seca, además de inducir clorosis y necrosis en hojas y raíz (Adam y Duncan, 1999; Zhang *et al.*, 2004; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

Las especies de gramíneas y de leguminosas son capaces de tolerar concentraciones considerables de hidrocarburos. En el caso de gramíneas como *Bouteloua curtipendula*, *Cenchrus ciliaris*, *Echinochloa crusgalli*, *Rhynchelytrum repens* y *Festuca arundinacea*, la longitud de su raíz disminuye significativamente ante concentraciones de hidrocarburos policíclicos aromáticos de 5000 mg kg<sup>-1</sup> (Reynoso-Cuevas *et al.*, 2008). Mientras que *Brachiaria riziensis*, *Brachiaria brizantha* y *Panicum maximum* presentaron 100% de germinación de sus semillas, aunque su altura y su biomasa seca total se reducen en presencia de combustóleo (Sangabriel *et al.*, 2006). Plantas de *Spartina alterniflora* presentaron menor altura, longitud de raíz, y biomasa de raíz y tallo, cuando fueron expuestas a diesel (Lin *et al.*, 2002; Larenas y De Viana, 2005; Lin y Mendelsohn, 2009). En el caso de leguminosas, las semillas de *Melilotus albus* germinaron en suelo contaminado con diesel (7500 mg kg<sup>-1</sup>); sin embargo, este contaminante inhibió el número de nódulos y de brotes, así como el volumen radical (Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Además, las semillas de *Clitoria ternatea* y *Clitoria arietinum* pueden germinar en presencia de combustóleo (50000 mg kg<sup>-1</sup>); aunque a los 42 y 56 días, las plantas murieron. Las semillas de *Crotalaria incana* tienen la capacidad de germinar, así como también sus plántulas pueden emerger en concentraciones de hidrocarburos del petróleo de 25000 mg kg<sup>-1</sup>; pero cuando las concentraciones aumentan hasta 32000 mg kg<sup>-1</sup> la emergencia de las plántulas disminuyó hasta 30% (Vazquez-Luna *et al.*, 2010). Otras especies vegetales como

*Lepidium sativum* (Brassicaceae) presenta inhibición de la germinación (50%) de sus semillas ante concentraciones de diesel de hasta 3000 mg kg<sup>-1</sup> (Serrano *et al.*, 2009).

En el presente trabajo, *C. equisetifolia* germinó y emergió favorablemente ante algunas concentraciones elevadas de diesel, por ejemplo durante los primeros 10 días, la germinación fue estimulada ante concentraciones de diesel 20000 mg kg<sup>-1</sup> principalmente. Ciertas fracciones del petróleo tienen efectos positivos sobre las plantas ya que estimulan la germinación de sus semillas (Rivera-Cruz *et al.*, 2005); esto se debe a que los hidrocarburos provocan estrés, el cual causa una estimulación y síntesis de sustancias reguladoras del crecimiento para las plantas (Merkl *et al.*, 2005).

Los reportes sobre los efectos de los hidrocarburos del diesel en especies arbóreas son muy escasos, y solo se tienen reportes en *Pinus sylvestris* y en *Populus deltoides* cuya germinación de semillas fue del 92% cuando el petróleo se encontraba en 50000 mg kg<sup>-1</sup> (Palmroth *et al.*, 2002). Por otra parte, la germinación de semillas de *Erythrina crista-galli* L. y sus plántulas tienen la capacidad de tolerar 50 y 75 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburos de petróleo (Farías *et al.*, 2009). En contraste, *Leucaena leucocephala* presenta mayor emergencia de plántulas ante una concentración de hidrocarburos del petróleo de 40000 mg kg<sup>-1</sup> (Vázquez-Luna *et al.*, 2010). En el caso de las semillas de *Mimosa pilulifera*, su germinación y desarrollo de plántulas no fue afectado ante concentraciones de hidrocarburos de hasta 2000 mg kg<sup>-1</sup>; sin embargo, la germinación se lleva a cabo en mayor tiempo en comparación con las semillas sembradas en el suelo sin contaminación (Inckot *et al.*, 2011).

La fitotoxicidad del diesel observada en las plántulas de *Casuarina equisetifolia* fue más notable conforme aumentaban las concentraciones de hidrocarburos, y se reflejó en la disminución de la altura de la plántula y la longitud radical. Además, la biomasa seca total

de las plántulas disminuyó significativamente al aumentar la concentración de diesel hasta 7500 mg kg<sup>-1</sup>. De igual manera ocurre con *Leucaena leucocephala* en suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo (80000 mg kg<sup>-1</sup>), ya que al aumentar la concentración, la emergencia de las plántulas, la altura de tallo, la longitud radical y la biomasa seca total se redujo significativamente (Vázquez-Luna *et al.*, 2010).

Las especies arbóreas pueden germinar y emerger ante concentraciones más altas de hidrocarburos del petróleo en comparación con algunas especies herbáceas (Serrano *et al.*, 2009). Los reportes sobre *Casuarina equisetifolia* son muy pocos, hasta ahora sólo se sabe que tolera concentraciones de diesel de hasta 10 g kg y un porcentaje de salinidad de 2% en suelo franco arenoso (Sun *et al.*, 2004). En el presente trabajo, las semillas de *C. equisetifolia* germinaron en concentraciones de hasta 20000 mg kg<sup>-1</sup> (20 g kg<sup>-1</sup>); sin embargo, la emergencia y el crecimiento de las plántulas fueron inhibidas en presencia de dosis de diesel mayores a 10000 mg kg<sup>-1</sup> después de 15 días, pero ante concentraciones de 20000 mg kg<sup>-1</sup> las plántulas murieron.

En general, la emergencia de las plántulas de *Casuarina equisetifolia* disminuyó ante concentraciones mayores a 10000 mg kg<sup>-1</sup>; sin embargo, sus semillas pueden germinar hasta concentraciones de 20000 mg kg<sup>-1</sup> en un suelo franco arenoso contaminado con diesel.

## CONCLUSIONES

Las semillas de *Casuarina equisetifolia* germinan a concentraciones de diesel de hasta 20000 mg kg<sup>-1</sup>; sin embargo, la emergencia de las plántulas es drásticamente afectada. La emergencia de las plántulas se presentó satisfactoriamente hasta concentraciones de diesel de hasta 7500 mg kg<sup>-1</sup>, mientras que ante concentraciones de 10000, 15000 y 20000 mg kg<sup>-1</sup> las plántulas presentaron síntomas de clorosis y finalmente, murieron. La hipótesis planteada para esta fase experimental se aceptó, ya que a medida que aumenta la concentración de diesel en el suelo se inhibe la germinación de semillas y la emergencia de plántulas de esta especie forestal.

## CAPÍTULO V

### FITORREMEDIACIÓN DE SUELO CONTAMINADO CON DIESEL UTILIZANDO *Casuarina equisetifolia* Y APLICACIÓN DE BIOESTIMULACIÓN Y BIOAUMENTACIÓN

#### RESUMEN

En este estudio se evaluó el efecto de la inoculación de *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium* sp. y *Trichoderma viride* en plantas de *Casuarina equisetifolia*, en combinación de los fertilizantes Floranid® y Triple 17 durante la fitorremediación de suelo contaminado con diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>). El experimento estableció en un arreglo factorial 2x5x3, con 30 tratamientos distribuidos en un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de invernadero. El factor diesel disminuyó significativamente ( $P \leq 0.001$ ) la altura de la planta en 10%, el número de acículas en 15%, la biomasa seca en 15%, y la colonización micorrízica hasta en 98%. El factor fertilización mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) al aplicar Floranid, ya que aumentó el número de acículas (42%), la biomasa seca total (36%), el índice de calidad de planta (ICP) (28%), y la degradación de hidrocarburos en 38.16%. En cuanto al factor inoculación, *Sphingobacterium* aumentó la altura, el número de acículas, y el contenido de nitrógeno foliar. El efecto por tratamiento mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). En ausencia de diesel, *Trichoderma* sin fertilizar aumentó la altura, la biomasa y el ICP; mientras que en presencia de diesel *Sphingobacterium* con Floranid mostró mejores resultados. *Trichoderma* favoreció la degradación de diesel ya sea sin fertilizar (32%) o con Floranid (38%). La bioaumentación y la bioestimulación son alternativas útiles para mejorar la fitorremediación de suelo contaminado con diesel.

**Palabras clave:** Triple 17, Floranid, *Rhizophagus*, *Trichoderma*, *Sphingobacterium*.

## CHAPTER V

### PHYTOREMEDIATION OF DIESEL CONTAMINATED SOIL USING *Casuarina equisetifolia* AND APPLICATION OF BIOSTIMULATION AND BIOAUGMENTATION

#### ABSTRACT

This study evaluated the effects of the inoculation of *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium* sp. and *Trichoderma viride* on *Casuarina equisetifolia* plants in combination with Floranid<sup>®</sup> and Triple 17 fertilizers during the phytoremediation of soil contaminated with diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>). A 2x5x3 factorial experiment with 30 treatments was set in a completely randomized design under greenhouse conditions. Diesel significantly diminished ( $P \leq 0.001$ ) plant height in 10%, number of needles in 15%, dry mass in 15%, and mycorrhizal colonization in 98%. Fertilization factor showed significant differences ( $P \leq 0.001$ ) in which Floranid increased the number of needles (42%), total dry mass (36%), plant index quality (PIQ) (28%), and hydrocarbons degradation in 38.16%. For inoculation factor, *Sphingobacterium* increased plant height, number of needles, and the content of leaf nitrogen. There were significant treatment effects ( $P \leq 0.001$ ). In absence of diesel, plants inoculated with *Trichoderma* without fertilization had greater height, dry mass, and PIQ; whereas in presence of diesel *Sphingobacterium* fertilized with Floranid caused better plant growth responses. *Trichoderma* favored diesel degradation either without fertilization (32%) or fertilized with Floranid (38%). Bioaugmentation and biostimulation are very useful alternatives to improving phytoremediation of diesel contaminated soils.

**Key words:** Triple 17, Floranid, *Rhizophagus*, *Trichoderma*, *Sphingobacterium*.

## INTRODUCCIÓN

El petróleo es un producto estratégico para México, al ser base fundamental de su economía, ya que el 90% de la energía primaria que se consume proviene de los hidrocarburos del petróleo crudo (PEMEX, 2010). En el 2010 la producción de petróleo fue de 1,524 millones de barriles diarios (Mbd), mientras que la producción de diesel fue de 337 Mbd (PEMEX, 2010). Paralelamente, el crecimiento constante de la industria petrolera también ha generado daños al ambiente, ya que los constantes derrames en el suelo forman capas que disminuyen su capacidad para retener agua disponible para las plantas (Gutiérrez y Zavala, 2002). Además, producen efectos negativos sobre la textura, la materia orgánica, la densidad real y la porosidad del suelo (Martínez y López, 2001). Los problemas de contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo se deben principalmente a la falta de mantenimiento de instalaciones petroleras, explosiones en instalaciones de alto riesgo, y fugas y robos de combustible en las líneas de conducción (Jiménez, 2002). Así, la contaminación en el suelo es una problemática que no sólo afecta su uso sustentable y el desarrollo urbano, sino que también afecta la salud de la población, y en muchos casos, impacta negativamente los recursos naturales estratégicos y fundamentales para el desarrollo humano (SEMARNAT, 2010).

En los últimos años se han derivado técnicas de remediación de suelos contaminados que representan un conjunto de operaciones que alteran la composición del contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas (Harrison, 1999). Un método que muestra ventajas con respecto a los métodos físicos o químicos debido a su bajo costo y beneficio en el ambiente es la biorremediación (Volke y Velasco, 2002). La biorremediación se centra en la explotación de la diversidad genética y versatilidad

metabólica que caracteriza a los microorganismos para transformar los contaminantes e integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales (Garbisu *et al.*, 2002). La biorremediación puede ser llevada a cabo *in situ* por medio de la aplicación de procesos de bioestimulación y de bioaumentación (Castillo *et al.*, 2005).

La bioestimulación es una técnica que suministra factores limitantes como nutrientes, aceptores de electrones, surfactantes, o bien oxígeno, los cuales modifica las condiciones del suelo para estimular el metabolismo y la velocidad de crecimiento de los microorganismos nativos (Marguesin *et al.*, 2000; Castillo *et al.*, 2005; Singh *et al.*, 2011). La adición de nutrientes en ambientes contaminados permite una degradación más rápida y eficaz de hidrocarburos por parte de los microorganismos nativos (Hamme *et al.*, 2003; Vallejo *et al.*, 2005) Algunos estudios han demostrado que la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos contribuyen en la degradación de los hidrocarburos totales de petróleo en el suelo hasta en 90% (Pardo *et al.*, 2004). El uso de diferentes dosis de fertilización con N-P-K en suelo contaminado con petróleo es un factor importante en la bioestimulación de la actividad microbiana y en el crecimiento de las plantas, así la aplicación de 60 g kg<sup>-1</sup> de fertilizante N-P-K (15-15-15) contribuyó en la degradación de 55% de petróleo crudo, mientras que el suelo que no contenía fertilización degradó sólo 29% (Ubochi *et al.*, 2006).

Por otro lado, la bioaumentación consiste en la adición de microorganismos vivos alóctonos o modificados genéticamente, que tienen la capacidad de degradar contaminantes orgánicos (Volke y Velasco, 2002; Castillo *et al.*, 2005). Este método se utiliza en suelos contaminados que requieren tratamiento urgente, o cuando los microorganismos autóctonos son insuficientes en número o en su capacidad degradadora de compuestos orgánicos tóxicos (Gentry *et al.*, 2004; Mancera *et al.*, 2008).

Los hongos micorrízicos arbúsculares (HMA), las bacterias y los hongos filamentosos han sido reportados que presentan potencial en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Boonchan *et al.*, 2000; Leyval *et al.*, 2001; Kirk *et al.*, 2005; Hughes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009). Los HMA tiene potencial para estabilizar hidrocarburos del petróleo como los compuestos policíclicos aromáticos (Kirk *et al.*, 2005), y tienen la capacidad de aumentar actividades enzimáticas en las plantas (como peroxidasa, oxidasas, catecol-oxidasas), cuando se encuentran sometidas a altas concentraciones de petróleo (Liu *et al.*, 2004). En gramíneas, los HMA inducen la resistencia a estrés por diesel y antraceno (Debiane *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009), mientras que en leguminosas aumentan su crecimiento en 80% en presencia de diesel (Liu *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2008; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

Existen bacterias que utilizan el petróleo crudo y sus derivados como fuente de alimento y de energía, oxidándolo hasta dióxido de carbono y agua, y liberando energía (Gómez, 2004). Las bacterias de vida libre como *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pumilus*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas* sp., y *Pseudomonas putida*, tienen la capacidad de tolerar y degradar tolueno y xileno (Bento *et al.*, 2005; Purushothaman *et al.*, 2010). Algunos géneros bacterianos utilizados con éxito en procesos de la bioaumentación son *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sinorhizobium* (bacteria simbiótica en leguminosas), *Paracoccus* y *Achromobacter* (Singh *et al.*, 2004; El Fantroussi y Agathos, 2005; Keum *et al.*, 2006, Teng *et al.*, 2010).

Los hongos filamentosos son organismos importantes en la descomposición de la materia orgánica y se encuentran involucrados en la biodegradación de compuestos orgánicos (Stanley, 2007). Tal es caso de *Rhizopus* sp., *Penicillium funiculosum* y

*Aspergillus sydowii*, los cuales tienen la capacidad de remover hidrocarburos totales del petróleo, hidrocarburos policíclicos aromáticos e hidrocarburos alifáticos (Mancera *et al.*, 2008). Otros géneros de hongos usados en la bioaumentación son *Absidia*, *Achremonium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Mortierella*, *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma* (Hughes *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2009; Mrozik y Piotrowska-Seget, 2010). De manera particular, *Trichoderma* tiene la capacidad de recuperar suelos contaminados con compuestos orgánicos debido a su alta tasa de reproducción, predominancia en diversos ecosistemas terrestres, sus bajos requerimientos nutrimentales y por su supervivencia a condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad (Jackson *et al.*, 1991).

Existen diversas especies de plantas herbáceas que estimulan la proliferación de microorganismos en su rizósfera en presencia de contaminantes orgánicos (Singh *et al.*, 2003). En los últimos años, algunas especies arbóreas se han utilizado en la fitoremediación de suelo contaminado, por su capacidad de extraer, secuestrar, degradar y transformar contaminantes (Schoenmuth y Pestemer, 2004a; Tamas y Gullner, 2006). Las especies arbóreas como *Cupressus arizonica*, *Populus deltoides*, *Acacia nilotica*, *Eucalyptus camaldulensis*, *Angophora floribunda* y *Casuarina cunninghamiana* han contribuido en la remediación de suelos contaminados con metales pesados (Aitchison *et al.*, 2000; Shanker *et al.*, 2005; Alcalá *et al.*, 2008; Farias *et al.*, 2009; Singh *et al.*, 2010). En contraste, el número de especies arbóreas reportadas para remediar suelos contaminados con compuestos orgánicos es limitado. Tal es el caso de *Pinus sylvestris* y *Populus deltoides* los cuales favorecen la disipación de diesel (Palmroth *et al.*, 2002), mientras que *Salix* (Clon EW-20) y *Picea abies* acumulan 80% de trinitrotolueno (TNT) (Schoenmuth y Pestemer, 2004b).

*Casuarina equisetifolia* es una especie arbórea de origen Australiano que se ha utilizado con gran éxito en México para la reforestación rural y urbana (Valdés *et al.*, 2004). Además, también se utiliza ampliamente como barreras contra el viento, para el control de la erosión en costas arenosas y dunas, y se adapta a zonas con altos grados de salinidad (Moezel *et al.*, 1989; Ndiaye *et al.*, 1993; Zhong *et al.*, 2010). Esta especie arbórea, es valiosa por sus altas tasas de producción de hojarasca la cual protege al suelo y fauna, debido a su aporte de materia orgánica (Bruzón *et al.*, 2003). En sitios contaminados por la industria minera, la *Casuarina* ha demostrado 100% de supervivencia con respecto a otras especies forestales (Shanker *et al.*, 2005). Además, *Casuarina* presenta tolerancia a la presencia de Cromo (III) en suelo ( $464 \mu\text{g g}^{-1}$ ), acumulando este contaminante en sus raíces (Shanker *et al.*, 2005). Con lo que respecta a contaminantes orgánicos sólo se ha reportado un trabajo en suelo salino contaminado con diesel, en el cual *Casuarina equisetifolia* presentó tolerancia a 2% de NaCl y a  $10 \text{ g kg}^{-1}$  de diesel (Sun *et al.*, 2004).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la respuesta de *Casuarina equisetifolia* a la aplicación de dos fertilizantes (bioestimulación) y de la inoculación de microorganismos benéficos (bioaumentación) durante la fitorremediación de un suelo contaminado con diesel, bajo condiciones de invernadero.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

El suelo fue recolectado en San Diego municipio de Texcoco, Estado de México, al cual se determinaron sus características físicas y químicas con métodos estandarizados en el laboratorio de Fertilidad de Suelos (Colegio de Postgraduados) (Etchevers, 1988). El suelo presentó pH de 7.2, 0.14% de N,  $34 \text{ mg kg}^{-1}$  de P,  $1.5 \text{ meq } 100 \text{ g}^{-1}$  de K, 2.8% de materia orgánica y una textura franco arenosa. El suelo se tamizó (malla 0.5 mm) y esterilizó en

autoclave (121 °C durante 4 h), y posteriormente fue se secó a 100 °C por 48 h para después contaminarse con diesel.

### **Colecta de semilla**

La semilla de *Casuarina equisetifolia* se colectó en el Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, en el mes de mayo del 2011, y posteriormente, se colocó en bolsas de papel para su secado (18 °C). Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 10%, y después se lavaron con suficiente agua destilada para eliminar el exceso del desinfectante. Las semillas se pusieron a germinar en macetas de 250 g con arena esteril como sustrato, un mes antes de ser trasplantadas. Las plántulas seleccionadas para el trasplante estaban libres de enfermedades y con una altura promedio de 2.5 cm.

### **Contaminación del suelo**

Se pesaron dos kilogramos de suelo seco estéril, que se colocaron en un refractario de vidrio, y se preparó una suspensión de diesel con 150 mL de acetona (Fermont®) como disolvente, con la cual el contaminante se impregnó de forma homogénea en el suelo. El suelo una vez contaminado se dejó reposar en una campana de extracción durante cinco días para eliminar el disolvente (acetona). La dosis de contaminación del suelo con diesel fue de 5000 mg kg<sup>-1</sup>.

### **Preparación de los inoculos microbianos**

El inoculo de *Rhizophagus intraradices* se elaboró con fragmentos de raíces (1 cm) de una planta trampa *Plectranthus coleoides* Benth (Familia Lamiaceae) crecida en arena. Este hongo fue proporcionado por el Área de Microbiología del Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. A partir de las raíces, se evaluó la colonización micorrízica mediante la técnica de Phillips y Hayman (1970), y se cuantificó el número de esporas en la arena

con el método de Gerdemann y Nicolson (1963). El porcentaje de colonización en raíces fue de 68% y 625 esporas por gramo de suelo.

El inóculo de *Trichoderma viride* (cepa CP4) se propagó en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA Merck®) dos semanas antes del establecimiento del experimento. Las cajas de Petri se incubaron a 28 °C, y posteriormente, se colocaron a temperatura ambiente hasta obtener la esporulación del hongo. Las esporas se suspendieron en 350 mL de agua destilada estéril, y esta suspensión se lavó y se filtró con fibra de vidrio y colectando el filtrado en un matraz erlenmeyer previamente esterilizado, bajo condiciones de campana de flujo laminar. La estimación de la concentración de esporas se realizó por conteo directo en cámara de Neubauer. Finalmente, cada planta se inoculó con 3 mL de la suspensión de esporas cuya carga fue de  $6.3 \times 10^8$  esporas mL<sup>-1</sup>.

La bacteria utilizada fue la cepa M2BOS1-R2, clasificada taxonómicamente como *Sphingobacterium* sp. con una morfología de cocobacilos Gram negativos, y presenta actividad hidrocarbonoclasta en diesel. La bacteria se propagó en cinco frascos de vidrio con 35 mL de caldo nutritivo, se incluyó un frasco sin inocular con la bacteria como un control. Los frascos se incubaron en agitación a 180 rpm durante 10 min a 28 °C durante 72 h. Posteriormente, se colocó la suspensión bacteriana en tubos estériles de 50 mL y se centrifugaron a 7500 rpm durante 10 min. El sobrenadante fue decantado, y la pastilla bacteriana (pellet) del fondo del tubo se recuperó al agregar 35 mL de agua destilada estéril, y finalmente, las células bacterianas se suspendieron en un matraz erlenmeyer de 500 mL con agua esteril. Para el conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana y se realizaron diluciones de  $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ . Posteriormente, se tomó una alícuota de 0.1 mL de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , y se distribuyó en cajas de Petri con agar nutritivo (Merck®) con tres repeticiones por dilución. Inmediatamente las

cajas se incubaron a 28 °C por 48 h, y después de este tiempo se cuantificaron las UFC. La carga bacteriana obtenida fue de  $5.8 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Finalmente se inocularon 3 mL de la suspensión bacteriana a cada unidad experimental, aplicándolos en la base del tallo de las plantas.

### **Fertilizantes inorgánicos utilizados**

Los fertilizantes utilizados en el experimento fueron Triple 17 y Floranid<sup>®</sup>. El fertilizante Triple 17 es un fertilizante granulado con un contenido de N-P-K de 17-17-17. Se pesaron 0.035 g del fertilizante de acuerdo con las dosis de fertilización para especies arbóreas (Finck, 1988) (Ver apéndice 2). El fertilizante Floranid<sup>®</sup> es un fertilizante inorgánico microgranulado, de lenta liberación y con un contenido de N-P-K de 16-7-15. Se pesaron 0.62 g de acuerdo con la dosis especificada por Floranid<sup>®</sup> para especies arbóreas (Ver apéndice 3).

### **Establecimiento del experimento**

El experimento se estableció bajo condiciones de invernadero en el Área de Horticultura de la Universidad Autónoma Chapingo. Las temperaturas máximas y mínimas promedio fueron de 28 °C a 15 °C, así como una humedad relativa máxima y mínima promedio de 42% a 33% (Data logger Hobo serie H8).

El suelo con diesel y sin diesel se colocó en tubetes con 126 g de capacidad, a los cuales se adicionó el fertilizante correspondiente en las dosis mencionadas, homogenizándolo con el suelo. En cada uno de los tubetes se trasplantó una plántula de *Casuarina equisetifolia* de un mes de edad, momento al que se inocularon con *Rhizophagus intraradices*, con la bacteria *Sphingobacterium* sp o con el hongo filamentoso *Trichoderma viride* según el tratamiento correspondiente. El riego de todas las plantas se mantuvo con agua destilada estéril aplicada diariamente.

## Variables de crecimiento

Se midió la altura de la planta a los 15 días después del trasplante y hasta los 120 días que duró el experimento. Al día 120, se cosecharon las plantas de los tubetes, para determinar la altura final y el número de acículas, y después se secaron a 70 °C durante 48 h, para determinar la biomasa seca (parte aérea, raíz y total). Con base en el peso seco total de la planta (g), la altura (cm), diámetro de tallo (cm), y biomasa seca de parte aérea y de raíz se calculó índice de calidad de planta producida en vivero (Dickson *et al.*, 1960) mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Índice de calidad} = \frac{\text{Peso seco total de la planta (g)}}{\left( \frac{\text{Altura (cm)}}{\text{Diámetro de tallo (cm)}} \right) + \left( \frac{\text{Peso seco de parte aérea (g)}}{\text{Peso seco de raíz (g)}} \right)}$$

## Colonización micorrízica

A los 120 días se cuantificó la colonización micorrízica de las plantas inoculadas con *R. intraradices*, mediante la técnica de clareo y tinción con azul de tripano (Phillips y Hayman, 1970), tomando sólo cuatro repeticiones por tratamiento. Las raíces se colocaron en tubos falcon de 15 mL con una solución de hidróxido de potasio (KOH 10%) durante una semana, después las raíces se enjuagaron con abundante agua y se colocaron durante 15 min en peróxido de hidrógeno grado farmacéutico. Posteriormente, las raíces se lavaron con abundante agua y se colocaron en una solución de ácido clorhídrico (HCl, 10%) durante 10 min; esta solución se eliminó sin enjuagar y se agregó inmediatamente azul de tripano (0.05%) en lactoglicerol. Al tercer día, se decantó el azul de tripano y se tomaron fragmentos de raíces de 1 cm de largo para colocarlas en portaobjetos con lactoglicerol como líquido de montaje. Las preparaciones obtenidas fueron observadas a 40X en

microscopio óptico (Reichert Microstar IV, modelo 410), cuantificando a presencia de hifas, vesículas y arbusculos, y estimándolas como porcentaje.

#### **Determinación UFC de *Trichoderma viride* (CP4) y *Sphingobacterium* sp.**

Para el conteo de UFC se colocó 1 g de suelo de cada uno de los tratamientos, en tubos falcon de 50 mL con 9 mL de agua destilada esteril, agitándolos vigorosamente en un vortex (Ika ®). Posteriormente, se tomó 1 mL de la solución y se realizaron diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). En seguida, se tomó 0.1 mL de las diluciones  $10^{-2}$  a la  $10^{-4}$  y se colocó en cajas Petri con PDA para cuantificar *Trichoderma viride*. Mientras que para cuantificar las UFC de *Sphingobacterium* sp. se tomaron las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  y se colocaron en cajas de Petri con agar nutritivo. Todas las diluciones se realizaron con tres repeticiones por tratamiento. Finalmente, las cajas se incubaron a 28 °C y después de 48 h se cuantificó el número de colonias para cada microorganismo.

#### **Contenido de nitrógeno foliar**

El nitrógeno foliar se cuantificó de acuerdo al método estandarizado (Etchevers, 1988), para lo cual se tomó 0.1 g de material vegetal de la parte aérea de cuatro plantas por tratamiento, a los que se agregaron 4 mL de una mezcla de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) con ácido salicílico ( $C_7H_6O_3$ ), y se dejó reposar por una noche. Luego se adicionaran 5 mg de tiosulfato de sodio ( $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ ), se calentó la reacción por 15 min, se dejó enfriar y se agregó 1.1 g de una mezcla de 1 g de sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ), 0.1 g de sulfato cúprico ( $Cu SO_4 \cdot 5H_2O$ ), 0.01 g de selenio metálico. Esta mezcla se sometió a una digestión húmeda colocándola a 360 °C durante 5 h y posteriormente, se dejó enfriar y se colocaron 7 mL de agua destilada por muestra. Para estimar el porcentaje de nitrógeno se realizó la destilación de las muestras digestadas con 10 mL de NaOH (10 N); cada muestra se recolectó en un frasco con 10 mL de una solución de ácido bórico con indicadores a pH 5 ( $H_3BO_3$ , más

verde de bromocresol y rojo de metilo), hasta obtener un volumen final de 50 mL. El producto de la destilación se tituló con una solución de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0.01 N) observando el cambio de coloración de verde a rosa. Los resultados se expresaron en porcentaje total de nitrógeno en planta.

### **Biodegradación de diesel**

Las muestras de suelo recién contaminadas se mantuvieron a -20 °C durante 200 días para determinar la concentración inicial de diesel (tiempo cero). Las muestras de suelo obtenidas a los 120 días que duró el experimento se almacenaron a -20 °C durante 20 días, para posteriormente ser analizadas en el laboratorio de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Universidad Veracruzana en Xalapa, Veracruz.

La preparación de las muestras de suelo para la extracción de los hidrocarburos del diesel se realizó mediante el método de extracción, agitación y centrifugación basado en los métodos 3500B y 3540C de la USEPA (1996) y Schwab *et al.* (1999). Se utilizaron 10 g de suelo con cuatro repeticiones por tratamiento. El suelo se colocó en un matraz de 50 mL, adicionándole 2 g de sulfato de sodio anhidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) (Baker ®) y 10 mL de hexano HPLC (High Purity) en agitación por una hora. Este proceso se realizó dos veces para cada muestra de suelo. El sobrenadante obtenido se evaporó con ayuda de un rotavapor (Büchi B-480) a una temperatura de 58 °C en un matraz de destilación. Finalmente, al matraz de destilación se agregaron 0.7 mL de hexano, y se agitó para recuperar toda la muestra contenida en el matraz y posteriormente, se extrajo el hexano y se colocó en un vial aforándose a 0.5 mL.

Las muestras se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS), utilizando un cromatógrafo de gases modelo 6890 N Agilent Technologies y un espectrómetro de masas modelo 5975 Agilent Technologies, con

una columna capilar DB-5 (5% fenil-metilpolisiloxano), 60 m, 250  $\mu\text{m}$  i.d., 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor. La temperatura del inyector fue de 250  $^{\circ}\text{C}$  y la del detector de 280  $^{\circ}\text{C}$ , y se utilizó Helio como gas acarreador (1  $\text{mL}^{-1}$ ). La temperatura de inicio fue de 50  $^{\circ}\text{C}$  (5 min) e incrementó hasta alcanzar 280  $^{\circ}\text{C}$ , manteniéndose constante hasta los 36 min. Para estimar el porcentaje de degradación de los hidrocarburos, se cuantificó el área total de la muestra.

### **Diseño experimental**

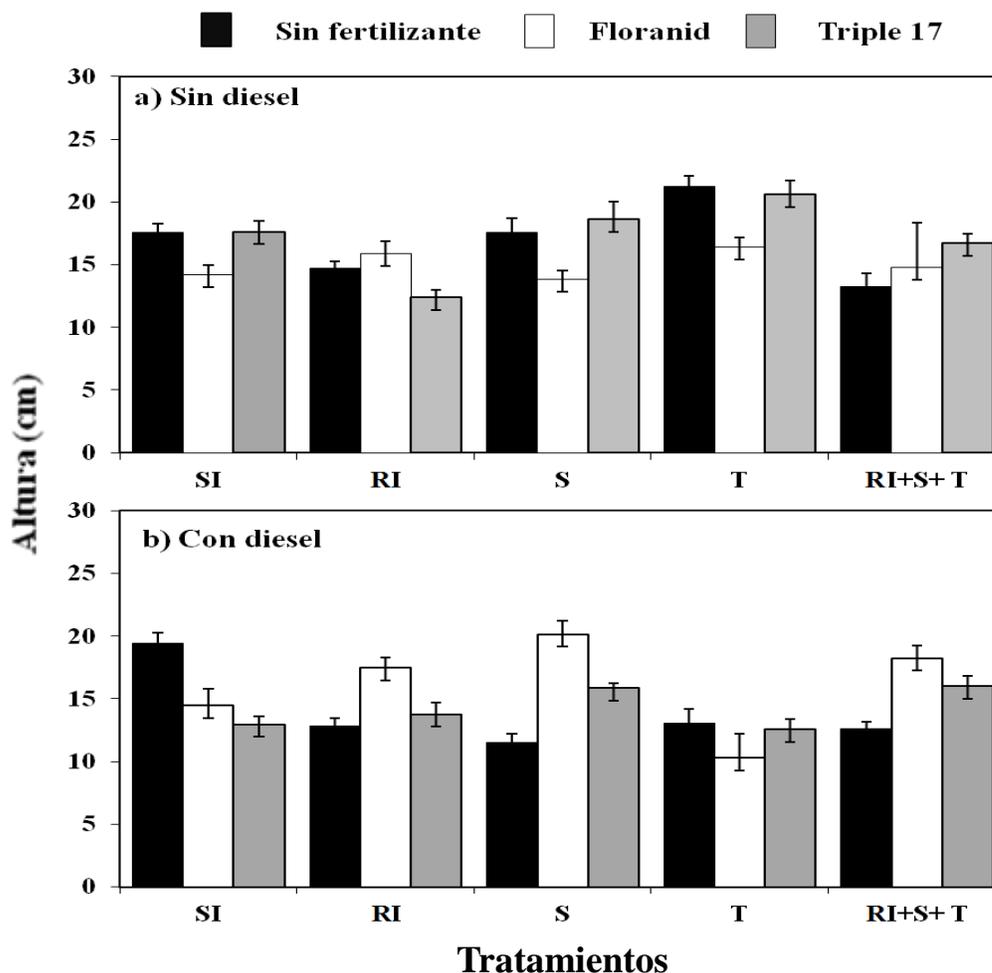
El experimento se estableció usando un arreglo factorial 2 x 5 x 3, donde los datos fueron: fertilizante (dos tipos de fertilizante y un testigo sin fertilizar), inoculación (una cepa de HMA, una de *Trichoderma viride*, una de *Sphingobacterium* sp., y la combinación de las tres) y dosis de contaminante (5000  $\text{mg kg}^{-1}$  y un testigo sin contaminar), la combinación de estos factores da un total de 30 tratamientos, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar bajo condiciones de invernadero. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $\alpha = 0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute, 2002).

## **RESULTADOS**

### **Efecto sobre variables del crecimiento**

La altura de las plantas presentó diferencias significativas por los factores contaminación e inoculación ( $P \leq 0.001$ ). El diesel redujo en 10% la altura con respecto a las plantas que crecieron en suelo no contaminado. Para el factor inoculación, las plantas con *Sphingobacterium* presentaron mayor altura (10% más), con respecto a la inoculación de *R. intraradices* y *Trichoderma*. El factor fertilización no mostró diferencias significativas para esta variable. El efecto de los tratamientos en la altura mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ); en ausencia de diesel, la inoculación de *Trichoderma* sin fertilizar presentó la

mayor altura (21.22 cm), mientras que la menor altura se observó en el tratamiento con la triple inoculación y sin fertilizar (13.22 cm). En contraste, en el suelo contaminado la mayor altura se observó en el tratamiento con *Sphingobacterium* y la aplicación de Floranid (20.14 cm), mientras que la menor altura se obtuvo en el tratamiento inoculado con *Trichoderma* con aplicación de Floranid (10.27 cm) (Figura 5.1; Apéndice 5).

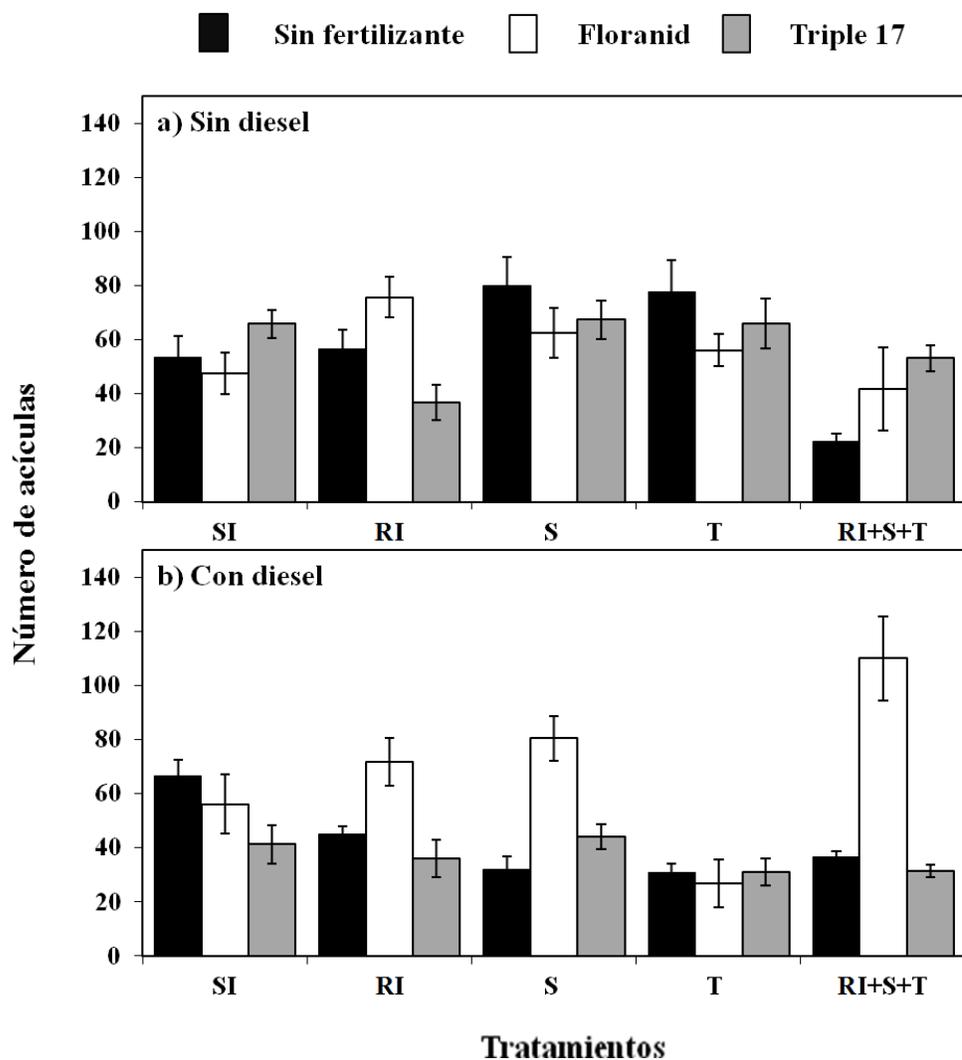


**Figura 5.1.** Altura de plantas de *Casuarina equisetifolia* creciendo en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos; RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp. (M2BOS1-R2); T = *Trichoderma viride* CP4.

El número de acículas presentó diferencias significativas por los factores contaminación, fertilización e inoculación ( $P \leq 0.001$ ). La presencia de diesel redujo 15% el número de acículas con respecto a las plantas que crecieron en suelo no contaminado. Para el factor inoculación, *Sphingobacterium* aumentó 23% el número de acículas con respecto a la inoculación de los demás microorganismos y del testigo. El factor fertilización presentó diferencias significativas entre tipo de fertilizantes, ya que al aplicar Floranid aumentó 42% el número de acículas con respecto a los tratamientos sin fertilizar o con la aplicación de Triple 17. El efecto de los tratamientos mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en el número de acículas. En ausencia de diesel, el mayor número de acículas se presentó en los tratamientos inoculados con *Sphingobacterium* o con *Trichoderma* sin la aplicación de fertilizante (79 y 77 acículas, respectivamente), mientras que el menor número se presentó en el tratamiento con la triple inoculación sin fertilizante (22.13 acículas). En presencia de diesel, el mayor número de acículas se observó en el tratamiento con la triple inoculación y fertilización con Floranid (109.90 acículas), y el menor número se presentó con *Trichoderma* fertilizado con Floranid (26.71 acículas) (Figura 5.2 y Apéndice 6).

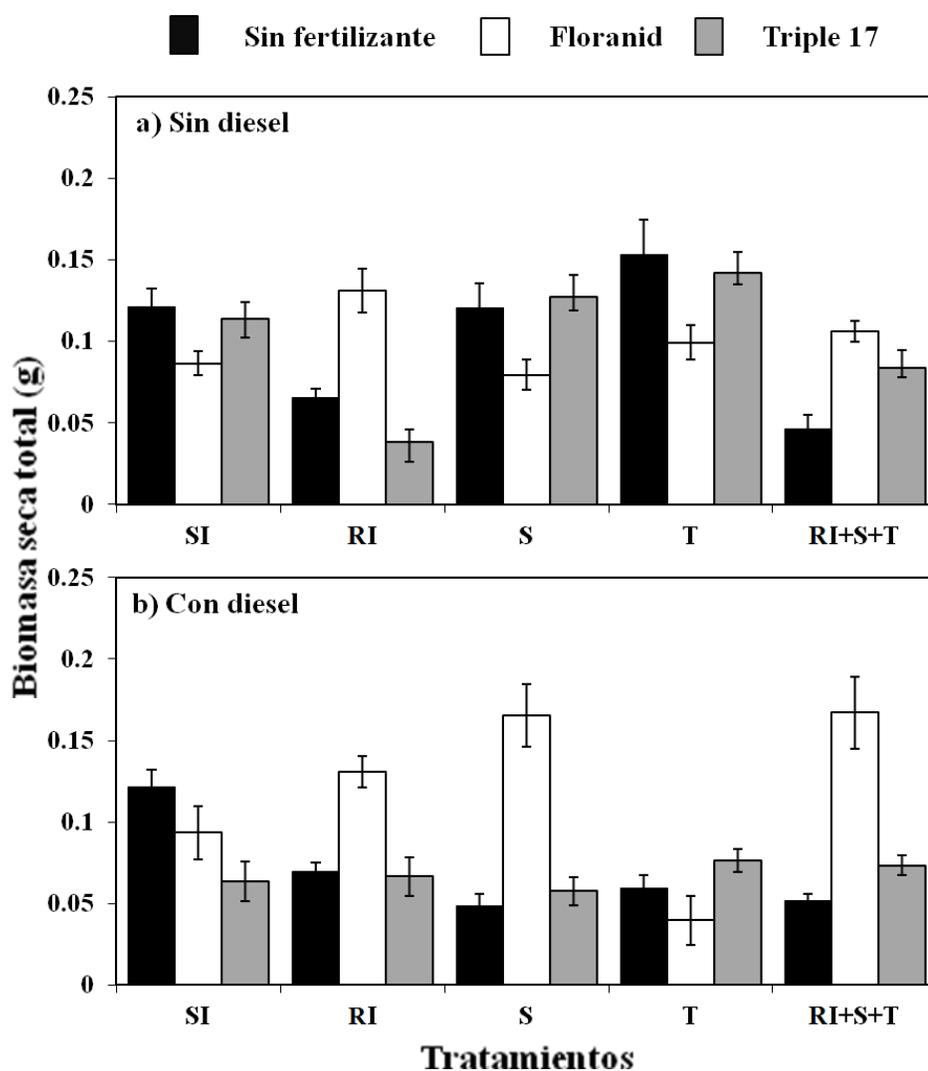
La biomasa seca total presentó diferencias significativas por los factores contaminación y fertilización ( $P \leq 0.001$ ). El diesel disminuyó 15% la biomasa seca total de las plántulas que crecieron en suelo contaminado. En el caso del factor fertilización la aplicación de Floranid aumentó 36% la biomasa seca total con respecto a las plantas sin fertilizar y/o con aplicación de Triple 17. El factor inoculación no produjo efectos significativos en esta variable (Apéndice 5). La biomasa seca total, presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) por efecto de los tratamientos. En ausencia de diesel, la inoculación de *Trichoderma* sin fertilizar presentó la mayor biomasa (0.15 g). Mientras que

el menor valor se obtuvo en el tratamiento con la inoculación de *G. intraradices* con aplicación de Triple 17 o con los tres microorganismos sin fertilizar (<0.05) g).



**Figura 5.2.** Número de acículas de plantas de *Casuarina equisetifolia* creciendo en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inocular microorganismos; RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp. (M2BOS1-R2); T = *Trichoderma viride* CP4.

En suelo contaminado la mayor acumulación de biomasa se presentó en los tratamientos con los tres microorganismos con Floranid (0.16 g), y *Spingobacterium* con Floranid (0.16 g). La menor acumulación de biomasa se presentó en el tratamiento con *Trichoderma* y la aplicación de Floranid (0.039 g) (Figura 5.3).

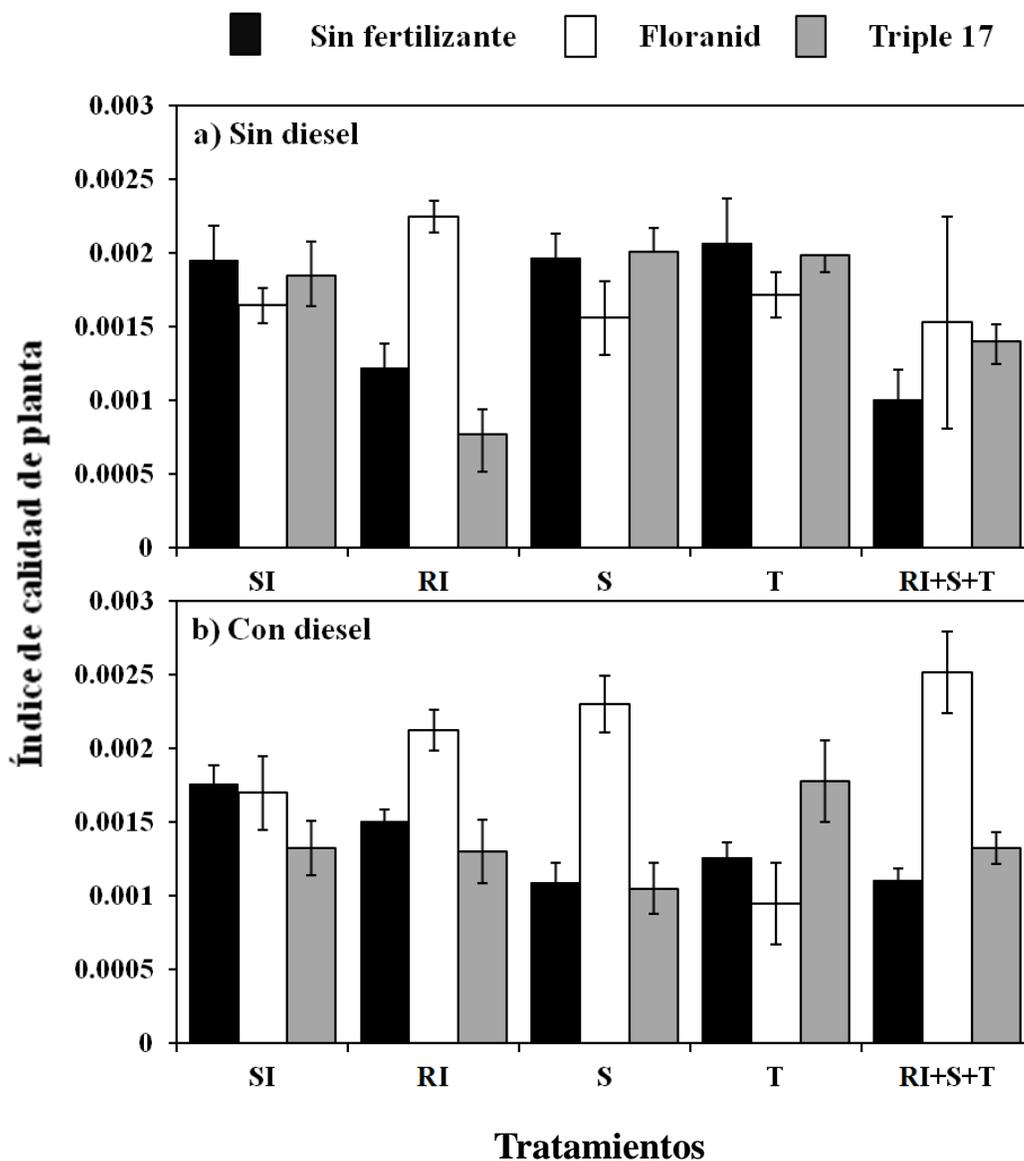


**Figura 5.3.** Biomasa seca total de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con la inoculación de microorganismos rizosféricos y aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n =10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Spingobacterium*, T = *Trichoderma viride* CP4.

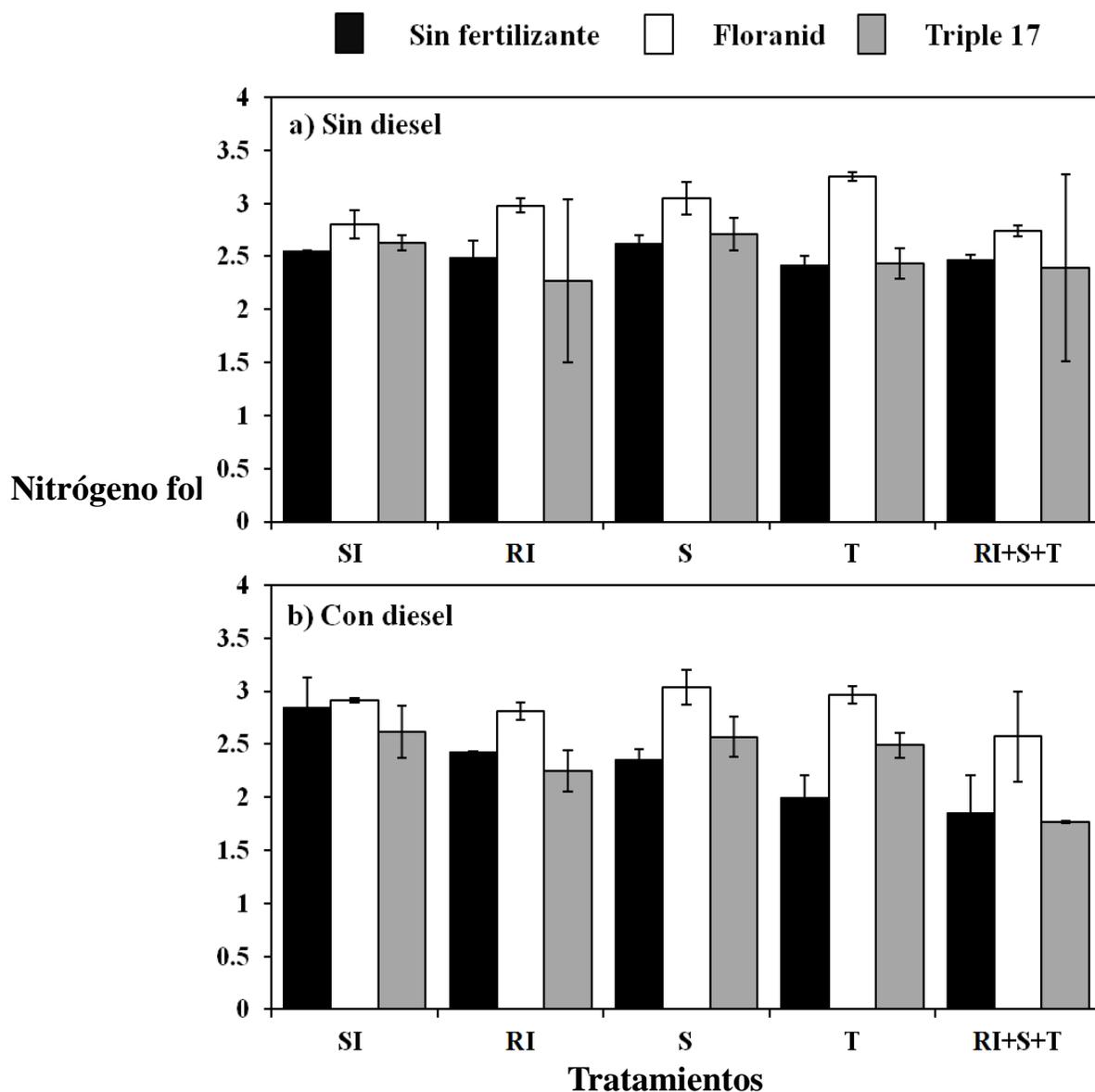
El índice de calidad de plantas de *C. equisetifolia* no mostró diferencias significativas por los factores contaminación e inoculación. Sin embargo, el factor fertilización presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ), ya que la aplicación de Floranid aumentó el índice de calidad de las plántulas en 28%, con respecto a las plantas sin fertilizar o con aplicación de Triple 17 (Apéndice 5). El efecto de los tratamientos para este índice de calidad presentó resultados significativos ( $P \leq 0.001$ ). En el suelo no contaminado el índice de calidad aumentó en el tratamiento con *R. intraradices* en combinación de Floranid (0.0022), mientras que el menor índice se observó en el tratamiento con *R. intraradices* fertilizado con Triple 17 (0.0007). En presencia de diesel, el mayor índice de calidad se observó en plantas con la triple inoculación de microorganismos y aplicación de Floranid (0.002 g), y con *Sphingobacterium* fertilizado con floranid (0.002); en contraste, el menor índice se presentó en plantas con *Trichoderma* y Floranid (0.0009 ) (Figura 5.4).

El contenido de nitrógeno foliar en *C. equisetifolia* no presentó diferencias significativas por el factor contaminación; mientras que el factor inoculación mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ), así, el tratamiento no inoculado o con la inoculación de *Sphingobacterium* presentaron un aumento del 10% con respecto a la inoculación de *R. intraradices*, *Trichoderma*, o la combinación de los tres microorganismos. El factor fertilización mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) al aplicar Floranid, el cual aumentó el contenido de nitrógeno en 25%, con respecto a la aplicación de Triple 17 y al testigo sin fertilizar (Apéndice 6). El efecto por tratamiento presentó resultados significativos ( $P \leq 0.001$ ). El tratamiento con *Trichoderma* y Floranid presentó el mayor contenido (3.25%) en ausencia de diesel, y el menor porcentaje se obtuvo con *R. intraradices* y Triple 17 (2.27%) (Figura 5.5). En presencia de diesel, el contenido de

nitrógeno más alto se observó en el tratamiento con *Sphingobacterium* y Floranid (3.02%), y el menor correspondió a la triple inoculación combinada con Triple 17 (1.77%).



**Figura 5.4.** Índice de calidad de plantas de *Casuarina equisetifolia* en presencia y ausencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), con inoculación de microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 10. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.

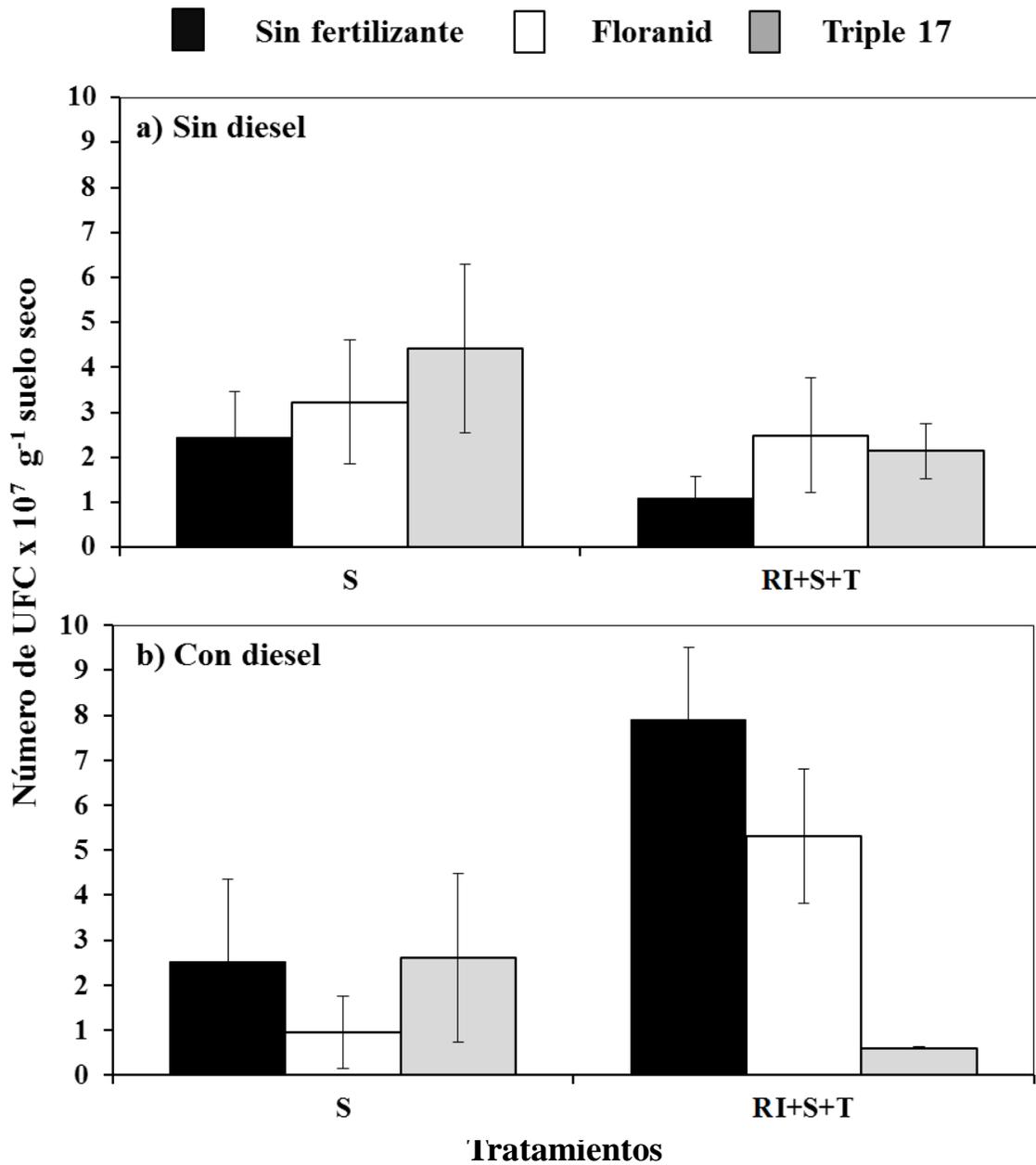


**Figura 5.5.** Nitrógeno foliar de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>), e inoculados con microorganismos rizosféricos y la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones: SI = Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp, T = *Trichoderma viride* CP4.

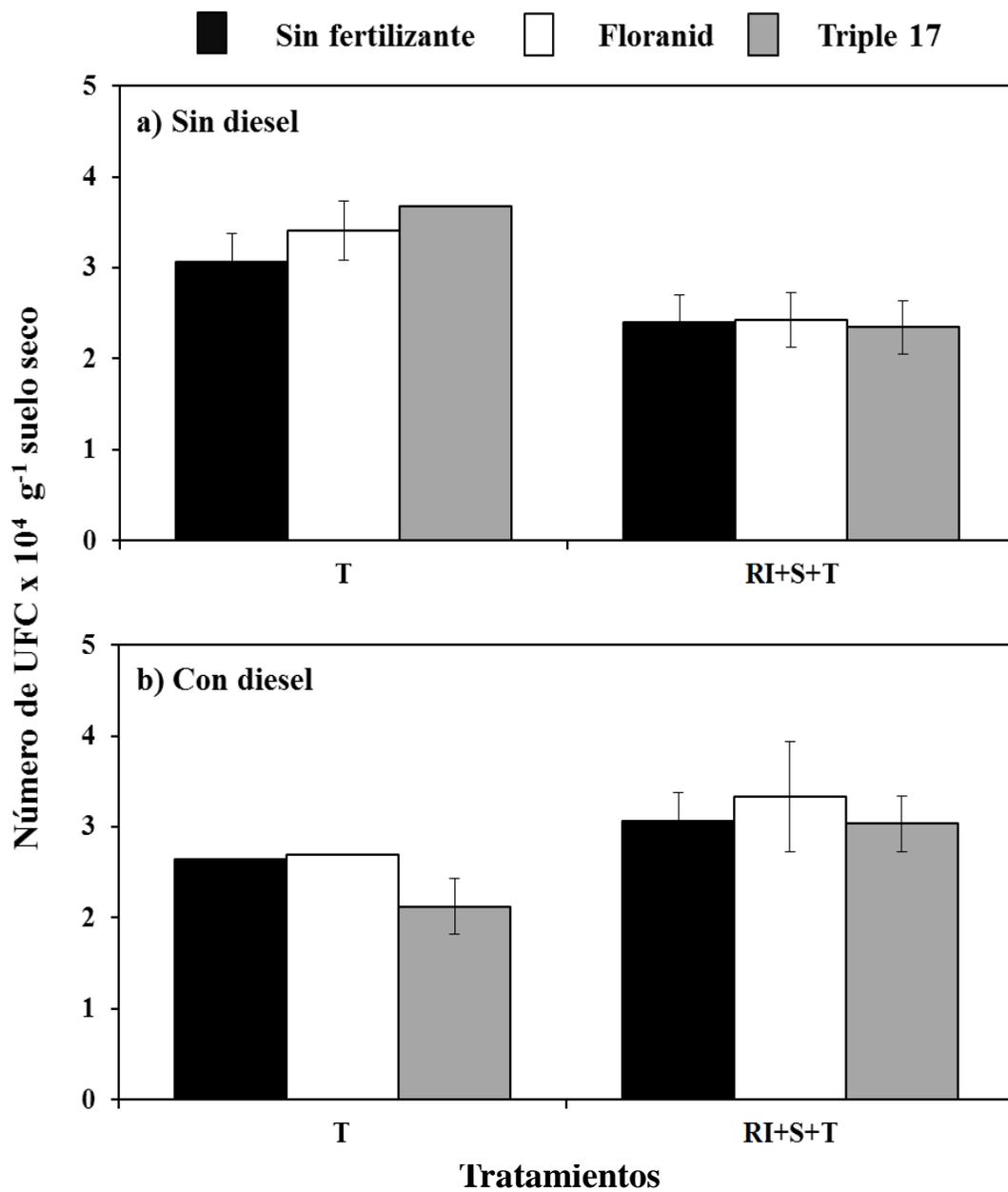
## Efectos en la población de microorganismos inoculados

De acuerdo con el análisis de varianza, los factores contaminación, inoculación y fertilización no presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en las UFC de *Sphingobacterium* sp; en contraste, el efecto por tratamiento sí mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). En ausencia de diesel el mayor número de UFC se presentó con *Sphingobacterium* sp y Triple 17 ( $4.7 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco), mientras que el menor número se observó en el tratamiento con la triple inoculación de microorganismos sin fertilizar ( $1.0 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco). En presencia de diesel, la triple inoculación sin fertilizar presentó la mayor población bacteriana ( $7.9 \times 10^7$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco), mientras que el menor número se presentó con la triple inoculación de los microorganismos combinado con Triple 17 ( $6.0 \times 10^6$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco) (Figura 5.6 y Apéndice 6).

En el caso de *Trichoderma*, los factores contaminación, inoculación y fertilización no presentaron diferencias significativas en las UFC de este hongo; sin embargo, el efecto por tratamiento mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). En ausencia de diesel el mayor número de UFC se observó en el tratamiento con *Trichoderma* combinado con Triple 17 ( $3.6 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco), mientras que el menor número se presentó en todos los tratamientos con la triple inoculación ( $2.3 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco, en promedio). En presencia de diesel, el mayor número de UFC se observó en el tratamiento inoculado con *Trichoderma* combinado con Floranid ( $3.6 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco), y el menor número en el tratamiento inoculado con *Trichoderma* y la aplicación de Triple 17 ( $2.1 \times 10^4$  UFC  $g^{-1}$  suelo seco) (Figura 5.7 y Apéndice 6).



**Figura 5.6.** Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Sphingobacterium*, en la rizósfera de plantas de *Casuarina equisetifolia* que crecieron en ausencia y presencia de diesel (5000 mg kg<sup>-1</sup>) con la aplicación de fertilizantes Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones: S = *Sphingobacterium* sp, RI = *Rhizophagus intraradices*, T = *Trichoderma* CP4.

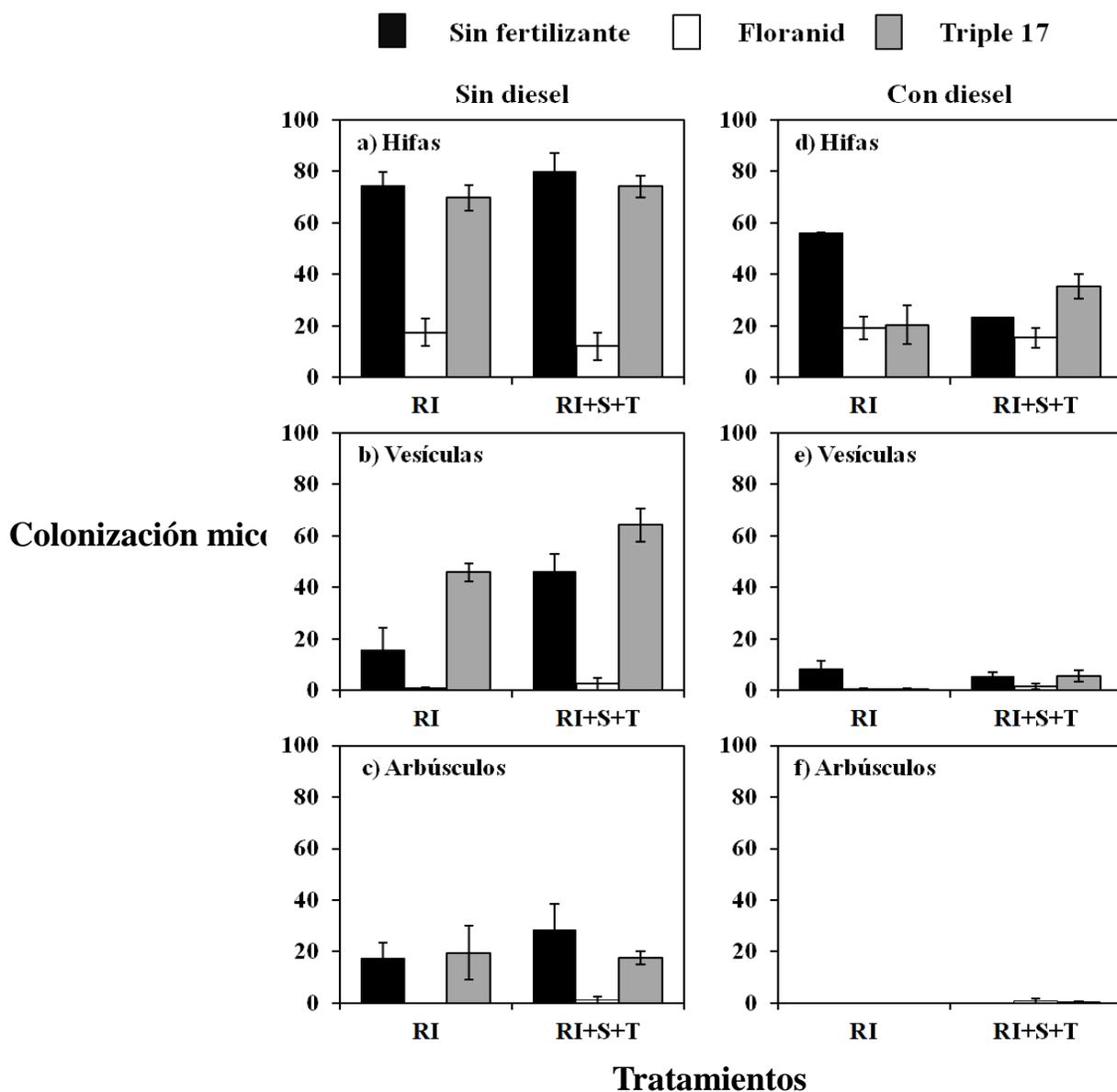


**Figura 5.7.** Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Trichoderma viride* CP4 en la rizósfera de plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel ( $500 \text{ mg kg}^{-1}$ ), y la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero.  $n = 4$ . Medias  $\pm$  error estándar. Abreviaciones: RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium*, T = *Trichoderma* CP4

El porcentaje de colonización total (hifas) de *Rhizophagus intraradices*, presentó diferencias significativas por los factores contaminación y fertilización ( $P \leq 0.001$ ). El diesel redujo el porcentaje de hifas hasta 98% con respecto a las plantas que crecieron en suelo no contaminado. Con respecto al factor fertilización, el tratamiento sin fertilizar y aquél con la aplicación de Triple 17 presentaron el mayor porcentaje de hifas 58.5% y 49.9%, respectivamente; mientras que con Floranid la colonización por hifas fue de 16%. El efecto por tratamiento presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) para el porcentaje de hifas. En ausencia de diesel, el mayor porcentaje de colonización se observó con la inoculación de los tres microorganismos sin fertilizar (80%), mientras que el menor porcentaje lo presentó la triple inoculación o con *R. intraradices* ambos fertilizados con Floranid al presentar 12.08% y 17% de colonización, respectivamente (Figura 5.8 a). En presencia de diesel, el tratamiento inoculado con *R. intraradices* sin fertilización presentó el mayor porcentaje de colonización (56.25%), mientras que el menor porcentaje lo presentó el tratamiento con la triple inoculación fertilizado con Floranid (15.41%) (Figura 5.8 d).

Con respecto al porcentaje de vesículas, los factores contaminación y fertilización presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). El diesel inhibió el porcentaje de vesículas en 90% con respecto a las plantas que crecieron en suelo sin contaminar. En el caso del factor fertilización, la aplicación de Triple 17 presentó el mayor porcentaje de vesículas (29%) con respecto a los tratamientos sin fertilizar y con la aplicación de Floranid (18% y 1.3%, respectivamente). El efecto por tratamiento produjo diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) en el porcentaje de vesículas. En ausencia de diesel, el mayor porcentaje de vesículas se presentó en el tratamiento con los tres microorganismos fertilizado con Triple 17 (64.16%), mientras que el menor porcentaje (0.83%) se observó en el tratamiento con *R. intraradices* combinado con Floranid (Figura 5.8 b). En presencia de diesel, el mayor

porcentaje de vesículas se observó con *R. intraradices* sin fertilizar (8.33%), y el menor porcentaje (0.41% en promedio) se presentó en el tratamiento con *R. intraradices* ya sea Floranid o con Triple 17 (Figura 5.8 e).



**Figura 5.8.** Colonización micorrízica arbúscular en plantas de *Casuarina equisetifolia* en ausencia y presencia de diesel (500 mg kg<sup>-1</sup>), y el efecto de la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. n = 4. Medias ± error estándar. Abreviaciones RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.

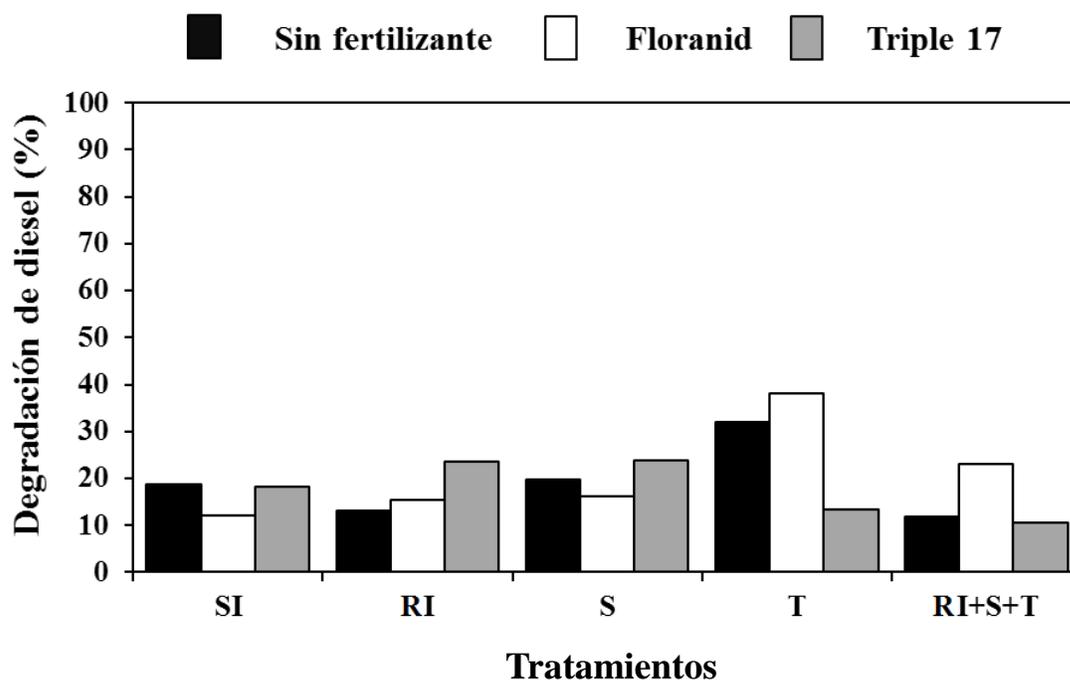
Con respecto al porcentaje de arbusculos, los factores contaminación y fertilización presentaron diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ). El diesel inhibió el porcentaje de arbusculos en 98.5% con respecto a las plantas que crecieron en suelo sin contaminar. En el caso del factor fertilización, la aplicación de Triple 17 presentó el mayor porcentaje de arbusculos (9.37%) con respecto a la aplicación de Floranid (0.52%). El efecto por tratamiento presentó diferencias significativas ( $P \leq 0.001$ ) para el porcentaje de arbusculos. En ausencia de diesel, el mayor porcentaje de arbusculos se observó en el tratamiento con la triple inoculación sin fertilizar (28.33%); en contraste, el tratamiento con *R. intraradices* con Floranid no presentó colonización por arbusculos (Figura 5.8 c). En presencia de diesel, el efecto de los tratamientos no presentó diferencias significativas, y todos los tratamientos tuvieron en promedio 0.6% de arbusculos (Figura 5.8 f y Apéndice 7).

No se observó colonización micorrízica en aquellos tratamientos donde no se hizo la inoculación de *Rhizophagus intraradices*.

### **Degradación del diesel**

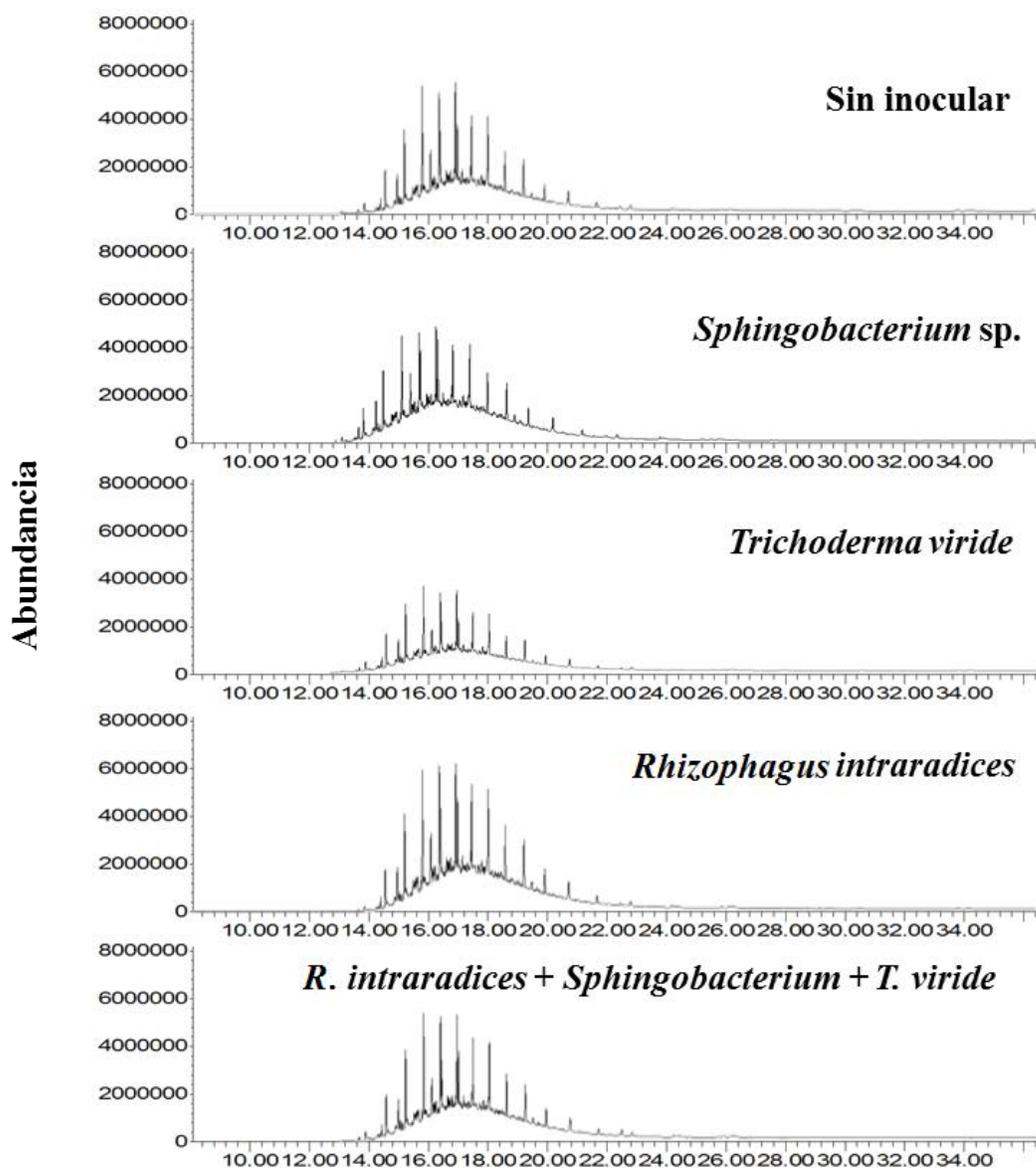
Los promedios de degradación de diesel se obtuvieron con base en el área total del espectrograma obtenido de cada uno de los tratamientos. El efecto de los tratamientos presentó diferencias significativas, ya que el mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos del diesel se observó con *Trichoderma* sin fertilizar (32%) o con la aplicación de Floranid (38%) (Figura 5-9). En contraste, la menor degradación se produjo con la inoculación de los tres microorganismos en combinación de Triple 17 (10.5%) o sin fertilizar (12%), así como en el tratamiento sin microorganismos fertilizado con Floranid (13%) (Figura 5.9). La degradación de los hidrocarburos del diesel en los tratamientos se puede apreciar de manera más evidente, en los cromatogramas incluidos en las Figuras

5.10, 5.11 y 5.12, en los que se muestra la abundancia de hidrocarburos del diesel presentes en las muestras de suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* después de 120 días, por efecto de la inoculación de los microorganismos benéficos en combinación con las fuentes fertilizantes evaluadas.



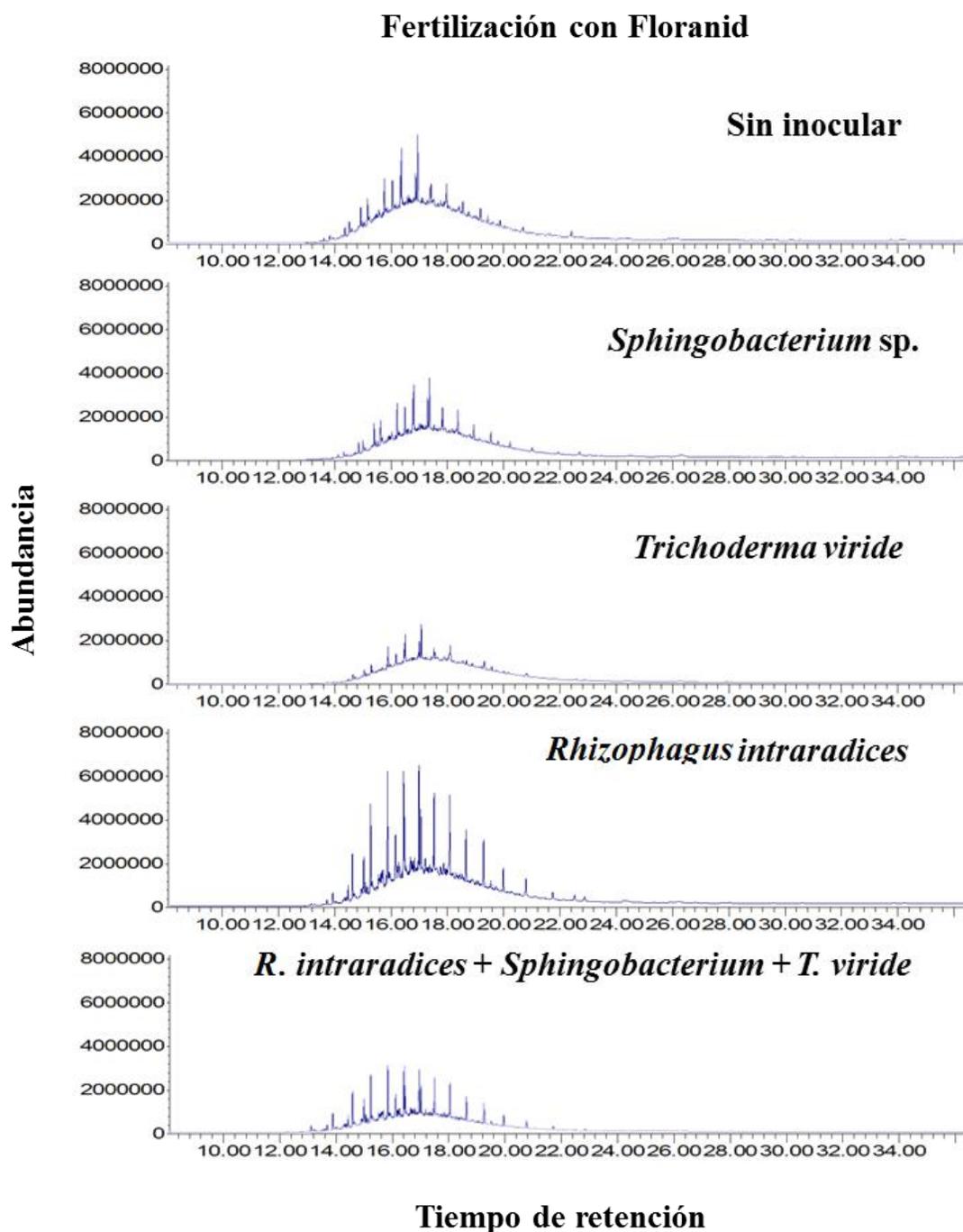
**Figura 5.9.** Porcentaje de degradación de diesel ( $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* por efecto de la inoculación con microorganismos rizosféricos, y la fertilización con Floranid y Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero.  $n = 4$ . Abreviaciones: SI=Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp, T = *Trichoderma viride* CP4.

## Tratamiento sin fertilizar

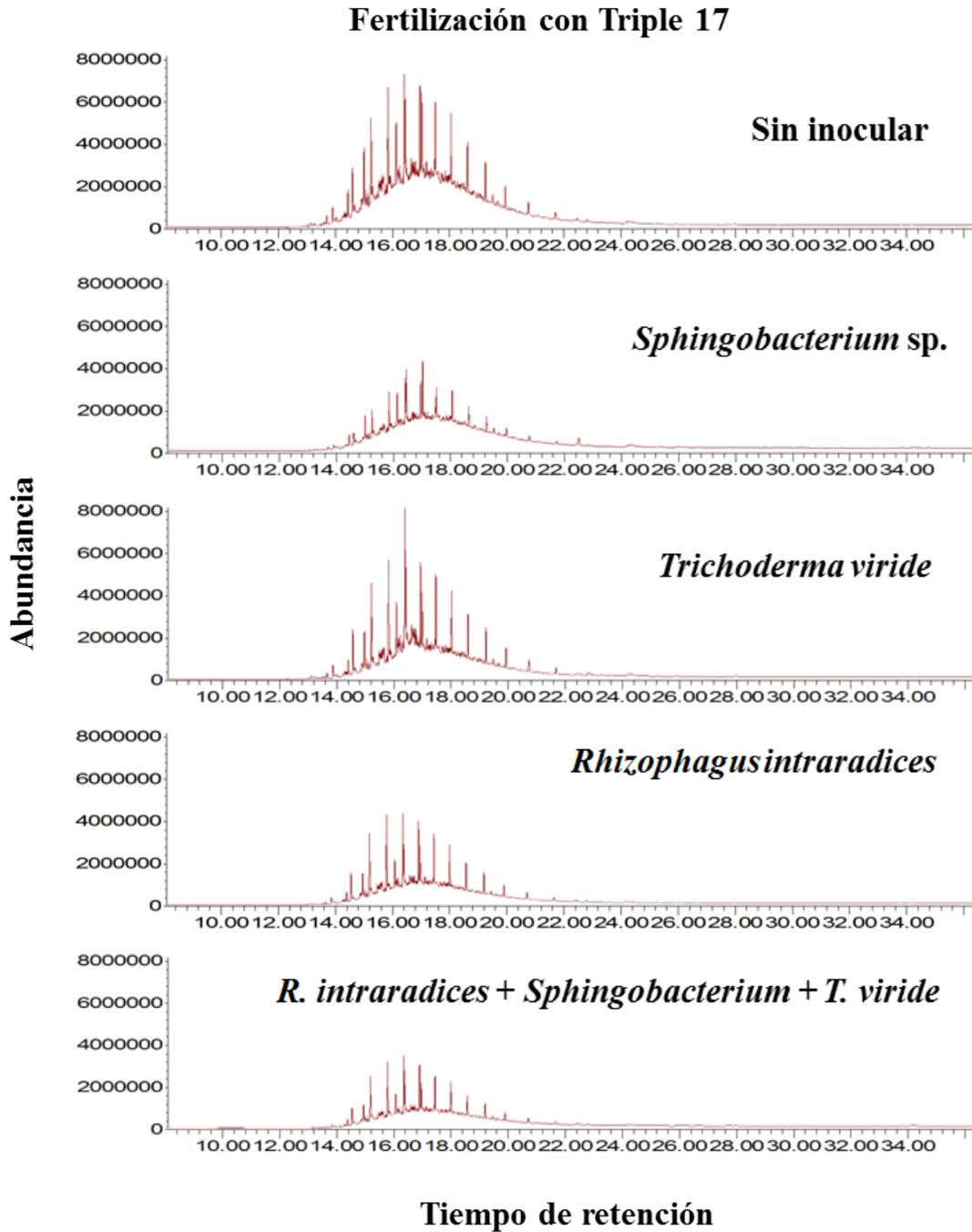


## Tiempo de retención

**Figura 5.10.** Cromatogramas que muestran los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel en muestras de suelo rizosférico de plantas de *Casuarina equisetifolia*, inoculada con microorganismos rizosféricos sin aplicación de fertilizante, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI =Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.



**Figura 5.11.** Cromatogramas que muestran los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel ( $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en muestras de suelo rizosférico de *Casuarina equisetifolia* inoculada con microorganismos rizosféricos y la adición del fertilizante Floranid, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI =Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.



**Figura 5.12.** Cromatogramas que muestran los picos de abundancia de hidrocarburos del diesel ( $5000 \text{ mg kg}^{-1}$ ) en muestras de suelo rizosferico de *Casuarina equisetifolia* inoculada con microorganismos rizosféricos y la aplicación del fertilizante Triple 17, después de 120 días bajo condiciones de invernadero. Abreviaciones: SI =Sin inoculación de microorganismos, RI = *Rhizophagus intraradices*, S = *Sphingobacterium* sp., T = *Trichoderma viride* CP4.

## DISCUSIÓN

En este trabajo se presentó una reducción de la altura de tallo, número de acículas, biomasa seca en plantas de *Casuarina equisetifolia* por la presencia del diesel; este efecto negativo ha sido reportado para especies arbóreas como *Erythrina crista-galli* (Farías *et al.*, 2009). La reducción de la biomasa seca, esta puede deber a un efecto severo del contaminante sobre la biomasa radicular debido a que éste se encuentra en contacto directo con la raíz (Kapustka y Reporter, 1998). Los hidrocarburos del diesel inhiben el rebrote de meristemas, lo cual disminuye la elongación radicular e impide la difusión del oxígeno debido a las condiciones anaerobias del suelo, dicha inhibición se refleja principalmente en el crecimiento, fructificación y desarrollo de la planta (Rentz *et al.*, 2003).

En lo que respecta al factor fertilización, la aplicación de Floranid aumentó el número de acículas, la biomasa seca total, el índice de crecimiento y la colonización micorrízica, con respecto al tratamiento sin fertilizar y a la aplicación de Triple 17. Trabajos anteriores en leguminosas han demostrado que la aplicación de fertilizantes estimulan la altura, la acumulación de materia seca y las poblaciones microbianas en la rizósfera de plantas que crecieron en presencia de contaminantes orgánicos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007; Chaineau *et al.*, 2005). Por tanto, se muestra el efecto benéfico de la aplicación de fertilizantes en plantas sometidas a estrés por efecto de hidrocarburos del petróleo (Hutchinson *et al.*, 2001).

La inoculación de microorganismos aumentó la altura de las plantas, la biomasa seca, el índice de calidad de planta, y el número de acículas cuando se inoculó *Sphingobacterium* y el consorcio de *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium* y *Trichoderma viride* CP4. Las interacciones entre plantas y microorganismos en la rizósfera son aún difíciles de explicar y en algunos casos, el beneficio es mutuo para ambos

organismos (Hedge y Fletcher, 1996). Los microorganismos inoculados en el suelo posiblemente desempeñaron diferentes funciones, como puede ser el facilitar la nutrición de las plantas actuando en la promoción del crecimiento o como degradadores de materia orgánica (Tang *et al.*, 2010). De igual manera, pueden aumentar la actividad de enzimas (peroxidasa, oxidasa, catecol oxidasa, entre otras) responsables de la degradación de hidrocarburos del diesel, induciendo a la vez resistencia al estrés provocado por el contaminante orgánico (Liu *et al.*, 2004; Debiane *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2009).

En ausencia de diesel, la inoculación de *Trichoderma viride* CP4, estimulo en las plantas mayor la altura, número de acículas y la acumulación de biomasa. Diversas cepas de *Trichoderma* sp. han sido reportadas por la producción de factores de crecimiento (auxinas, giberelinas y citoquininas), las cuales son liberadas en la rizosfera y con ello estimular el crecimiento de las plantas (Ousley *et al.*, 1994; Altomore *et al.*, 1999). Por otro lado, la triple inoculación en ausencia de diesel redujo la altura, la biomasa seca y el número de acículas, lo cual puede atribuirse a que los microorganismos y la planta compitieron por los nutrientes.

En presencia de diesel la altura de tallo, el número de acículas y acumulación de biomasa seca fue mayor en el tratamiento con los tres microorganismos y fertilizado con Floranid. La eficiencia de la bioestimulación y de la bioaumentación en la degradación de suelo contaminado ha sido reportada por diversos autores (Bento *et al.*, 2005; Mancera-López *et al.*, 2008; Latha *et al.*, 2011). Sin embargo, no existen trabajos que reporten el efecto conjunto de la bioaumentación con *R. intraradices*, *Sphingobacterium* y *Trichoderma viride*, en combinación de la bioestimulación de dos fertilizantes inorgánicos (Triple 17 Y Floranid) sobre el crecimiento de las plantas en condiciones de contaminación.

La inoculación de *Rhizophagus intraradices* y la aplicación de Floranid, incrementó el índice de calidad de la planta en ausencia de diesel. Diversos autores mencionan que la inoculación de los HMA en las plantas, aumentan la altura, la longitud de raíz y la acumulación de biomasa seca total (Alarcón *et al.*, 2002; Wu y Xia, 2006; Khalafallah y Abo-Ghalia, 2008), por tanto, aumentan el índice de calidad de la planta, ya que los HMA confieren a las plantas mayor aprovechamiento de elementos poco móviles en el suelo como P, Cu y Zn (Azcón-Aguilar y Barea 1997; Smith y Read, 1997). Por otro lado, en el suelo contaminado con diesel el mayor índice de calidad se presentó en el tratamiento inoculado con *Sphingobacterium* sp. fertilizado con Floranid. Al respecto, existen reportes en los cuales se menciona que la presencia de esta bacteria ayuda a la planta a tolerar contaminantes orgánicos (Tang *et al.*, 2010): sin embargo, no se ha reportado el efecto directo de esta bacteria en variables de crecimiento, por lo que se denota la importancia y aportaciones de este trabajo.

Con respecto al efecto en las poblaciones microbianas, el diesel no afectó el crecimiento de las UFC de *Sphingobacterium* y *Trichoderma viride* CP4. Sin embargo, sí afectó el desarrollo de *Rhizophagus intraradices* al reducir el porcentaje de hifas hasta un 98.5%, de vesículas en 90% y de arbuscúlos un 98%. La presencia de hidrocarburos del petróleo afecta notablemente la colonización micorrízica tanto de arbuscúlos, vesículas e hifas (Verdin *et al.*, 2006; Debiante *et al.*, 2008).

En relación al contenido de nitrógeno total en planta, este no presentó incrementos relevantes ante la presencia o ausencia de diesel. Esto se puede deber a que el nitrógeno no está disponible para ser absorbido por la planta (Chen *et al.*, 2003). El tratamiento inoculado con *Sphingobacterium* y fertilizado con Floranid en presencia de diesel presentó el mayor porcentaje de nitrógeno foliar. Esto hace suponer que la fertilización estimula a

los microorganismos a usar el nitrógeno de la rizósfera para mantener su actividad metabólica y para la acumulación de biomasa (Bento *et al.*, 2005).

La mayor degradación de diesel en tratamientos inoculados con *Rhizophagus intraradices* se observó en el tratamiento fertilizado con Triple 17. Se ha comprobado que la inoculación de HMA estimula la degradación de niveles bajos de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Liu *et al.*, 2004; Volante *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2011). En el caso de *Rhizophagus intraradices*, este se reporta que tiene tolerancia a hidrocarburos de petróleo (Liu y Dalpé, 2009), ya que es capaz de acumular hasta 140 mg L<sup>-1</sup> de antraceno en hifas y esporas (Verdin *et al.*, 2006). *Rhizophagus intraradices* ayuda al crecimiento de *Corchorus capsulari* y a disipar concentraciones de antraceno de hasta 200 mg kg<sup>-1</sup> (Cheung *et al.*, 2008). En lo que respecta a la fertilización, se ha reportado que las dosis bajas de fertilización estimulan la formación de esporas (Pedraza-Santos *et al.*, 2001). Sin embargo, en el presente trabajo la fertilización con Floranid redujo el porcentaje de colonización con respecto al testigo sin fertilizar, además, en presencia de diesel, la aplicación de ambos fertilizantes no estimuló la colonización ni la degradación de los hidrocarburos del diesel en las plantas con el hongo micorrízico. No obstante, bajo condiciones de laboratorio las técnicas de bioestimulación con fertilizantes inorgánicos han demostrado un 90% de degradación de diesel (Gallego *et al.*, 2001). Lo anterior sugiere que se requiere investigar diferentes dosis y fuentes fertilizantes para bioestimular la fitorremediación asistida con microorganismos benéficos.

La mayor degradación de hidrocarburos en presencia de *Sphingobacterium* sp. se presentó en el tratamiento fertilizado con Triple 17 que fue de 23.77%. En el caso de gramíneas *Sphingobacterium* sp. genera una tolerancia a hidrocarburos y se sabe que en combinación con otros microorganismos es capaz de degradar hasta 92% de hidrocarburos

totales del petróleo (Tang *et al.*, 2010). Esta bacteria tiene capacidad de usar a los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono (Dalal *et al.*, 2010), y también se reporta que es capaz de degradar colorantes como el Rojo 5 (Tamboli *et al.*, 2010). Los resultados presentados en este trabajo sobre los efectos de esta bacteria en plantas y su respuesta a la bioestimulación bajo condiciones de contaminación no han sido previamente reportados.

La inoculación de *Trichoderma viride* CP4 sin fertilizar y con la aplicación de Floranid, presentaron mayor degradación de hidrocarburos del diesel (32% y 38% respectivamente). *Trichoderma* es un hongo que se ha aislado de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo (Chaineau *et al.*, 1999). En general, esta cepa ya ha sido reportada por su tolerancia y mayor crecimiento, ante concentraciones altas de naftaleno y de fenantreno (250 mg L<sup>-1</sup>) (Argumedo-Delira *et al.*, 2012). Este es uno de los primeros trabajos en reportar el efecto de *Trichoderma viride* en plantas sometidas a estrés por hidrocarburos del diesel en condiciones de invernadero.

Este trabajo en general, mostró resultados satisfactorios de remediación de suelo contaminado con diesel cuando se inoculó con *Rhizophagus intraradices*, *Sphingobacterium sp.* y *Trichoderma viride* CP4 en combinación con el fertilizante Triple 17 o con Floranid. En los últimos años la aplicación de fertilizantes (bioestimulación) ha demostrado ser una técnica eficiente y complementaria en la remediación de suelos contaminados con diesel (Seklemova *et al.*, 2001). Sin embargo, aún falta evaluar aspectos importantes de las interacciones de plantas con microorganismos (simbióticos o de vida libre) para aprovechar al máximo su capacidad de degradación de contaminantes orgánicos en el suelo.

## CONCLUSIONES

El factor contaminación (5000 mg kg<sup>-1</sup> de diesel) afectó la altura de las plantas, el número de acículas, la biomasa seca y la colonización micorrízica en raíces de *Casuarina equisetifolia*.

Con respecto al factor inoculación, el mayor efecto se produjo con *Sphingobacterium sp.* ya que aumentó la altura, el número de acículas y el contenido de nitrógeno foliar de las plantas sometidas a hidrocarburos del diesel.

El mejor efecto por el factor fertilización se presentó cuando se aplicó Floranid, al aumentar el número de acículas, la biomasa seca total, el índice de calidad y el contenido de nitrógeno foliar.

En relación a los tratamientos, se observó que en ausencia de diesel *C. equisetifolia* fue mayormente beneficiada al inocular *Trichoderma*, ya que aumentó la altura de las plantas, el número de acículas, y la biomasa seca total. En contraste, el tratamiento con los tres microorganismos presentó los valores más bajos en estas mismas variables. En presencia de diesel la inoculación de *Sphingobacterium* con Floranid y la triple inoculación con Floranid aumentaron la altura, el número de acículas, la biomasa seca y el índice de calidad de las plantas de *C. equisetifolia*. Sin embargo, *Trichoderma* con Floranid no aumentó los valores de las variables antes mencionadas.

El mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos se observó con *Trichoderma* sin fertilizar o con aplicación de Floranid; en contraste, la menor degradación se produjo con la triple inoculación de los microorganismos con Triple 17 o sin aplicación de fertilizantes, así como en el tratamiento sin inocular en combinación con Floranid.

En general, la interacción de *R. intraradices*, *Sphingobacterium* y *Trichoderma viride* CP4 con *C. equisetifolia* en combinación de la aplicación de Floranid, ayudan a esta especie arbórea a tolerar y degradar hidrocarburos del diesel. Por lo anterior, se acepta la hipótesis planteada para esta fase experimental y se comprueba que esta combinación de microorganismos es un modelo útil para la fitorremediación de suelos contaminados con diesel.

## CAPÍTULO VI

### CONCLUSIONES GENERALES

- Las semillas de *C. equisetifolia* toleran la contaminación con hidrocarburos del diesel y germinan en menor tiempo en comparación con las semillas establecidas en suelo sin contaminar hasta concentraciones de 20000 mg kg<sup>-1</sup>.
- El diesel afecta la emergencia de las plantas de *C. equisetifolia*, así como su desarrollo posterior a partir de concentraciones de 5000 mg kg<sup>-1</sup>.
- En el factor inoculación, el mejor efecto se tuvo con *Sphingobacterium sp.* favoreció el desarrollo de las plantas e incrementó la altura, el número de acículas y el porcentaje de nitrógeno foliar.
- Con respecto al factor fertilización, el Floranid aumentó el número de acículas, la biomasa seca total, el índice de calidad de las plantas y el porcentaje de nitrógeno foliar.
- En ausencia de diesel, la inoculación de *Trichoderma viride* CP4 aumentó la altura, el número de acículas y la biomasa seca, mientras que la triple inoculación de los microorganismos redujo estas variables.
- En presencia de diesel *Sphingobacterium sp.* en combinación de Floranid aumentó la altura, la biomasa seca, el índice de calidad y el porcentaje de nitrógeno. En contraste, *Trichoderma viride* CP4 en combinación con Floranid redujo las variables antes mencionadas.
- El diesel redujo en promedio 95% el porcentaje de hifas, vesículas y arbusculos. Sin embargo, la fertilización con Triple 17 contribuyó a un aumento en la colonización micorrízica.

- El mayor porcentaje de degradación de hidrocarburos se observó con *Trichoderma* sin fertilizar y con la aplicación de Floranid; mientras que, la menor degradación se produjo con la triple inoculación de los microorganismos con Triple 17 y sin fertilizar, así como en el tratamiento sin inocular con Floranid.
- La interacción de *R. intraradices*, *Sphingobacterium* y *Trichoderma viride* CP4 con *C. equisetifolia* y la aplicación de fertilizante (Floranid y Triple 17) son un modelo útil para ser utilizados en la fitorremediación de suelos contaminados con diesel.

## LITERATURA CITADA

- Adam G.; Duncan HJ. 1999. Effect of diesel fuel on growth of selected plant species. *Environmental Geochemistry and Health*. 21: 353–357.
- Marguesin R.; Zimmerbauer A.; Shinner F. 2000. Monitoring of bioremediation by soil biological activities. *Chemosphere*. 40:339-346.
- Hamme J.; Sing A.; Ward O. 2003. Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67:503-549.
- Adam G.; Duncan HJ. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*. 120:363-370.
- Adams RH.; Morales-García F. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico I: Consideraciones para la salud pública y protección al ganado. *Interciencia*. 37: 476-482.
- Aitchison EW.; Kelley SL.; Alvarez JP.; Schnoor JL. 2000. Phytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environment Research*. 72: 313-321.
- Alarcón A.; Davies JF.; Egilla J.; Fox T.; Estrada-Luna A.; Ferrera-Cerrato R. 2002. Short term effects of *Glomus claroideum* and *Azospirillum brasilense* on growth and root acid phosphatase activity of *Carica papaya* L. under phosphorus stress. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 44:31-37.
- Alcalá J.; Sosa M.; Moreno M.; Quintana C.; Quintana G.; Miranda S.; Rubio A. 2008. Metales pesados indicadores de la calidad ambiental urbana: Ciudad de Chihuahua, México. *Latin American Journal of Natural Resources*. 17:39-54.
- Al-Mutairi N.; Bufarsan A.; Al-Rukaibi F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere*. 74:142-148.

- Altomare C.; Norvell W.; Björkman T.; Harman G. 1999. Solubilization of phosphates and micronutrients by the plant-growth promoting and biocontrol fungus *Trichoderma harzianum* Rifai strain 1295-22. *Applied Environmental Microbiology*. 65:2926-2933.
- Argumedo-Delira R.; Alarcón A.; Ferrera-Cerrato R.; Almaraz JJ.; Peña-Cabriales JJ. 2012. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *Journal of Environmental Management*. 95:291-299.
- Ayotamuno JM.; Kogbara RB.; Agoro OS. 2009. Biostimulation supplemented with phytoremediation in the reclamation of a petroleum contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 25:1567–1572.
- Azcárate, LB.; Mingorance JA. 2002. Energías e impacto ambiental. Edición, Equipo SIRIUS S.A. Primera edición, Madrid, España. pp. 173-221.
- Azcón-Aguilar C.; Barea J. 1997. Applying mycorrhiza biotechnology to horticulture: significance and potentials. *Scientia Horticulture*. 68:1-24.
- Baek KH.; Kim HS.; Oh HM.; Yoon BD.; Kim J.; Lee IS. 2004. Effects of crude oil, oil components, and bioremediation on plant growth. *Journal of Environmental Science and Health*. 39: 2465-247.
- Benavides López de Mesa J.; Quintero G.; Guevara V.; Jaimes C.; Gutiérrez R.; García MJ. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*. 4: 82-91.
- Bento FM.; Camargo FO.; Okeke BC.; Frankenberger WT. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Bioresource Technology*. 96:1049-1055.

- Boonchan S.; Britz ML.; Stanley GA. 2000. Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal–bacterial cultures. *Applied and Environmental Microbiology*. 66:1007-1019.
- Botello A.; Rendón J.; Gold BG.; Agraz HC. 2006. Golfo de México. Contaminación e impacto ambiental: Diagnóstico y tendencias. Editado por el Instituto Nacional de Ecología. Segunda edición. México. pp. 261-331.
- Bruzón SN.; Matos AV.; Milan CP. 2003. Prueba de especies forestales en áreas devastadas por la minería a cielo abierto en Holguín. *Centro Agrícola*. 30:80-85.
- Campbell AN.; Reece B. 2007. Biología. Editorial Médica Panamericana. Edición 7, pp. 1209-1212.
- Castillo RF.; Roldan RD.; Blasco PR.; Huertas RM.; Caballero DF.; Moreno-Vivían C.; Luque-Romero M. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tébar, S.L. Madrid, España. pp. 359-378.
- CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza) 1991. *Casuarina equisetifolia*, L. árbol de uso múltiple en América Central. Informe técnico 173, pp. 8-16.
- Chaîneau CH.; Morel UJ.; Dupont J.; Bury E.; Oudot J. 1999. Comparison of the fuel oil biodegradation potential of hydrocarbon-assimilating microorganisms isolated from a temperate agricultural soil. *Science of the Total Environment*. 227:237-247.
- Chaîneau CH.; Rougeux G.; Yépreman C., Oudot J. 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biology Biochemistry*. 37:1490-1497.
- Chen G.; Zhu H.; Zhang Y. 2003. Soil microbial activities and carbon and nitrogen fixation. *Research in Microbiology*. 154: 393-39

- Cheung KC.; Zhang JY.; Deng HH.; Ou YK.; Leung HM.; Wu SC.; Wong MH. 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Bioresource Technology*. 99:2148–2155.
- Cognetti G.; Sará M.; Magazzú G. 2001. *Biología Marina*. Editorial Ariel S.A. Primera edición, pp. 512-535.
- CONABIO (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). 2009. Ficha informativa sobre *Casuarina equisetifolia*. Consultada en Mayo del 2010. [www.conabio.gob.mx/.../casuarinaceae/casuarina-equisetifolia/](http://www.conabio.gob.mx/.../casuarinaceae/casuarina-equisetifolia/).
- Cunningham SD.; Anderson TA.; Schwab AP.; Hsu FC. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56:55–113.
- Cunningham SD.; Berti W.1993. Remediation of contaminated soils with green plants: An overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 29:207-212.
- Dalal, J.; Sarma PM.; Lavania M.; Mandal AJ.; Lal B. 2010. Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA). *Pedobiologia*. 54:25-30.
- Debiane D.; Garcon G.; Verdin A.; Fontaine J.; Durand R.; Grandmougin-Ferjani A.; Shirali P.; Sahraoui AL. 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environmental and Experimental Botany*. 64:120-127.
- Debiane D.; Garcon G.; Verdin A.; Fontaine J.; Durand R.; Shirali P.; Grandmougin-Ferjani A.; Lounes-Hadj A. 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an *in vitro* chicory root model. *Phytochemistry*. 70:1421-1427

- Delgadillo-López AE.; González-Ramírez CA.; Prieto-García F.; Villagómez-Ibarra JR.; Acevedo-Sandoval O. 2011. Phytoremediation: an alternative to eliminate pollution. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 597- 612.
- Delille D.; Coulon F.; Pelletier E. 2003. Biostimulation of natural microbial assemblages in oil-amended vegetated and desert sub-Antarctic soils. *Microbial Ecology*. 47:407-415.
- Dickson A.; Leaf AL.; Hosner IE. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *The Forest Chronicle*. 36:10-13.
- Dietz AC.; Jerald LS. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*. 109:163-168.
- El Fantroussi S.; Agathos SN. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation?. *Current Opinion in Microbiology*. 8:268–275.
- Etchevers BJ. 1988. Análisis químico de suelos y plantas. Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp 803.
- Farias V.; Maranhão T.; Carvalho de Vasconcelos E.; Lacerda GL.; Menegassi AJ.; Pandey A.; Soccol CR. 2008. Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Applied Biochemical Biotechnology*. 157:10-22.
- Ferrera-Cerrato R.; Alarcón A. 2007. Microbiología Agrícola. Hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico y planta microorganismo. Editorial Trillas, primera edición, México. pp. 90-119.
- Ferrera-Cerrato R.; Rojas AN.; Poggi-Valraldo M.; Alarcón A.; Cañizares-Villanueva R. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por

- hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48:179-187.
- Ferrera-Cerrato R.; Alarcón A.; Mendoza-Lopez MR.; Sangabriel W.; Trejo-Aguilar D.; Cruz-Sánchez S.; López-Ortiz C.; Delgadillo-Martínez J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo usando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica *Agrociencia*. 41:817-826.
- Finck, A. 1988. Fertilizantes y fertilización. Primera edición, editorial REVERTE S.A. Barcelona, España. pp 339-377.
- Gallego, JR.; Loredó J.; Llamas JF.; Vazquez F.; Sanchez, J. 2001. Bioremediation of diesel-contaminated soils: evaluation of potential *in situ* techniques by study of bacterial degradation. *Biodegradation* 12:325-335.
- Gao Y.; Li Q.; Ling W.; Zhu X. 2011. Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*. 185:703-709.
- Garbisu C.; Amézaga L.; Alkorta I. 2002. Biorremediación y Ecología. *Revista Ecosistemas*. 11:3-10.
- García-López E.; Zavala CJ.; Palma LD. 2006. Caracterización de las comunidades vegetales en un área afectada por derrames de hidrocarburo. *Terra Latinoamericana*. 24:17-26.
- Gentry TJ.; Rensing C.; Pepper IL. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 34:447-494.
- Gerdemann JW.; Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *British Mycological Society*. 46:235-244.

- Gómez G. 2004. Recuperación de espacios degradados. Editorial Mundi Prensa. Barcelona, España. pp. 191-241.
- Grant CD.; Campbell CJ.; Charnock NR. 2001. Selection of species suitable for derelict mine site rehabilitation in new South Wales, Australia. *Water, Air, and Soil Pollution*. 139: 215-235.
- Gutiérrez CC.; Zavala CJ. 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*. 20:101-111.
- Harrison MJ. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 50:361-389.
- Hedge RS.; Fletcher JS. 1996. Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*. 32:2471-2479.
- Hernández VI.; Mager D. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*. 15:149-155.
- Hernandez-Acosta E.; Ferrera-Cerrato R.; Gutiérrez-Castorena MC.; Rodríguez-Vázquez R.; Rubiños-Panta JE.; Fernández-Linares L. 2003. Bacterias y hongos hidrocarbonoclastas de rizósfera frijol y maíz, en un suelo contaminado con petróleo. *Terra Latinoamericana*. 21:493-502.
- Hernández-Ortega HA.; Alarcón A.; Ferrera-Cerrato R.; Zavaleta-Mancera HA.; López-Delgado HA.; Mendoza-Lopez MR. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*. 95:319-324.

- Hughes AK.; Bridge P.; Clark MS. 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Science of the Total Environment*. 372:539-548.
- Hutchinson SL.; Banks MK.; Schwab AP. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer. *Journal of Environmental Quality*. 30:395-403.
- Inckot CR., Olivera SG.; Bona C. 2011. Germination and development of *Mimosa pilulifera* in petroleum-contaminated soil and bioremediated soil. *Flora*. 206: 261-266.
- INE (Instituto Nacional de Ecología). 2007. Fuentes de contaminación en México. Consultado en Mayo del 2009. <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/html>.
- Jackson AM.; Whipps JM.; Lynch JM. 1991. Effects of temperature, pH and water potential on growth of four fungi with disease biocontrol potential. *World Journal Microbiology Biotechnology*. 7: 494-501.
- Jiménez BE. 2002. La contaminación ambiental en México. Editorial LIMUSA S.A. de C.V. Primera edición, pp. 641-650.
- Jiménez N.; Viñas M.; Byona JM.; Albaiges J.; Solanas AM. 2007. The Prestige oil spill: bacterial community dynamics during a field biostimulation assay. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77:935-945.
- Jing E.; Zhongzhi Z.; Youming S.; Wei H., Hongguang HF.; Hongguang S. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Petroleum Science*. 5:167-171.
- Juhasz, AL.; Naidu R. 2000. Bioremediation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons: a review of the microbial degradation of benzo[a]pyrene. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 45: 57-88.

- Kaimi, E.; Mukaidani T.; Tamaki M. 2007. Screening of twelve plant species for phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Plant Production Science*. 10:211-218.
- Kapustka L.; Reporter M. 1998. Terrestrial primary producer. En: Handbook of ecotoxicology. P. Calow (Eds.). Blackwell Science, Oxford, Vol. 1:280-294.
- Karamalidis AK.; Evangelou AC.; Karabika E.; Koukkou AI.; Drainas C.; Voudrias EA. 2010. Laboratory scale bioremediation of petroleum-contaminated soil by indigenous microorganisms and added *Pseudomonas aeruginosa* strain Spet. *Bioresource Technology*. 101: 6545-6552.
- Kechavarzi C.; Pettersson K.; Leeds-Harrison P.; Ritchie L.; Ledin S. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution*. 145:68-74.
- Keum YS.; Seo JS.; Hu Y.; Li QX. 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 93-941.
- Khalafallah A.; Abo-Ghalia H. 2008. Effect of arbuscular mycorrhizal fungi on the metabolic products and activity of antioxidant system in wheat plants subjected to short-term water stress, followed by recovery at different growth stages. *Journal of Applied Sciences Research*. 4:559-569.
- Kirk JL.; Moutoglis P.; Klironomos J.; Lee H.; Trevors JT. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant Soil*. 270: 23-30.
- Kisic I.; Mesic S.; Basic F.; Brkic V.; Mesic M.; Durn G.; Zgorelec Z.; Bertovic L. 2009. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma*. 149:209-216.

- Larenas PG.; L de Viana M. 2005. Germinación y supervivencia de pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecologia Austral*. 15:177-181.
- Latha P.; Anand T.; Prakasam V.; Jonathan EI.; Paramathma M.; Samiyappan R. 2011. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. *Applied Soil Ecology*. 49:215-223.
- Leyval C.; Joner E.; Del Val C.; Haselwandter K. 2001. Potential of arbuscular mycorrhiza for bioremediation. *Mycorrhiza*. 7: 308-317.
- Lin Q.; Mendelsohn IA. 2009. Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecological Engineering*. 35:85-91.
- Lin Q.; Menselsohn A.; Suidan MT.; Lee K.; Venosa AD. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin*. 44:897-902.
- Liu A.; Dalpé Y. 2009. Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation*. 11: 39-52.
- Liu SL.; Luo YM.; Cao ZH.; Wu LH.; Ding KQ.; Christie P. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*. 26: 285-293.
- López-Martínez S.; Gallegos-Martínez EM.; Pérez FL.; Gutiérrez RM. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 21: 91-105.

- Mancera-López M.; Esparza GF.; Chavez GB.; Rodríguez VR.; Saucedo CG.; Barrera CJ. 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 MV.; López FS. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas del suelo arcilloso. *Terra Latinoamericana*. 19:9-17.
- Mendez-Natera JR.; Roque C.; Zapata K.; Otahola-Gomez VA. 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*. 4:66-67.
- Menéndez-Vega D.; Gallego RJ.; Palaez A.; Fernández CG.; Montero J.; Muñoz D.; Sánchez J. 2007. Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. *European Journal of Soil Biology*. 43: 310-321.
- Merkel N.; Schultze-Kraft R.; Infante C. 2005. Phytoremediation in the tropics - the effect of crude oil on the growth on tropical plants. *Environmental Pollution*. 138: 86-91.
- Mills, SA.; Frankenberger Jr. WT. 1994. Evaluation of phosphorus sources promoting bioremediation of diesel fuel in soil. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. 53:280-284.
- Moezel PG.; Walton CS.; Perce GV.; Bell DT. 1989. Screening for salinity and waterlogging tolerance in five *Casuarina* species. *Landscape and Urban Planning*. 17:331-337.

- Mrozik A.; Piotrowska-Seget Z. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. *Research in Microbiology*. 165:363-375.
- Navarro GG.; Navarro BS. 2003. Química agrícola: El suelo y los elementos químicos para la vida. Segunda edición, Editorial Mundi-Prensa, Barcelona, España. pp. 15-34.
- Ndiaye P.; Mailly D.; Pineau M.; Margolis AH. 1993. Growth and yield of *Casuarina equisetifolia* plantations on the coastal sand dunes of Senegal as a function of microtopography. *Forest Ecology and Management*. 56:13-28.
- Nie L.; Shah S.; Rashid A.; Burd G.; Dixon GD.; Glick BR. 2002. Phytoremediation of arsenate contaminated soil by transgenic canola and the plant growth-promoting bacterium *Enterobacter cloacae* CAL2. *Plant Physiology and Biochemistry*. 40:355-361.
- Olaniran OA.; Pillay D.; Pillay B. 2006. Biostimulation and bioaugmentation enhances aerobic biodegradation of dichloroethenes. *Chemosphere*. 63:600-608.
- Ortiz HG.; Trejo-Calzada R.; Valdez-Cepeda RD.; Arreola-Ávila JG.; Flores HG.; López-Araiza B. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. *Revista Chapingo Serie Horticultura*.15:161-168.
- Ousley M.; Lynch J.; Whipps J. 1994. Potential of *Trichoderma* sp. as consistent plant growth stimulators. *Biology and Fertility of Soils*. 17:85-90.
- Palmroth MR.; Pichtel J.; Puhakka JA. 2002. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. *Bioresource Technology* 84:221-228.

- Pardo CJ.; Perdomo RC.; Benavides LM. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA*. 2: 44-49.
- Pawłowska TE.; Chaney RL.; Chin M. 2000. Effects of metal phytoextraction practices on the indigenous community of arbuscular mycorrhizal fungi at a metal contaminated landfill. *Applied Environmental Microbiology*. 6:2526-2530.
- Pedraza-Santos M.; Jaen CD.; Gutiérrez EA.; Colinas LT.; López PC. 2001. Crecimiento y nutrición de microplantas de Gerbera inoculadas con hongos micorrízicos arbusculares. *Agrociencia*. 35:149-158.
- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2009. (Anuario estadístico 2009). Consultada en Julio del 2009. ([http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario\\_a.pdf](http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario_a.pdf)).
- PEMEX (Petróleos Mexicanos). 2010. Anuario Estadístico 2010. Consultado el 14 de Junio del 2011. ([http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario\\_a.pdf](http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario_a.pdf)).
- Pernía B.; De Sousa A.; Reyes R.; Castillo M. 2008. Biomarcadores de contaminación por cadmio en las plantas. *Interciencia*. 33: 112-119.
- Peuke AD.; Rennenberg H. 2006. Heavy metal resistance and phytoremediation with transgenic trees. In: Tree transgenesis: recent developments. M. Fladung and D.E Wald (Eds.). Germany. pp.137-155.
- Phillips JM.; Hayman DS. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*. 55:158-161.
- Primo YE. 1996. Química orgánica y aplicada: de la molécula a la industria. Editorial Reverte S.A. Barcelona, España. pp. 113-140.

- Purushothaman A.; Meenatchi P.; Saravanan N. 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.
- Quiñones AE.; Ferrera-Cerrato R.; Gavi RF.; Linares FL.; Rodríguez VR.; Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*. 37:585-594.
- Redecker D. 2002. Molecular identification and phylogeny of arbuscular mycorrhizal fungi. *Plant Soil*. 244:67-73.
- Rentz AJ.; Chapman B.; Álvarez PJ.; Schnoor JL. 2003. Stimulation of hybrid poplar growth in petroleum-contaminated soils through oxygen addition and soil nutrient amendments. *International Journal of Phytoremediation*. 5:57-72.
- Reynoso-Cuevas L.; Gallegos-Martínez ME.; Cruz-Sosa F.; Gutiérrez-Rojas M. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology*. 99:6379-6385.
- Rivera-Cruz M.C.; Trujillo-Narcia A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29:369-376.
- Rivera-Cruz MC.; Ferrera-Cerrato R.; Sanchez-Garcia P; Volke-Haller V; Fernández-Linares L.; Rodriguez-Vazquez R. 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 MC.; Trujillo-Narcía A.; Miranda CM.; Maldonado CE. 2005. Evaluación toxicológica de suelo contaminado con petróleo nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30: 326-331.

- Salinas-Martínez A.; Santos-Córdova M.; Soto-Cruz O.; Delgado E.; Pérez-Andrade H.; Háuad-Marroquin LA.; Medrano-Roldan H. 2008. Development of a bioremediation process by biostimulation of native microbial consortium through the heap leaching technique. *Journal of Environmental Management*. 88:115-119.
- Sangabriel W.; Ferrera-Cerrato R.; Trejo AD.; Mendoza LR.; Cruz SS.; López OC.; Delgadillo MJ.; Alarcón A. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 22: 63-73.
- Saraswathy A.; Hallberg R. 2002. Degradation of pyrene by indigenous fungi from a former gasworks site. *FEMS Microbiology Letters*. 210: 227-232.
- SAS Institute Inc. 2009. The SAS system for windows, ver. 9.0 SAS Inc, Carolina, North Carolina. EUA.
- Sayler GS.; Ripp S. 2000. Field application of genetically engineered microorganisms for bioremediation processes. *Current Opinion in Biotechnology*. 11:286-289.
- Schoenmuth BW.; Pestemer W. 2004a. Dendroremediation of trinitrotoluene (TNT). Part 1: Literature overview and research concept. *Environmental Science Pollution Restoration International*. 11: 273-278.
- Schoenmuth BW.; Pestemer W. 2004b. Dendroremediation of trinitrotoluene (TNT). Part 2: Fate of radio-labelled TNT in trees. *Environmental Science and Pollution Research*. 11:331-339.
- Schwab AP.; Su J.; Wetzel S.; Pekarek S.; Banks MK. 1999. Extraction of petroleum hydrocarbons from soil by mechanical shaking. *Environmental Science and Technology*. 33:1940-1945.

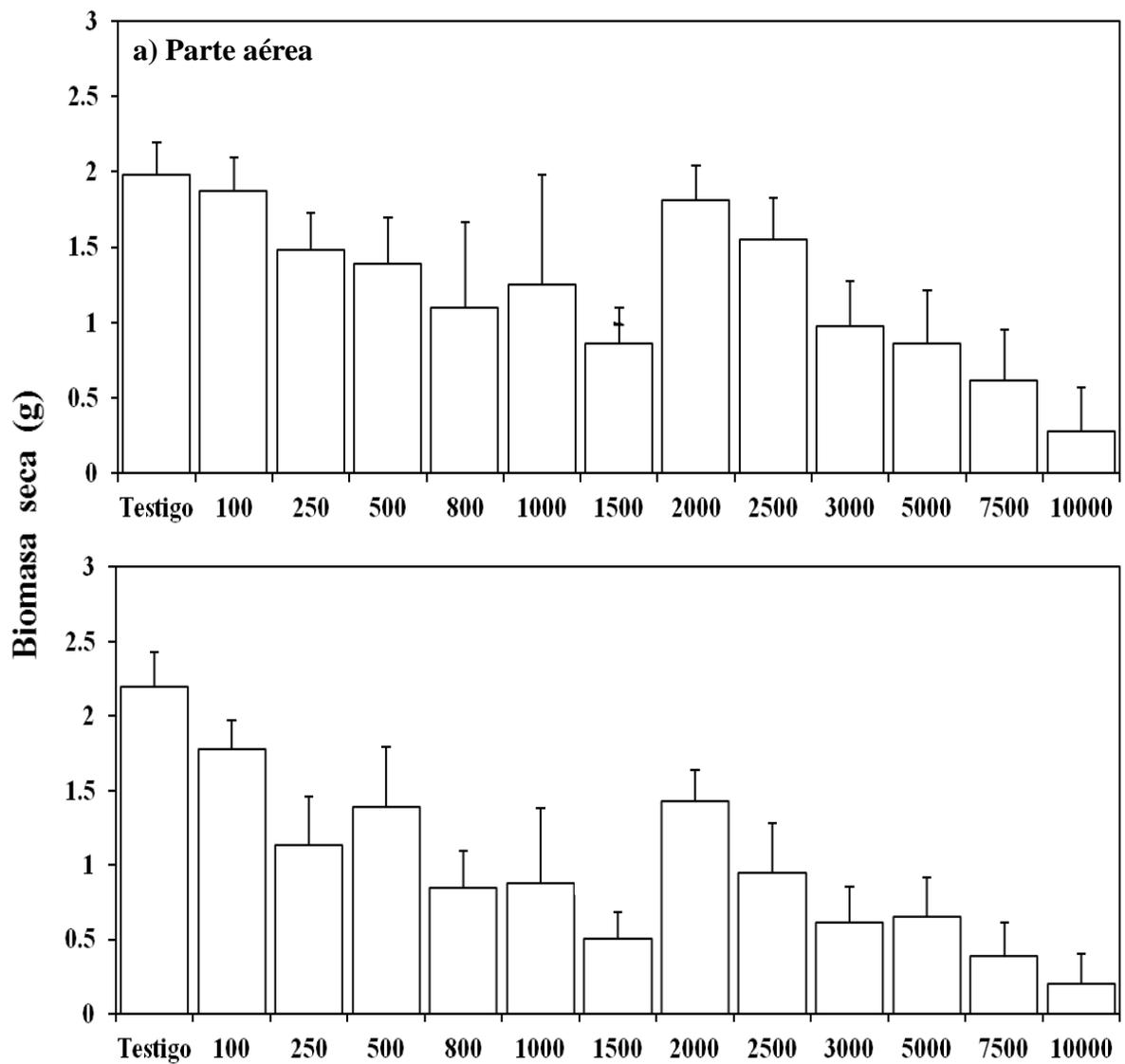
- Seklemova E.; Pavlova A.; Kovacheva K. 2001. Biostimulation based bioremediation of diesel fuel: field demonstration. *Biodegradation*. 12:311-316.
- SEMARNAT (Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales). 2010. Programa nacional de remediación de sitios contaminados. Consultada en Noviembre del 2011. <http://www.semarnat.gob.mx>.
- Serrano A.; Tejeda M.; Gallego M.; Gonzalez JL. 2009. Evaluation of soil biological activity after a diesel fuel spill. *Science of the Total Environment*. 407:4056-4061.
- Shanker AK.; Ravichandran V.; Pathmanabhan G. 2005. Phytoaccumulation of chromium by some multipurpose-tree seedlings. *Agroforestry Systems*. 64: 83-87.
- Sieverding E. 1986. El papel de las micorrizas en la agricultura. *Suelos Ecuatoriales* 16:52-59.
- SIIT (Sistema Integrado de Información Taxonómica). 2011. Ficha de la nomenclatura y taxonomía de *Casuarina equisetifolia*. Consultada en la base de datos de códigos taxonómicos (version 8.0), en el mes de Enero 2012. [http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxasource?p\\_source\\_id](http://siit.conabio.gob.mx/pls/itisca/taxasource?p_source_id).
- Silva SI.; Grossman M.; Durrant LR. 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2–7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63:224-229.
- Singh A.; Kuhad RC.; Shareefdeen Z.; Ward OP. 2004. Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes. In: *Biodegradation and bioremediation*. Singh A and O.P Ward (eds), Germany. pp. 279-304.
- Singh A.; Parmar N.; Kuhad RC.; Ward OP. 2011. Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol. *Soil Biology*. 28:1-23.

- Singh G.; Bhati M.; Rathod T. 2010. Use of tree seedlings for the phytoremediation of a municipal effluent used in dry areas of north-western India: Plant growth and nutrient uptake. *Ecological Engineering* 36:1299-1306.
- Sivasithamparam K.; Dixon KW.; Barrett RL. 2002. Microorganisms in plant conservation and biodiversity. Chapter 6. In: Microorganisms in plant conservation and biodiversity. Sivasithamparam K; Dixon KW; Barrett RL (eds). Netherlands. pp. 151-193.
- Smith MJ.; Flowers TH.; Duncan HJ.; Alder J. 2006. Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues. *Environmental Pollution*.141:519-525.
- Smith SE.; Read DJ. 1997. Mycorrhizal Symbiosis. Academic Press, San Diego and London. 605 pp.
- Stanley M. 2007. Introducción a la química ambiental. Editorial Reverte S.A. Barcelona, España. pp. 600-655.
- Stomp M.; Han H.; Wilbert S.; Gordon MP. 1993. Genetic improvement of tree species for remediation of hazardous wastes. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant*. 29:227-232.
- Sun WH.; Lo JB.; Robert FM.; Ray C.; Tang CS. 2004. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils I. Selection of promising woody plants. *Environmental Science and Pollution Research*. 11:260-266.
- Tamas K.; Gullner G. 2006. Dendroremediation: The use of trees in cleaning up polluted soils. In: Phytoremediation Rhizoremediation. Marcel H and Jozef A (eds). The Netherlands. pp. 23-31.

- Tamboli DP.; Kagalkar AN.; Jadhav MU.; Jajhav JP.; Govindward SP. 2010. Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium* sp. ATM generated after degradation of textile dye Direct Red 5B. *Bioresource Technology*. 101:2421-2427.
- Tang J.; Wang R.; Niu X.; Zhou Q. 2010. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil & Tillage Research*. 110:87-93.
- Tang M.; Chen H.; Huang JC.; Tian ZQ. 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biology & Biochemistry*. 41:936-940.
- Teng Y.; Luo Y.; Sun M.; Liu Z.; Li Z.; Christie P. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Bioresource Technology*. 101:3437-3443.
- Thompson LM.; Troeh FR. 2002. Los suelos y su fertilidad. Cuarta edición. Editorial REVERTE. España. pp 265-389.
- Ubochi KC.; Ibekwe VI.; Ezeji EU. 2006. Effect of inorganic fertilizer on microbial utilization of hydrocarbons on oil contaminated soil. *African Journal of Biotechnology*. 5:1584-1587.
- USEPA. 1996. Organic extraction and sample preparation. Method 3500B SW 846 Test methods for evaluating solid waste, physical/chemical methods. Consultada en Octubre 2011. <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs>.

- Valdés M.; Cayetano RA.; Leyva MA.; Camacho AD. 2004. Promoción del crecimiento en vivero de *Casuarina equisetifolia* (L.) por microorganismos simbios. *Terra Latinoamericana*. 22:207-215.
- Vallejo V.; Salgado L.; Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHS en suelos contaminados con petróleo. *Revista Colombiana de Biotecnología*. 7:67-78.
- Vasanthakrishna M.; Bagyaraj DJ.; Nirmalnath PJ. 1994. Responses of *Casuarina equisetifolia* to inoculation with *Glomus fasciculatum* and/or *Frankia*. *Forest Ecology and Management*. 68:399-402.
- Vázquez L.; Pérez NO.; Valdés M. 2000. Isolation and symbiotic characteristics of Mexican *Frankia* strains associated with *Casuarina*. *Applied Soil Ecology*. 14:249-255.
- Vázquez-Luna D.; Castela-Estrada M.; Rivera-Cruz M.C.; Ortiz-Ceballos A.; Izquierdo RF. 2010. *Crotalaria inca* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): Especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26:183-191.
- Verdin A.; Hadj Sahraoui S.; Fontaine A.; Grandmougin-Ferjani J. 2006. Effect of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*. 16:397-405.
- Villaseñor AJ.; Rutiaga QJ. 2000. La madera de *Casuarina equisetifolia* L. química e índices de calidad de pulpa. *Madera y Bosques*. 6:29-40.
- Volante A.; Lingua G.; Cesaro P.; Cresta A.; Puppo M.; Ariati L.; Berta G. 2005. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza*. 16:43-50.

- Volke ST.; Velasco T. 2002. Tecnologías de remediación para suelos contaminados. Editorial, Instituto de Ecología, México, D.F. pp. 12-47.
- Volke ST.; Velasco TJ.; De la Rosa PD. 2005. Suelos contaminados por metales y metaloides: muestreo y alternativas para su remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología. pp.50-80.
- Wang J.; Zhang Z.; Su Y.; He W.; He F.; Song H. 2008. Phytoremediation of petroleum polluted soil. *Petroleum Science*. 5:167-171.
- Wevar AL.; Agostini E.; Talano MA.; Capozucca C.; Milrad S.; Tigier HA.; Medina MI. 2005. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Science*. 169:1102-1111.
- Wu QS.; Xia RX. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi influence growth, osmotic adjustment and photosynthesis of citrus under well-watered and water stress conditions. *Journal of Plant Physiology*. 163: 417-425.
- Zhang J.; Cai L.; Yuan D.; Chen M. 2004. Distribution and sources of polynuclear aromatic hydrocarbons in mangrove superficial sediments of Deep Bay, China. *Marine Pollution Bulletin*. 49:479-486.
- Zhang K.; Hua X.; Han H.; Wang J.; Miao C.; Xu Y.; Huang Z.; Zhang H.; Yang J.; Jin W.; Liu Y.; Lui Z. 2008. Enhanced bioaugmentation of petroleum and salt contaminated soil using wheat straw. *Chemosphere*. 73:1387-1392.
- Zhong C.; Zhang Y.; Chen Y.; Jiang Q.; Chen Z.; Liang J.; Pinyopusarerk K.; Franche C.; Bogusz D. 2010. *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis*. 50:107-114.



## APÉNDICE

**Apéndice 1.** Altura de planta y longitud radical de *Casuarina equisetifolia* establecida en suelo contaminado con 15 concentraciones de diesel (mg kg<sup>-1</sup>), después de 25 días. n=10. Medias ± error estándar.

## Apéndice 2. Características del fertilizante Triple 17.

### Complejo Triple 17

El fertilizante Complejo 17-17-17 (Triple 17) es un fertilizante de alto valor, por su eficiencia en la aplicación, además de que dado su balance químico de los tres macronutrientes primarios, es una fórmula de fertilización que permite un mejor aprovechamiento de los nutrimentos por las plantas. Es una fórmula de fertilización completa, lo cual hace muy apreciada por los agricultores.

Nombre químico: No aplica

Otros Nombres: Triple 17 complejo, complejo triple 17 y T17

Fórmula química: No aplica

Peso Molecular (g/mol): No aplica

Contenido de Nitrógeno Total (N): 17% de Nitrógeno (w/w)

-Nitrógeno amoniacal 9.5% (w/w)

-Nitrógeno Nítrico 6.5%(w/W)

Contenido de Fósforo Total (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>): 17% de Pentóxido de Fósforo (w/w)

-Fósforo disponible 17% de Pentóxido de Fósforo (w/w)

-Fósforo soluble en Agua 11% de Pentóxido de Fósforo (w/w)

Contenido de Potasio (K<sub>2</sub>O) 17%

Presentación Física gránulos esféricos de color rosáceo o café claro

Tamaño de partícula 2.0 a 5.00 mm

pH en solución al 10%: 6.5-7.5 Unidades

Densidad aparente 970-1,140 Kg/cm<sup>3</sup>

Humedad relativa crítica (a 30°C): 72%

Acidez equivalente a Carbonato de Calcio Neutro

Solubilidad en agua a 20°C 34.7 g/100 mL de agua

## Floranid Permanent 16-7-15+ (2MgO) + (9S)+ME

Floranid® Permanent es un fertilizante de liberación lenta que contiene macro y microelementos en cada uno de los gránulos. Posee la exclusiva molécula Isodur® (IBDU), de liberación lenta de nitrógeno durante tres meses, lo que asegura una nutrición prolongada.

### Composición química

Grado equivalente: 16-7-15 + (2 MgO) + (9 S) + ME Tamaño del grano (mm): 0,7-2,8	
Nitrógeno total (N)	16%
Nítrico	2,1%
Amoniacal	7,9%
IBDU	6%
Fósforo (P2O5)	7%
Potasio (K2O)	15%
Magnesio (MgO)	2%
Azufre (SO3)	22%
Hierro (Fe)	0,5%
Boro (B)	0,01%
Cobre (Cu)	0,002%
Manganeso (Mn)	0,01%
Zinc (Zn)	0,002%
<b>ME: microelementos</b>	

#### Dosis recomendada :

30 a 50 g/m<sup>2</sup>

#### Características físicas

Granulometría: 0,7 a 2,8 mm

Granulos de color rojo - café

#### Presentación:

Saco de 25 kg (pallet de 1000 kg)

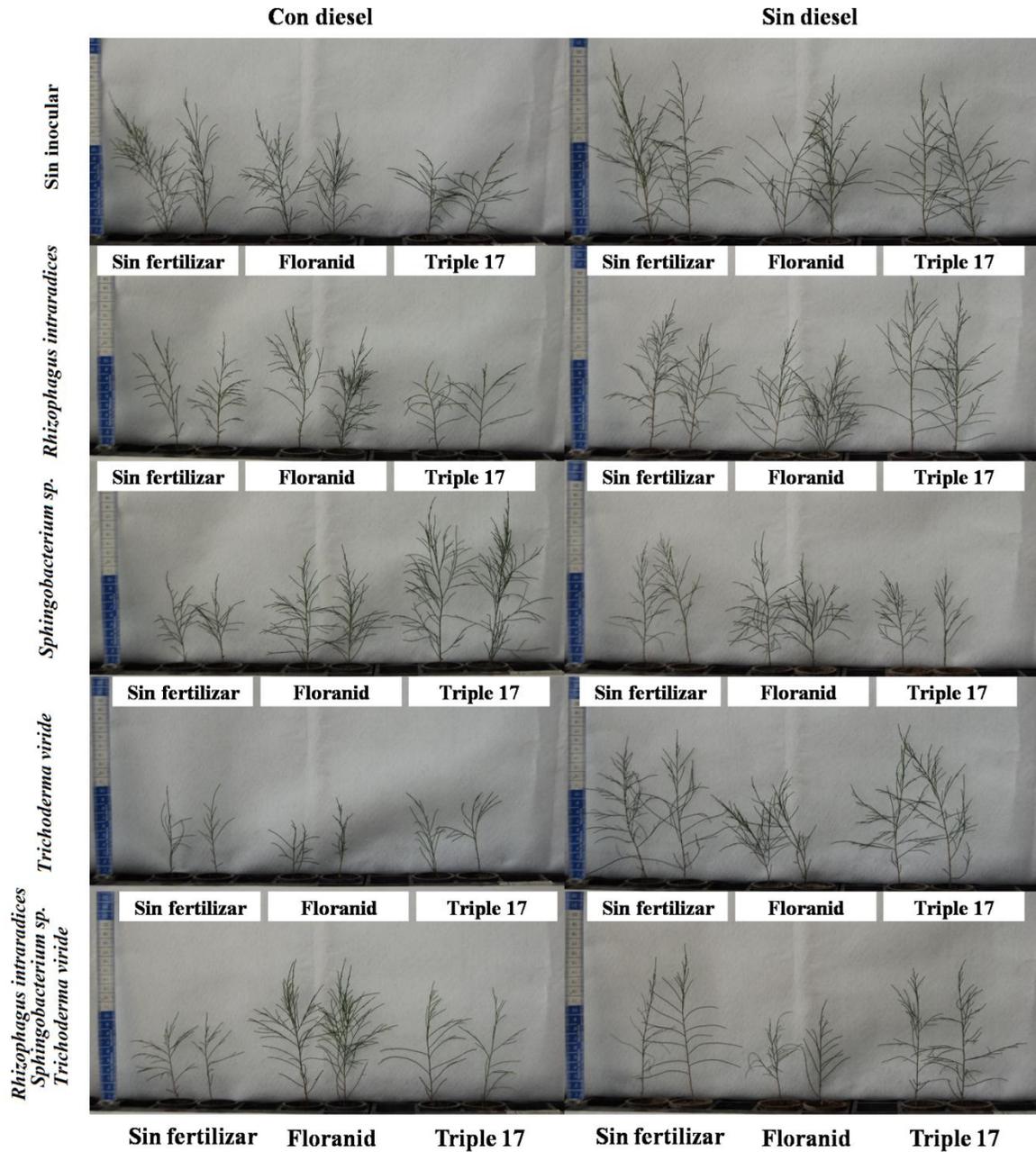
### Recomendaciones de uso para mezcla con sustrato

Condiciones de T° y pH	(g/10 l)
Altas temperaturas y sustratos ácidos	10
Temperaturas medias y sustratos neutros	15

### Recomendaciones de uso

Cultivo	Dosis	Momento de aplicación
1er año árbol joven	100 g/árbol	Dividir la dosis en 2, 1ª en etapa de desarrollo y 2ª postcosecha.
2do año árbol joven	200 g/árbol	Dividir la dosis en 2, 1ª en etapa de desarrollo y 2ª postcosecha.
3er año árbol joven	300 g/árbol	Dividir la dosis en 2, 1ª en etapa de desarrollo y 2ª postcosecha.
Hortalizas (base antes de fertirrigación)	25 a 40 kg/1000 m <sup>2</sup>	2 a 3 aplicaciones/año.
Viveros	30 a 50 kg/1000 m <sup>2</sup>	
Céspedes	20 a 40 kg/1000 m <sup>2</sup>	2 a 3 aplicaciones/año.

**Apéndice 3.** Características físicas y químicas del fertilizante Floranid.



**Apéndice 4.** Altura de plantas de *Casuarina equisetifolia* después de 120 expuestas a suelo contaminado con diesel e inoculada con microorganismos rizosféricos y aplicación de fertilizantes inorgánicos.

Factor	Nivel	Altura (cm)	Biomasa seca total (g)	ICP
Contaminación	0 mg kg <sup>-1</sup>	16.4545 a	0.101795 a	0.00168151 a
	5000 mg kg <sup>-1</sup>	14.8007 b	0.086025 b	0.00154315 a
Fertilización	Sin fertilizar	15.1371 a	0.083274 b	0.00146704 b
	Floranid	15.8525 a	0.113712 a	0.00188478 a
	Triple 17	15.5895 a	0.083286 b	0.0014811 b
Inoculación	Sin inocular	16.0283 a	0.099342 a	0.0016889 a
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	14.651 b	0.08692 a	0.0015843 a
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	16.1712 a	0.097865 a	0.0016286 a
	<i>Trichoderma viride</i>	15.3388 ab	0.09169 a	0.0016118 a
	RI + S + T	15.338 ab	0.087824 a	0.001495 a
Contaminación		**	NS	NS
Inoculación		*	NS	NS
Fertilización		NS	*	**
Contaminación-Inoculación		**	**	*
Contaminación-Fertilización		NS	**	*
Inoculación-Fertilización		**	*	**
Contaminación- Inoculación-Fertilización		**	*	*

\* Significativo al 0.05

\*\* Significativo al 0.001

NS= No significativo

**Apéndice 5.** Efecto de los factores sobre las variables evaluadas. Letras desiguales presentan diferencias estadísticas. Abreviaciones: S = *Sphingobacterium* sp, RI = *Rhizophagus intraradices*, T = *Trichoderma* CP4.

Factor	Nivel	Número de acículas	Nitrógeno en planta %	UFC g <sup>-1</sup> en suelo seco de <i>Sphingobacterium</i> sp.	UFC g <sup>-1</sup> en suelo seco de <i>Trichoderma viride</i>
Contaminación	0 mg kg <sup>-1</sup>	58.282 a	2.65333 a	36183125 a	28878 a
	5000 mg kg <sup>-1</sup>	49.462 a	2.49733 a	24866412 a	28167 a
Fertilización	Sin fertilizar	48.843 b	2.4025 a	29559900 a	
	Floranid	65.863 a	2.911 a	35471818 a	27933 b
	Triple 17	46.128 b	2.4125 b	26322500 a	29675 a
Inoculación	Sin inocular	55.019 ab	2.7258 a		27958 b
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	54.255 abc	2.5367 ab		
	<i>Sphingobacterium</i> sp.	59.577 a	2.7233 a	24837267 a	
	<i>Trichoderma viride</i>	46.041 bc	2.5925 ab		29361 a
	RI + S + T	50.92 c	2.2983 b	34950000 a	27683 a
Contaminación		*	NS	NS	NS
Inoculación		*	*	NS	NS
Fertilización		**	*	NS	NS
Contaminación-Inoculación		**	NS	NS	**
Contaminación-Fertilización		**	NS	NS	NS
Inoculación-Fertilización		**	NS	NS	NS
Contaminación-Inoculación-Fertilización		*	NS	NS	NS

\* Significativo al 0.05

\*\* Significativo al 0.001

NS= No significativo

**Apéndice 6.** Efecto de los factores sobre las variables evaluadas. Letras desiguales presentan diferencias estadísticas. Abreviaciones: S = *Sphingobacterium* sp, RI = *Rhizophagus intraradices*, T = *Trichoderma* CP4.

Factor	Nivel	Colonización micorrízica (%)		
		Hifas	Vesículas	Arbúsculos
Contaminación	0 mg kg <sup>-1</sup>	54.676 a	29.236 a	14.028 a
	5000 mg kg <sup>-1</sup>	28.333 b	3.588 b	0.208 a
Fertilización	Sin fertilizar	58.542 a	18.958 b	11.458 a
	Floranid	16.042 b	1.319 c	0.521 b
	Triple 17	49.931 a	28.958 a	9.375 a
Inoculación	Sin inocular			
	<i>Rhizophagus intraradices</i>	42.94 a	11.944 a	6.181 a
	<i>Sphingobacterium</i> sp.			
	Trichoderma viride			
	RI + S + T	40.069 a	20.88 a	8.056 a
Contaminación		**	**	**
Inoculación		NS	*	NS
Fertilización		**	**	*
Contaminación-Inoculación		NS	*	NS
Contaminación-Fertilización		**	**	*
Inoculación-Fertilización		*	NS	NS
Contaminación- Inoculación Fertilización		*	NS	NS

\* Significativo al 0.05

\*\* Significativo al 0.001

NS= No significativo

**Apéndice 7.** Efecto de los factores sobre las variables evaluadas. Letras desiguales presentan diferencias estadísticas. Abreviaciones: S = *Sphingobacterium* sp, RI = *Rhizophagus intraradices*, T = *Trichoderma* CP4.