



---

**Universidad Michoacana de San  
Nicolás de Hidalgo**



Facultad de Químico Farmacobiología

**T e s i s**

**Biorremediación de un suelo contaminado con gasolina 10,000 ppm por  
bioestimulación con extracto fúngico crudo, lombricomposta y  
Fitorremediación con *Zea mays* L y *Azotobacter vinelandii*.**

Presenta:

**Gabriela Benítez Rocha**

Para obtener el título de:

**Química Farmacobióloga**

Asesor:

**Doctor en ciencias, especialidad en Microbiología**

**Juan Manuel Sánchez-Yáñez**

Morelia, Michoacán

Diciembre 2014

## **Dedicatoria:**

### **A Dios.**

Por ser mi razón de ser y de vivir; por regalarme esta hermosa añadidura que me llena de gran satisfacción, y sobre todo de reconocimiento a Él por darme esta bendición.

### **A mis Padres.**

**Misael Benítez Arroyo y Paula Rocha Rojas.** Por su valioso ejemplo pues me han enseñado no solo amar a Dios, sino lo que Soy y lo que tengo, sin sus consejos, sus oraciones, su amor, y comprensión, este sueño que ha sido el de ellos también por estos 5 años no hubiera sido posible.

### **A mis hermanos.**

Joel, Pedro, Gersón, Mara y Valeria. Por toda una vida compartida de peleas, risas, llanto, diversión, aventuras, por ser un apoyo incondicional en este sueño, porque cualquier momento a su lado lo hacen el mejor de todos.

### **A mis Abuelos**

Pedro Benítez, Justina Arroyo y Belem Rojas. Por ser mí ejemplo, motivación y admiración.

### **A mis Rocha's:**

Johana, Elizabeth, Liz, Dana, Endy, Mario, Victor, Kevin. Por enseñarme a valorar todo lo que tengo, por estar siempre para mí sin importar hora, día o momento, por enseñarme que en familia todo es mejor.

### **A mis Benítez:**

Febe, Esther, Any, Indira, Josué, Jonathán, Betuel, Yinh, Nati, Gustavo, Rubén, y Junior. Por el amor, cariño y apoyo que me han brindado para lograr este sueño, por llenar mis días de alegría y enseñarme que juntos se puede todo.

### **A mis niños:**

Gael, Dan, Zahir, Jesse, Diana, Jhara, Genda, Ariel, Gabriel, Jaziel, Neptalí, Iris, Jasiel. Por ser una motivación esencial en mi vida, por hacer más divertidos y alegres mis días

### **A la IDD Morelia**

FJC, Hnos. Encarnación, Manuel, Mauricio, Miguel .Hnas. Edith, Erika, Irma, Celina, Rosa. Por ser una familia que ha hecho mi estancia en esta ciudad más llevadera, por su apoyo, cariño y amor incondicional

### **A mis amigos y hnos.:**

Ciao, Julio, Jeremy, Pepe, Leo, David, Job, Sergio, Abiel, Alejandra, Sari, Gaby, Nancy, Liz, Sara, Abi, Eli, Fanny, Bere, Elda. Por haber marcado en su tiempo un instante de mi vida, haciendo más ligero este camino, con un abrazo, una sonrisa, una palabra, una aventura; brindándome, amistad, cariño y apoyo sincero para no desmayar y continuar hasta el final.

### **A mis amigos de la Facultad:**

J. Alberto, Ale, Any, Karla, Keren, Edith, Azucena. Por haber hecho este viaje más entrañable, lleno de aventuras, risas, estrés, estudio y trabajo

### **A mis amigos del Laboratorio de Microbiologías Ambiental:**

Vanesa, Pedro, Martha, Yatziri, Anabell, Angel, Samantha, Jenifer, Karla, Gladys, Yunuen, Celeste, Eduardo, Ivan, Carlos, Ulises, Eliseo. Por la familia y amistad que cultivamos, por ser excelentes compañeros de trabajo, y cómplices de todo, mi estancia en el LMA no hubiese sido llevadera sin ustedes.

### **A mi asesor de tesis**

Dr. Juan Manuel Sánchez-Yáñez. Por su paciencia y tiempo dedicado a esta investigación, por el conocimiento transmitido a mi persona para mi formación profesional.

Con Cariño sincero

**Gabriela Benítez Rocha**

## **Agradecimientos**

Al proyecto 2.7 (2014) de la Coordinación de Investigación Científica de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.

Al Dr. Juan Manuel Sánchez Yáñez por dirigir este trabajo, por su entera disposición y tiempo.

A los integrantes del Comité Tutorial: I.Q. José Guadalupe Ricardo Martínez Molina, M.C. Diana Cecilia Maya Cortés, M.F.B. Sara Eliet Urrutia Hernández, Q.F.B. Elvira Ramos López y Q.F.B. José de Jesús Villagómez Rangel por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

## RECONOCIMIENTO



**Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo  
Coordinación de la Investigación Científica  
Instituto de Investigaciones Químico Biológicas  
Laboratorio de Microbiología Ambiental**

Esta investigación fue financiada por el proyecto 2.7 (2014) de la Coordinación de la Investigación Científica perteneciente a la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en el Laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, bajo la dirección del **D.C. Juan Manuel Sánchez-Yáñez**.



“Tesis apoyada por el Consejo Estatal de Ciencia, Tecnología e innovación del Estado de Michoacán” con folio: 1058

## ACRÓNIMOS

1	AP	Altura de la planta
2	ABDGAS	Agar para bacterias degradadoras de gasolina
3	AHDGAS	Agar para hongos degradadores de gasolina
4	BaP	Benzo (a) pireno
5	BPCV	Bacterias promotoras del crecimiento vegetal
6	BS	Bioestimulación
7	BR	Biorremediación
8	CN	Control negativo
9	CR	Control relativo
10	DDS	Días después de la siembra
11	EFC	Extracto fúngico crudo
12	FR	Fitorremediación
13	HC	Hidrocarburos
14	HML	Hongos mitospóricos ligninolíticos
15	HTP	Hidrocarburos totales del petróleo
16	HPA	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
17	LiP	Lignino peroxidasa
18	LC	Lombricomposta
19	LR	Longitud radicular
20	GAS	Gasolina
21	MnP	Manganeso peroxidasa
22	MI	Mineralización
23	PFA	Peso fresco aéreo

24	PFAT	Peso fresco aéreo total
25	PFR	Peso fresco radical
26	PFRT	Peso fresco radical total
27	PSA	Peso seco aéreo
28	PSAT	Peso seco aéreo total
29	PSR	Peso seco radical
30	PSRT	Peso seco radical total
31	SM	Solución mineral



## RESUMEN

La Gasolina (GAS) es una mezcla de hidrocarburos (HC) alifáticos y aromáticos, en suelo afecta su fertilidad. Una solución es biorremediación (BR) vía bioestimulación (BS) con extracto fúngico crudo (EFC) con enzimas que rompen aromáticos y lombricomposta (LC) que enriquece con minerales, para reducir la concentración de la GAS y concluir con fitorremediación (FR) con *Zea mays* L, potenciada con *Azotobacter vinelandii* degradador de HC. Los objetivos de esta investigación fueron: a) biorremediación de un suelo contaminado con GAS a 10,000 ppm con EFC y LC, b) fitorremediación para la eliminación de GAS remanente con *Z. mays/A. vinelandii*. Con las variables respuestas: germinación en (%); fenotipia: altura planta/longitud de raíz y biomasa: peso fresco y seco total aéreo/radical (PFAT/PFAT y PSAT/PSRT) a plántula, floración, y aislamiento y cuantificación de bacterias degradadoras de GAS. Los datos experimentales fueron analizados por Tukey. Los resultados mostraron que la BS de suelo con 10, 000 ppm de GAS por LC a 60,000 ppm redujo la GAS, pues la FR del suelo para la GAS remanente con *Z. mays/A.vinelandii* mostro un 40.81g de PFAT, un 19.22g de PFRT, un 5.79 de PSAT y un PSRT y 2.59g valores estadísticamente significativos comparado con *Z. mayz* en suelo sin contaminar con GAS, con un PFAT de 39.25g, PFRT de 18.73g, PSAT 4.44g y PSRT 2.07g. lo anterior indica que la BR de suelo contaminado con GAS por BS con LC a 60,000 ppm en continuación de su FR del mismo suelo para eliminar la GAS remanente con *Z. mays /A.vineladii* es una estrategia conveniente para su biorestauración.

**Palabras Clave:** mineralización, mezcla hidrocarburos, efecto rizosfera.

## ABSTRACT

Gasoline (GAS) is a mixture of aliphatic and aromatic hydrocarbons (HC), polluting soil affects its fertility. An alternative solution is bioremediation (BR) by biostimulation (BS) applying to soil crude fungal extract (CFE) which contents aromatics hydrolytic enzymes and vermicompost (VC) enriching with minerals to reduce the concentration of GAS and completing the cleaning processing by phytoremediation (PR) sowing *Zea mays* inoculated with *Azotobacter vinelandii* capable to degrade HC from GAS. The objectives for this research were: a) bioremediation of contaminated soil by GAS at 10,000 ppm to apply CFE and VC, and b) phytoremediation for eliminating GAS remaining GAS by sowing *Z. mays/A. vinelandii*. The variable responses of this trial were: germination per cent (%); phenotype: plant's height/ root length and biomass: fresh and dry aerial/radical total weight (FATW/DATW and FRTW/DRTW) at seedling, flowering stage's plant, and density of GAS degrading bacteria. Experimental data were analyzed by Tukey test. Results showed that soil polluted by 10,000 ppm GAS applying CFE/ VC at 60,000 ppm reduced GAS concentration, then FR used for remaining GAS by sowing *Z. mays/A. vinelandii* showed 40.81 g of FATW, 19.22 g of FRTW, 5.79 DATW and 2.59 g DRTW those values were statistically significant compared to uninoculated *Z. mays* sowing in uncontaminated soil with 39.25g FATW, 18,73g FRTW, 4.44g DATW and 2.07g DRTW. These results indicates that BR of contaminated soil GAS applying BS by VC following by sowing *Z. mays/ A. vinelandii* were convenient strategy for its biorestitution.

Key words: mineralization, hydrocarbon mixture, rhizosphere effect

## ÍNDICE

1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	4
3. Hipótesis .....	8
4. Objetivos .....	8
5. Materiales y métodos .....	8
5.1 Preparación de jarras de Leonard .....	9
5.2. Biorremediación por bioestimulación con extracto fúngico crudo .....	9
5.3. Biorremediación por bioestimulación con lombricomposta.....	10
5.4. Diseño experimental.....	11
5.5. Cultivo de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	11
5.6. Fitorremediación con <i>Z. mays</i> .....	12
5.6.1. Desinfección de las semillas de <i>Z. mays</i> .....	12
5.6.2. Inoculación de <i>Z. mays</i> con <i>A. vinelandii</i> .....	12
5.6.3. Siembra de semillas de <i>Z. mays</i> en suelo contaminado con gasolina remanente. ..	12
5.6.4. Solución mineral para plantas. ....	13
5.6.5. Parámetro de las variables respuesta del <i>Z. mays</i> .....	13
6. Perfil de antibióticos para prueba de sensibilidad.....	14
6.1. Recuperación de <i>Azotobacter</i> de raíz de <i>Z. mays</i> .....	14
6.2. Prueba de sensibilidad a antibióticos:.....	15
7. Aislamiento de microorganismos degradadores de gasolina de suelo contaminado sometido a biorremediación.....	15
7.1. Cuantificación de microorganismos degradadoras de GAS.....	16
7.2. Técnica para cuantificación de BDGAS y HDGAS.....	17
7.3 Análisis estadístico de resultados. ....	18
8. Discusión y Resultados .....	19
9. Conclusión .....	39
10. Literatura citada .....	40

## Índice de Cuadros

Cuadro 1 Biorremediación de un suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina por bioestimulación con extracto fúngico, lombricomposta a 30,000 ppm y 60,000 ppm, y su posterior fitorremediación con <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter</i> .....	11
Cuadro 2. Efecto de la biorremediación por bioestimulación con extracto fúngico crudo y lombricomposta de un suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina en el porcentaje de germinación de <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	19
Cuadro 3. Fenotipia del <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter vinelandii</i> sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de plántula .....	21
Cuadro 4. Biomasa del <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter vinelandii</i> sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de plántula .....	23
Cuadro 5. Fenotipia del <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter vinelandii</i> sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de floración.....	26
Cuadro 6. Biomasa del <i>Zea mays</i> inoculado con <i>Azotobacter vinelandii</i> sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de floración.....	29
Cuadro 7. Patrón de perfil de sensibilidad de <i>Azotobacter vinelandii</i> para su detección en la rizosfera de <i>Zea mays</i> en la fitorremediación del suelo contaminado con el remanente de la gasolina.....	32
Cuadro 8. Densidad de la población bacteriana degradadora de gasolina de suelo contaminado con 10,000 ppm, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm.....	33
Cuadro 9. Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas de suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm.....	35

Cuadro 10. Formas microscópicas observadas con tinción Gram de las bacterias oxidantes de gasolina presentes en el suelo contaminado con 10,000 ppm de esta mezcla y biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm.....36

Cuadro 11. Morfología macroscópica dominante de las colonias bacterianas oxidantes de gasolina cuantificadas en suelo contaminado con 10,000 ppm de esta mezcla, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60.000 ppm.....37

Cuadro 12. Densidad de la población fúngica degradadora de gasolina de suelo biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm .....38

## 1. Introducción

Los derrames de hidrocarburos (HC) como la gasolina (GAS) constituyen una de las principales fuentes de contaminación, afecta negativamente los suelos, aguas superficiales y subterráneas, flora y fauna silvestre (IMT, 2004). La creciente contaminación del suelo por HC de la GAS es un problema económico ambiental a nivel mundial (Rahman *et al.*, 2003; citado por Vallejo *et al.*, 2005), este es mayor por derrames accidentales de GAS, así como por maquinaria industrial y agrícola, que usan la GAS como combustible, pero que después de su uso no recibe una disposición adecuada a pesar de lo establecido por la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente (LGEEPA, 2001).

La GAS es un combustible constituido por una mezcla de HC alifáticos y aromáticos, se obtiene por destilación del petróleo crudo. Los derrames accidentales de la GAS son altamente riesgosos en todos los casos, debido a que no siempre es posible controlarlos inmediatamente y a que representan un elevado potencial destructivo para el medio ambiente. Cuando la GAS se derrama en suelo, afecta su fertilidad, impide el intercambio gaseoso, y altera los ciclos biogeoquímicos que sustentan la vida (Pardo *et al.*, 2004).

En México la contaminación con GAS es un problema en incremento, en Puebla en 2005, ocurrió un derrame de más de 10 mil litros de GAS de un ducto de PEMEX, que afectó la vida de comunidades y generó un daño ambiental de difícil corrección. En Michoacán, en 2012, Personal de Mantenimiento Salamanca de PEMEX refinería, reportó un incendio y derrame de GAS PEMEX Magna derivado de una toma clandestina (PEMEX, 2012). En los Estados de México, Veracruz y Tabasco también han tenido el problema de derrames de GAS en suelo en más de una ocasión, es por ello que urge una acción correctiva y su recuperación.

Para descontaminar un suelo impactado por HC es necesaria la aplicación secuencial de métodos físicos, químicos y biológicos.

1) Físicos: lavado de suelo y remoción mecánica para eliminar el excedente de HC (Sánchez-Yáñez, 2008).

2) Químicos: son aplicados una vez eliminado el exceso de HC (métodos físicos), tales como la hidrólisis, precipitación, y reacciones de óxido-reducción (Delgadillo-López *et al.*, 2011)

3) Biológicos: se aplican una vez eliminado por completo el exceso de HC, pues son la estrategia de biorrestauración final de un suelo contaminado, la cual aprovecha la capacidad metabólica de la microbiota para mineralizar los HC (Sánchez-Yáñez, 2008)

En los últimos años se aplican tecnologías basadas en el empleo de organismos vivos para descontaminar el ambiente, métodos biológicos como la biorremediación (BR) son la estrategia de restauración final de un suelo contaminado cuando la concentración de GAS fluctúa de leve a moderada, con valores de 1 al 3.5% (Asquith *et al.*, 2012). Algunas formas de BR como bioestimulación (BS) de suelo impactado con GAS consiste en incorporar nutrientes esenciales a base de minerales como el nitrógeno (N), fósforo (P) y potasio (K), para inducir la actividad de la microbiota nativa de ese suelo a la mineralización (MI) de los HC de la GAS (Vidali, 2001) al respecto Vallejo *et al.*, (2005), realizaron la BS de un suelo contaminado con 20,000 mg de hidrocarburos totales de petróleo/Kg de peso seco de suelo durante un periodo de 125 días con nutrientes (N y P) en forma de sales inorgánicas simples y un fertilizante inorgánico compuesto y lo compararon con la respuesta de MI de un suelo contaminado sin BS (control), los resultados mostraron que la BS eliminó un 41% de los HTP y en el suelo control un 39%. Fernández *et al.*, (2008) rehabilitaron un suelo contaminado por HC de petróleo crudo al 10% mediante BR vía BS con una solución mineral (SM) y surfactante. El resultado mostró que la

BR eliminó un 61% de esos HC, comparado con el suelo control no BS donde hubo nula eliminación.

La fitorremediación (FR) es una variación de las técnicas de BR (Hernández-Valencia y Mager 2003), se sustenta en el uso de plantas y los microorganismos asociados a sus sistemas radicales (Torres y Zuluaga, 2009), dirigida a limpiar suelos contaminados con HC como la GAS (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010). Se ha evaluado el efecto de ciertas plantas y la asociación rizosférica en la degradación de hidrocarburos del petróleo, al respecto Hernández-Valencia y Mager (2003) reportaron la FR de un suelo contaminado con crudo ligero al 3%, con *Panicum máximum* L, que lo redujo al 63%, mientras que *Brachiaria brizantha* L en un 55%. Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006, biorestauraron mediante FR un suelo contaminado con combustóleo al 5% con *Phaseolus coccineus* al que eliminaron en la rizósfera de ambas plantas en 90 días.

La BR y FR de un suelo contaminado con GAS, son estrategias que se han estudiado de forma independiente, sin embargo de acuerdo con lo reportado en la literatura cada una requiere un tiempo prolongado para eliminar la GAS a un nivel igual o inferior a los límites permisibles por la NOM-EM-138-ECOL-2002. La presente investigación propone una alternativa de biorrestauración para acelerar la mineralización de la GAS en el suelo, con la interacción de ambas estrategias: BR por BS con extracto fúngico crudo (EFC) para la eliminación de los Hidrocarburos policíclicos aromaticos (HPA) recalcitrantes de la GAS, una opción para su hidrólisis parcial son la aplicación de enzimas extracelulares de hongos mitospóricos ligninolíticos (HML), como *Penicillium chrysogenum.*, *Aspergillus tubingensis*, *A.fumigatus* y *fusarium thapsinum* , que sintetizan: a) manganeso peroxidasa (MnP) que hidroliza fenol por oxidación de  $Mn^{2+}$  a  $Mn^{3+}$ ; o b) la lignino peroxidasa (LiP) y la lacasa (*p*-difenol- dioxígeno:



óxido-reductasa) dependientes del cobre, que rompen aromáticos de la GAS en ausencia de LiP y MnP (Rodríguez, *et al.*, 2003). Con base a esto es posible suponer que en un suelo contaminado con GAS la aplicación de un extracto fúngico crudo (EFC) de HML es útil para eliminar la fracción aromática de la GAS, y es más conveniente que la bioaugmentación, puesto que estas enzimas ligninolíticas son activas en condiciones físico-químicas ambientales diversas y adversas: temperatura, pH e inhibidores naturales de enzimas (Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001); Así mismo aplicar BR por BS con la incorporación de abonos orgánicos como la lombricomposta (LC), que es una mezcla de minerales que incluyen enzimas extracelulares bacterianas que al actuar generan ácidos húmicos y fúlvicos que aumentan la densidad microbiana (Atiyeh *et al.*, 2000 citado por Moreno, 2005). Y concluir con FR de ese suelo con *Z. mays* L/ *Azotobacter vinelandii*, se ha estudiado ampliamente la FR con gramíneas ya que tienen un sistema radical extenso y fibroso que le confiere a la gramínea cierta resistencia a la toxicidad de los HC y colateralmente una mayor disponibilidad mineral (Sangabriel *et al.*, 2006), también se ha reportado que las gramíneas forman asociaciones con bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) como *Azotobacter vinelandii* las cuales transforman exudados radicales de la planta en fitohormonas y colateralmente potencian la MI de los HC de la GAS al usarlos como fuente de carbono y energía, lo que podría acelerar la restauración del suelo con GAS (Carpena., 2007), (Rojas *et al.*, 2010).

## **2. Antecedentes:**

En la literatura es escasa la información sobre BR de suelo con GAS, pero si relacionado con HC análogos a esta mezcla.

Núñez *et al.*, 2005, evaluaron la BR vía BS con nitrógeno y fósforo inorgánico de suelo contaminado con 10,000 ppm de diferentes HC (fuel oil, gasolina de 85% y 96% de octanaje),

lográndose un 50% y 61% de remoción del fuel oil y gasolina de 85% ppm de octanaje respectivamente en 28 días, mientras que para gasolina de 96% ppm se alcanzó un 98% ppm de remoción en solo 15 días. Estos resultados evidencian el potencial de la BR vía BS para el saneamiento de ambientes terrestres impactados con petróleo y sus derivados.

Gómez *et al.*, 2009, restauraron un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel a una concentración de 200 mg/Kg mediante BR vía BS con una SM a bases de sales inorgánicas, y compararon con la eliminación de HC en un suelo naturalmente atenuado. Los resultados mostraron que en un periodo de 3 meses la BS eliminó un 64.92% de HC de la mezcla de diesel-gasolina en comparación a un 60.45% en el suelo vía atenuación natural.

Manzano-Agugliaro *et al.*, (2010) biorremediaron un suelo contaminado con diesel al 1.4% por BS con estiércol bovino. El suelo biorremediado fue comparado con suelo sin biorremediar usado como control negativo (CN). Los resultados indicaron que en 183 días, la BR del suelo oxidó el 99.8% del diesel y el suelo CN registró solamente 10% de su eliminación.

Asquith *et al.*, 2012. Compararon diferentes técnicas de BR en suelo contaminado crónicamente con HC, después de 195 días hubo una remoción del 32% de HC totales del petróleo (HTP) en suelo usado como control, mediante BR vía BS con nutrientes inorgánicos con una remoción del 49% y BS con nutrientes orgánicos con un 80% de remoción de HTP, demostrando que estas técnicas pueden mejorar la BR de suelo contaminado con HC derivados del petróleo.

Asimismo, investigaciones reportan a la FR como otra estrategia parcialmente adecuada para la biorrestauración de suelo contaminado con HC, en la literatura es escasa la información sobre FR de suelo con GAS, pero si relacionado con HC análogos a esta mezcla, como lo demuestran:

Hernández-Valencia y Mager, 2003. Evaluaron la FR de dos gramíneas; *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* en un suelo contaminado con HC de petróleo liviano (HCP) al 3%. Los HCP causaron una reducción en el peso seco total, en el caso de *B. brizantha* un 11.4% de la producción obtenida sin contaminación, mientras que para *P. maximum* el 1.2%. Sin embargo *B. brizantha* y *P. maximum* lograron disminuir un 55% y 63% respectivamente la concentración de HCP a los 240 días con respecto al 40% del suelo control contaminado sin planta.

Sangrabriel *et al.*, 2006. Evaluaron la FR de leguminosa *Phaseolus coccineus* y tres gramíneas *B. híbrido*, *B. brizantha* y *P. maximum* en suelo contaminado accidentalmente con combustóleo. Las variables respuesta: crecimiento y eliminación del combustóleo de cada planta. *P. coccineus* mostro la mayor altura de 87.5 cm y peso seco de 2.8 g en el suelo con combustóleo, mientras que las tres gramíneas no fueron afectadas negativamente por el combustóleo, la eliminación de combustóleo evaluada cualitativamente por cromatografía de gases, fue mayor en la rizósfera de *B. brizantha* y *P. maximum*. En contraste *P. coccineus* reporto una eliminación similar a la observada en suelo contaminado sin planta.

Rivera-Cruz & Trujillo-Narcia (2006) fitorremediaron un suelo contaminado por benzo(a)pireno (BaP) al 1.0% con pasto alemán (*Echinochloa polystachya* L.). El suelo con FR fue comparado con suelo CN. Los resultados de la FR del suelo indicaron que en 120 días, el pasto alemán eliminó el 66.5% del BaP, en contraste con el suelo CN que no registró cambio en la concentración del BaP.

Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007. Evaluaron la FR de *P. coccineus* en suelo contaminado en 5% con combustóleo mediante dos muestras de suelo con fertilización; orgánica e inorgánica. Se valoró el crecimiento de la planta, población bacteriana oxidante y la eliminación de combustóleo

mediante cromatografía de gases. Observaron que el combustóleo redujo en un 56% el peso seco total de la planta, sin embargo este efecto negativo fue compensado con fertilización inorgánica alcanzo una altura de 87.6 cm, además la microbiota fue estimulada por la presencia de la planta y por la fertilización orgánica e inorgánica, eliminando cualitativamente algunos HC del combustóleo en rizósfera y suelo.

Petenello, *et al.*, 2012. Evaluaron la FR de un suelo con aceite diesel al 5%, de *Spartina argentinensis*, *Paspalum atratum*, *Paspalum guenoarum* y *Melilotus albus*, con variables respuesta: germinación y emergencia de plántulas y la biomasa alcanzada en suelo contaminado. *M. albus* obtuvo un 79.17% de germinación, *P. guenoarum* obtuvo la mayor altura con 53.58 cm y la mayor biomasa de 169,99 g en suelo contaminado. Las especies evaluadas, si bien produjeron menor biomasa comparada con la planta en suelo sin aceite diesel, demostraron tolerancia al contaminante.

Las investigaciones anteriores demuestran que una sola estrategia es insuficiente para recuperar un suelo contaminado con HC del petróleo y sus derivados. No se encontró información disponible en la literatura acerca de BR de suelo con GAS y posterior FR del mismo suelo para su restauración final. Es poco aun lo reportado en la literatura de la utilización integral de BR-FR para recuperar un suelo contaminado con HC análogos a esta mezcla, como los siguientes:

Cruz-Sánchez *et al.*, (2007) recuperaron un suelo contaminado con combustóleo al 5% por BR vía BS con LC y posterior FR con *Phaseolus coccineus*. El suelo biorremediado y fitorremediado se comparó con suelo CN. Los resultados indicaron que la BR-FR en el suelo

eliminó el 87% del combustóleo a diferencia del suelo CN que obtuvo solamente el 20% de eliminación del combustóleo.

Maldonado-Chávez *et al.*, (2010) restauraron un suelo contaminado por HTP al 1.5% con BR vía BS y FR con *Brachiaria mutica* L y la leguminosa *Leucaena leucocephala* L. El suelo biorremediado y fitorremediado fue comparado con suelo CN. Los resultados señalaron que en 158 días, la BR-FR en el suelo eliminó el 81% de los HTP y el suelo CN no registró cambio en la concentración de los HTP.

Debido a la escasa información disponible en la literatura acerca de BR de suelos contaminados con GAS, la presente investigación propone una alternativa de biorrestauración para la eliminación de la GAS en suelo.

### **3. Hipótesis:**

La BR de un suelo contaminado con GAS a 10,000 ppm con extracto fúngico crudo y lombricomposta será más rápida y eficaz si se complementa con fitorremediación con *Zea mays* L, inoculado con *Azotobacter vinelandii*.

### **4. Objetivos:**

- a) Analizar la biorremediación de un suelo contaminado con GAS a 10,000 ppm con extracto fúngico crudo y lombricomposta.
- b) Analizar la fitorremediación con *Zea mays* L, inoculado con *Azotobacter vinelandii* para eliminar la GAS remanente.

### **5. Materiales y métodos:**

El experimento se realizó en invernadero, con un diseño de experimental de bloques al azar de 5 tratamientos. El suelo se solarizó, tamizó, y contaminó con GAS a 10,000 ppm (v/p).

### **5.1 Preparación de jarras de Leonard:**

Las jarras de Leonard son un sistema semihidropónico en donde se llevó a cabo la BR y FR del suelo contaminado con GAS a 10,000 ppm, estas se componen de tres partes: una base que consiste en un contenedor de una solución mineral (SM) y/o agua; la parte inferior que contiene un algodón que permite el paso de la SM y/o agua desde la base hasta la parte superior que contiene aproximadamente 1 kg de suelo tratado como se indica en el cuadro 1; y la parte superior que consiste en un recipiente que contiene el suelo contaminado para biorremediar y fitorremediar (García-González *et al.*, 2005).

### **5.2. Biorremediación por bioestimulación con extracto fúngico crudo**

De la colección de hongos del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, los hongos mitospóricos ligninolíticos (HML) como *Penicillium chrysogenum*., *Aspergillus tubingensis*, *A.fumigatus* y *fusarium thapsinum*, se cultivaron en medio líquido con lignina residual de paja de trigo (LIREPATO) como única fuente de carbono, con la siguiente composición química (g/L): LIREPATO, 10,0; peptona de soya, 5,0; CuSO<sub>4</sub>, 0,01; MgSO<sub>4</sub>, 1,5; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1,5; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,5, NaCl, 0,9; extracto de levadura, 1,0; detergente Roma® al 1%, 2,5 mL; solución de oligoelementos 0,001 mL; azul de bromotimol al 0,1%, 10,0 mL, pH ajustado a 5,5. Se incubaron 18 días/28°C en agitador (Thermo Scientific MaxQ 4000) a 150 rpm con pH 5,5 ±0,2. Cada semana se colectó 10 mL del medio LIREPATO para medir la actividad lacasa, lignino peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP) durante dos semanas (Troya, *et al*, 2000; Laura & Castellanos 2009). Para ello, con bomba de vacío (Power electric) se filtraron las muestras de LIREPATO con los HML para obtener EFC y se ajustaron a pH de 6,5 ± 0,2 con potenciómetro (HANNA

instruments) y se incorporó el EFC al suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS para la BS durante 60 días.

### **5.3. Biorremediación por bioestimulación con lombricomposta**

Durante 30 días previo a la siembra de las semillas de *Z. mays* se llevó a cabo la BR vía BS con LC a 30, 000 y 60, 000 ppm , este consistió en regar de forma regular con agua de la llave el suelo contaminado con GAS y enriquecido con LC a 30, 000 y 60, 000 ppm, suficiente para mantener la capacidad de campo constante durante este periodo de tiempo, y se iniciase la MI de la GAS, posteriormente en este suelo se sembró las semillas de *Z. mays* inoculados con o sin BPCV (Pasaye, 2011).

#### 5.4. Diseño experimental

**Cuadro 1. Biorremediación de un suelo contaminado con gasolina a 10,000 ppm por bioestimulación con extracto fúngico, lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm, y su posterior fitorremediación con *Z. mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii*.**

Suelo	GAS 10,000 (ppm) (v/p)	Extracto fúngico crudo	Lombricomposta (ppm)	<i>Z.mays</i>	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Solución mineral
<b>Control relativo</b>	-	-	-	+	-	100%
<b>Control vegetal</b>	-	-	+ 60, 000	+	-	-
<b>T 1</b>	+	+	+ 60,000	+	-	-
<b>T2</b>	+	-	+ 60,000	+	+	-
<b>T3</b>	+	+	+ 30,000	+	-	-

(+) = se añade, (-) = no se añade,

T = tratamiento

#### 5.5. Cultivo de *Azotobacter vinelandii*.

El género *Azotobacter vinelandii*, bacteria promotora del crecimiento vegetal fue adquirida de la colección del laboratorio de Microbiología Ambiental del Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas de la UMSNH. *A. vinelandii*, se sembró en caldo Burk (g/L): glucosa 10.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub> 3.0; y una solución de oligoelementos 1.0 mL/L de medio de cultivo, con la siguiente composición (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.22; MnCl<sub>2</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.81; K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 0.09 a pH 6.4-6.7; azul de bromotimol 1% (p/v) 10 mL/L de medio de



cultivo, se ajustó pH a 6.5-6.7; se inhibió el crecimiento de hongos con antifúngico Tecto 60® (Syngenta) 2% (p/v) 1.0 mL/L de medio de cultivo. Los tubos de Burk se incubaron a 30°C/24 h, y se observó turbidez como medida de crecimiento, después se realizó tinción Gram para observar en el microscopio Carl Zeiss, su morfología: bacilo grande Gram negativo (Sánchez-Yáñez., 2007).

## **5.6. Fitorremediación con *Z. mays***

### **5.6.1. Desinfección de las semillas de *Z. mays***

En un vaso de precipitado se sumergieron las semillas de *Z. mays* en hipoclorito de sodio al 3% (v/v)/5 min, se lavaron por seis ocasiones con agua potable estéril, se colocaron en etanol al 70% (v/v)/5 min y se lavaron seis veces con agua estéril (García-Reyna *et al.*, 2005).

### **5.6.2. Inoculación de *Z. mays* con *A. vinelandii*.**

En la campana de flujo laminar, con una pinza desinfectada con hipoclorito de sodio al 3% (v/v) y etanol al 70% (v/v), se depositaron en una bolsa de plástico oscura, 10 semillas de maíz que se utilizaron por suelo BR de distinta manera, con una pipeta estéril se inoculó por cada 10 semillas, un volumen de 1.0 mL con *A. vinelandii*, cultivado en caldo Burk por 48 h. y se mezcló/20 minutos (García-Reyna *et al.*, 2005).

### **5.6.3. Siembra de semillas de *Z. mays* en el suelo contaminado con GAS remanente.**

En suelo impactado con GAS remanente a la BS con EFC y LC, se llevó a cabo la FR del mismo, con *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii*. (según el diseño experimental mostrado en el cuadro 1.) se sembraron 4 semillas/jarra de Leonard con 2 repeticiones por suelo biorremediado y se dejaron en solarium hasta germinación de las semillas de *Z. mays*. Las jarras de Leonard con el *Z. mays* se trasladaron al invernadero 11 días posterior a la siembra,

para dar las condiciones de luz-temperatura necesarias para el crecimiento del *Z. mays* (Taiz *et al.*, 2006).

#### **5.6.4. Solución mineral para plantas.**

La solución mineral (SM) fue preparada a partir de ULTRASOL® a una concentración de 1.5g/L, su composición: 18% Nitrógeno (N), 18% Fósforo (P<sub>2</sub>O), 18% Potasio (K<sub>2</sub>O), 1% Azufre (S), 1% Magnesio (MgO), otros nutrientes: Fe, Cu, Zn, Mn, Mo, B., con un pH ajustado 6.8-7.0 con ácido acético 2% (v/v), que alimentó al maíz del control relativo. (Leal, 2003)

#### **5.6.5. Parámetro de las variables respuesta del *Z. mays*.**

Las variables respuestas del efecto de la FR del suelo con GAS remanente a la BS, sobre el *Z. mays* fueron: porcentaje de germinación a los 11 días después de la siembra; la fenotipia en plántula (30 días) y floración (60días). Se midió la altura de la planta (AP) y longitud de la raíz (LR), su biomasa aérea y radicular: peso fresco (PF) total y peso seco (PS) total. Del *Z. mays* se pesó su parte aérea total y la raíz total, para el peso fresco total; posteriormente ambas se secaron en un horno a 70°C/48 h para el peso seco (Boshchini, & Amador 2000). En cada estadio fisiológico del *Z. mays*, se comparó con el *Z. mays* usado como control relativo (CR) sembrado en un suelo sin GAS, y alimentado con SM al 100%. Los datos experimentales fueron analizados por Tukey (Walpole *et al.*, 2007)

## 6. Perfil de antibióticos para prueba de sensibilidad

### 6.1. Recuperación de *Azotobacter* de raíz de *Z. mays*

Después del muestreo a floración del *Z. mays* se tomó una muestra de raíz, se eliminó el exceso de suelo, enjuagándose con detergente la Corona <sup>MR</sup> 1% (p/v) y se lavó con agua potable; hipoclorito de Sodio (Clorox <sup>MR</sup>) al 6% (v/v) /10 minutos y se lavó 5 veces con agua potable estéril, posteriormente con etanol al 70% (v/v) /5 min; y se lavó 5 veces; se tomó 2.0g de raíz y se suspendieron en 5.0 mL de solución salina, NaCl 0.85% (p/v); detergente 1%( p/v). En un mortero la raíz se trituro y se sembró en caldo Burk (g/L): glucosa 10.0; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2.0; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2.0; MgSO<sub>4</sub> 3.0; y una solución de oligoelementos 1 mL/L de medio de cultivo, con la siguiente composición (g/L): H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 2.86; ZnSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.22; MnCl<sub>2</sub> 7H<sub>2</sub>O 1.81; K<sub>2</sub>MnO<sub>4</sub> 0.09 a pH 6.4-6.7; azul de bromotimol 1% (p/v) 10 mL/L de medio de cultivo, se ajustó pH a 6.5-6.7; se inhibió el crecimiento de hongos con antifúngico Tecto 60® (Syngenta) 2% (p/v) 1.0 mL/L de medio de cultivo. Los tubos de Burk se incubaron a 30°C/24 h, y se observó turbidez como medida de crecimiento. Después se realizó tinción Gram para observar en el microscopio Carl Zeiss, su morfología: bacilo grande Gram negativo. Como evidencia de crecimiento se observó turbidez. Se realizó tinción de Gram para observar su morfología, para la purificación de los aislados a la misma fórmula líquida de Burk se agregó 18 g/L de agar bacteriológico Burk y se incubó por 48/72h.

## **6.2. Prueba de sensibilidad a antibióticos:**

Para esta prueba fue utilizado agar Burk como base para determinar la resistencia de *A. vinelandii* a antibióticos impregnados en sensidiscos con las siguientes concentraciones en mcg: 30.0 Cefalotina (CF), 30.0 Ceftriaxona (CRO), 25.0 Trimetropim-Sulfametoxazol (SXT), 30.0 Cefotaxima (CTX), 30.0 Netilmicina (NET), 5.0 Pefloxacina (PEF), 300.0 Nitrofurantoína (NF), 30.0 Cloranfenicol (CL), 30.0 Amikacina (K), 10.0 Gentamicina (GE), 10.0 Ampicilina (Am), 100.0 Carbencilina (CB). Y se incubó por 48/72h.

## **7. Aislamiento de microorganismos degradadores de gasolina de suelo contaminado sometido a biorremediación.**

### **Medio de cultivo para el aislamiento de microorganismos degradadores de GAS.**

Se utilizó agar para bacterias degradadoras de GAS (ABDGAS) y para hongos degradadores de GAS (AHDGAS) (g/L):  $K_2HPO_4$  2.0;  $KH_2PO_4$  2.0;  $MgSO_4$  3.0; agar 18; peptona de caseína 5; extracto de levadura 1; solución de oligoelementos 1.0 mL/L. La solución de oligoelementos (g/L):  $H_3BO_3$  2.86;  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  0.22;  $MnCl_2 \cdot 7H_2O$  1.81;  $K_2MnO_4$  0.09 pH a 7.0. Gasolina a 10,000 ppm (v/p) como única fuente de Carbono y energía después de la esterilización; en ABDGAS para evitar crecimiento fúngico se agregó tecto 5%, 1.0 mL/L el pH se ajustará a 6.8, en AHDGAS para evitar crecimiento bacteriano se agregó cloranfenicol (Vixin) 5.0 mL/L el pH se ajustó a 5.5.

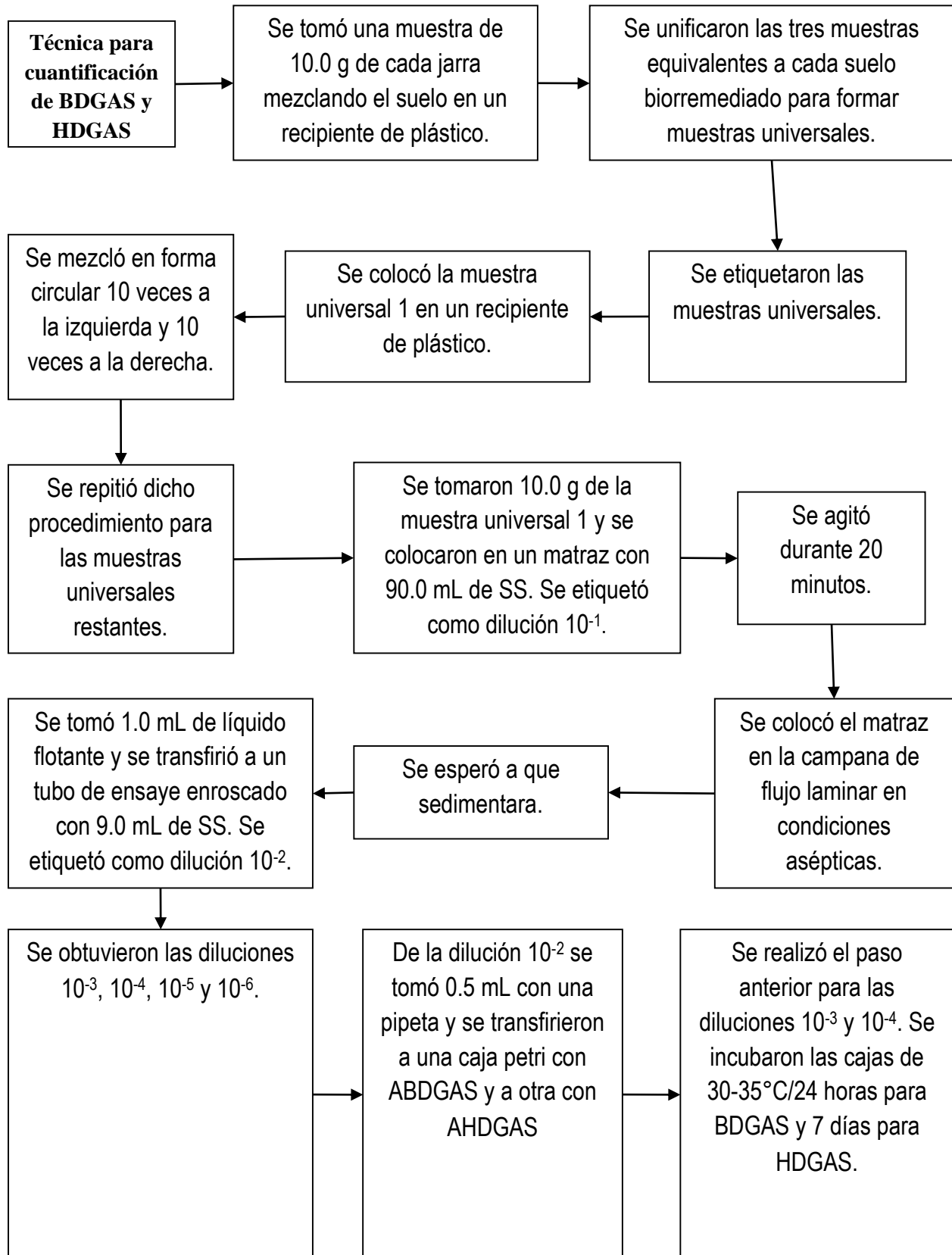
### **Aislamiento de los microorganismos que degradan GAS.**

Los microorganismos degradadores de GAS se aislaron por resiembra en ABDGAS y AHDGAS.

### **7.1. Cuantificación de microorganismos degradadoras de GAS.**

Se utilizó la técnica de cuenta viable en placa (CVP), que consistió en realizar diluciones decimales seriadas del suelo biorremediado con solución salina (SS) NaCl 0.85% con 1% (v/v) de solución detergente al 1% (p/v). La inoculación se realizó en cajas Petri con ABDGAS y AHDGAS por duplicado con las diluciones de suelo de  $10^{-2}$  a  $10^{-4}$ , se agregaron 0.5 mL de suelo biorremediado/caja y se extendieron con perlas. Se incubaron de 30-35°C/24 h para BDGAS y de 30-35°C/7 días para HDGAS, después de la incubación se realizó el recuento de BDGAS y HDGAS y se seleccionaran aquellas cajas en donde se observen entre 30 y 300 colonias, la cifra obtenida se multiplicó por la inversa de la dilución que se trató. Se reportó como unidades formadoras de colonias/g de suelo biorremediado (UFC/g) para BDGAS y como propágulos fúngicos/g de suelo biorremediado para HDGAS.

## 7.2. Técnica para cuantificación de BDGAS y HDGAS.



Se contaron las colonias después de la incubación por 24 h en ABDGAS. Se registran los datos de las cajas con 30-300 colonias como unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo biorremediado= (UFC/g).

$$\frac{UFC}{g} = \frac{\text{Promedio de las colonias por dilución} * \text{Factor de dilución}}{g \text{ de la muestra sembrada}}$$

### **7.3 Análisis estadístico de resultados.**

El análisis estadístico de los datos de las variables indicadoras el de BDGAS y HDGAS se realizó por Tukey.

## 8. Discusión y Resultados.

**Cuadro 2. Efecto de la biorremediación por bioestimulación con extracto fúngico crudo y lombricomposta de un suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina en el porcentaje de germinación de *Zea mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii*.**

<i>Z. mays</i>	Por ciento (%) de Germinación
Control Relativo: suelo + solución mineral 100%	<b>100<sup>a*</sup></b>
Control vegetal : suelo + lombricomposta a 60,000 ppm	<b>100<sup>a</sup></b>
T1: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60, 000 ppm	<b>100<sup>a</sup></b>
T2: suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	50 <sup>c</sup>
T3: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30, 000 ppm	75 <sup>b</sup>

T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

El cuadro 2 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre la germinación del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR, donde se observa indirectamente la eliminación parcial de la GAS en el suelo biorremediado, permitiendo la germinación del *Z. mays*. La gramínea sembrada en suelo con GAS a 10,000 ppm y bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) germinó 100%, valor sin diferencia estadística a lo reportado por el *Z. mays* usado como control relativo (CR) sembrado en suelo sin GAS con 100% de germinación, y a la gramínea sembrada en suelo enriquecido con lombricomposta 60,000 pmm usado como control vegetal 1 que registro un 100% en su



germinación, lo que sugiere que al agregar EFC las enzimas extracelulares hidrolizaron la fracción aromática de la GAS (Sánchez-Yáñez , 2007) y la LC como enmienda proporcionó minerales necesarios para el crecimiento de la microbiota oxidante de GAS (Feliú-Mójer, 2006; Rodríguez, 2005; Rojas, 2009). La semilla de la gramínea inoculada con *A. vinelandii* y sembrada en suelo con GAS biorremediado con EFC con LC a 30,000 ppm (T3) alcanzó un 75 % de germinación, valor estadísticamente superior al registrado por el *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii* y sembrado en suelo con GAS a 10,000 ppm, bioestimulado con LC 60,000 ppm (T2), que mostró un 50% de germinación, fue evidente que la GAS limitó la germinación del *Z. mays*, se ha reportado que estos HC impiden el intercambio gaseoso y la interacción del agua con la semilla para permitir su emergencia; resultado análogo al reportado por Natera-Méndez *et al.*, 2004, que señalaron que la contaminación del suelo con HC disminuyó el porcentaje de germinación del *Z. mays*.

**Cuadro 3. Fenotipia del *Zea mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii* sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de plántula.**

<i>Z. mays</i>	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)
Control Relativo: suelo + solución Mineral 100%	<b>65.45</b> <sup>a*</sup>	38.10 <sup>c</sup>
Control vegetal : suelo + lombricomposta 60, 000 ppm	60.00 <sup>b</sup>	<b>47.00</b> <sup>a</sup>
T1: suelo +gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	50.45 <sup>c</sup>	34.60 <sup>d</sup>
T2: suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	41.30 <sup>d</sup>	34.20 <sup>d</sup>
T3: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	35.50 <sup>e</sup>	40.85 <sup>b</sup>

T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

El cuadro 3 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre la altura de planta (AP) a plántula, del *Z. mays*/ *A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* sembrado en suelo con GAS a 10,000 ppm bioestimulado con EFC y LC a 60, 000 ppm (T1) alcanzó una AP de 50.45 cm, la gramínea inoculada con *A. vinelandii* sembrada en suelo con GAS biorremediado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un 41.30 cm, en su AP, y el *Z. mays* sembrado en suelo con GAS biorremediado con EFC y LC 30,000 ppm (T3) obtuvo una AP de 35.50 cm, valores inferiores comparado con su homólogo el CR en donde el *Z. mays*. creció en condiciones normales en suelo no contaminado que registro una AP de 65.45 cm, lo anterior sugiere que la previa BS con EFC y LC a 30,000 y

60,000 ppm, no fue suficiente para que la GAS remanente en la FR del mismo suelo con *Z. mays*, tuviera un sano crecimiento de la gramínea, resultado similar del efecto fitotóxico de los HC en las gramíneas fue reportado por Hernández-Valencia y Mager, 2003 que en un suelo contaminado con HC, observó una reducción de la AP de frijol y pasto comparados ambos con el crecimiento del frijol y pasto en suelo sin contaminar.

El cuadro 3 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre la longitud radical (LR) a plántula, del *Z. mays*/*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* sembrado en suelo con GAS bioestimulado con EFC y LC 6% (T1) registro una LR de 34.60, la gramínea inoculada con *A. vinelandii* sembrada en suelo con GAS bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) alcanzó una LR de 34.2 cm, y el *Z. mays* sembrado en suelo con GAS bioestimulado con EFC y LC a 30,000 ppm (T3) obtuvo una LR de 40.85 cm. Los valores numéricos del *Z. mays* en este ensayo fueron estadísticamente diferentes al *Z. mays* usado como CR y control vegetal 1 enriquecido con LC 60,000 ppm que lograron una mayor LR. Lo anterior muestra que el *Z. mays* sembrado en suelo contaminado con GAS remanente no mostró mejoría alguna en su desarrollo, lo que sugiere que la concentración de la GAS fue lo suficientemente alta para ocasionar un efecto fitotóxico en el *Z. mays* e impedir un sano crecimiento como lo estipulado por otras investigaciones (Sangabriel *et al.*, 2006; Balderas, 2013). Lo que sugiere que los HC de la GAS en el suelo inhiben el crecimiento del *Z. mays* ya que al cubrir sus raíces bloquean la absorción de agua y nutrimentos. (Natera- Méndez- *et al.*, 2004)

**Cuadro 4. Biomasa del *Zea mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii* sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de plántula.**

<i>Z. mays</i>	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
	aéreo	radical	aéreo	radical
Control Relativo: suelo + solución mineral 100%	6.06 <sup>b*</sup>	2.19 <sup>d</sup>	0.72 <sup>a*</sup>	0.34 <sup>b</sup>
Control vegetal 1: suelo + lombricomposta 60,000 ppm	6.07 <sup>b</sup>	2.87 <sup>b</sup>	0.62 <sup>b</sup>	0.33 <sup>b</sup>
T1: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	4.85 <sup>c</sup>	2.27 <sup>c</sup>	0.52 <sup>c</sup>	0.30 <sup>b</sup>
T2: suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	<b>7.82<sup>a</sup></b>	<b>4.11<sup>a</sup></b>	<b>0.77<sup>a</sup></b>	<b>0.45<sup>a</sup></b>
T3: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	3.01 <sup>e</sup>	2.24 <sup>c</sup>	0.30 <sup>d</sup>	0.23 <sup>c</sup>

T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

El cuadro 4 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre peso fresco aéreo (PFA) a plántula, del *Z. mays* /*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii* sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) alcanzo un PFA de 7.82 g, valor estadísticamente significativo comparado con su homólogo CR y el control vegetal 1 enriquecido con LC 60,000 ppm que registraron un PFA de 6.06 y 6.07 g respectivamente, lo anterior muestra indirectamente la desaparición de la GAS al permitir el correcto crecimiento del *Z. mays*, al respecto se ha reportado que la LC favorece el crecimiento sano vegetal al aportar N, P, K, y

micronutrientes, incrementando la diversidad y densidad de las poblaciones microbianas y simultáneamente favoreciendo el intercambio catiónico para una mejor oxidación de los HC de la GAS. (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010) y colateralmente *A. vinelandii* promovió su crecimiento sano, aumentando la disponibilidad de los nutrientes y la sanidad vegetal de esta gramínea (Vessey 2003)., Por el contrario se muestra un efecto fitotóxico de la GAS remanente, sobre el PFA del *Z. mays* sembrado en suelo bioestimulado con EFC y LC 60,000 ppm (T1), logrando un PFA de 4.85 g; La semilla sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 30,000 ppm (T3) logró un PFA de 3.01 g, este resultado nos muestra que la BS con EFC y LC a 30,000 ppm fue insuficiente para contrarrestar la fitotoxicidad de la GAS, al respecto se ha reportado que los HC en la raíz de las plantas puede provocar un daño en las membranas de las células corticales, lo que limita su crecimiento (Chaineau *et al.*, 1997).

El cuadro 4 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre peso fresco radical (PFR) a plántula, del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii* sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un PFR de 4.11 g, valor superior al *Z. mays* usado como CR que obtuvo un PFR de 2.19 g, lo que sugiere que además de la BS con LC a 60,000 ppm que apporto nutrientes, *A. vinelandii* transformo los exudados del *Z. mays* en fitohormonas e incremento la elongación radical y una mayor absorción de agua y minerales (Loredo-Osti *et al.*, 2004) para lograr un mejor crecimiento que el *Z. mays* sembrado en suelo sin contaminar. La gramínea sembrada en suelo con GAS, biorremediado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1 ) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) fue de 2.27 y 2.24 g respectivamente, estos valores fueron también superiores al resultado alcanzado por el CR en el que la gramínea fue sembrada en suelo sin GAS, lo que sugiere una disminución parcial indirecta de la GAS, al

respecto se ha reportado que la LC aporta los nutrientes necesarios que esta gramínea requiere para su sano crecimiento (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2007).

El cuadro 4 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre peso seco aéreo (PSA) a plántula, del *Z. mays*/*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. La gramínea inoculada con *A. vinelandii* sembrada en suelo con GAS, biorremediado con EFC y LC a 60,000 ppm (T2) registro un PSA de 0.77 g similar a su homólogo CR que alcanzo 0.72 g en su PSA, lo anterior sugiere la eliminación indirecta de la GAS al mostrar un crecimiento similar al *Z. mays* sembrado en suelo sin GAS. La gramínea sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC 60,000 ppm (T1) registro un PSA de 0.52 g ; el *Z. mays* sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 30,000 ppm (T3) genero un PSA de 0.30g, estos valores menores de PFR total sugieren que fueron causados por la fitotoxicidad de la GAS en el suelo (Armendariz *et al.*, 2011) esto corrobora el efecto negativo de los HC en el crecimiento de plántulas de gramíneas reportado por Sangabriel *et al.*, 2006 y Ferrera-Cerrato *et al.*, 2008.

El cuadro 4 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre peso seco radical (PSR) a plántula, del *Z. mays*/*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii* sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC 60,000 ppm (T2) alcanzó un PSR de 0.45 g, valor estadísticamente significativo comparado con el CR que registro un PFR de 0.34 g. El *Z. mays* sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC 60,000 ppm (T1) registro un valor de 0.30g, similar al reportado por el CR. Lo anterior sugiere que la LC funcionó como mejorador de suelos al enriquecer con N. P y K; y de igual manera *A. vinelandii* estimuló la conversión de los exudados de la semilla del *Z. mays* en fitohormonas para estimular el crecimiento de esta

gramínea (Sánchez-Yáñez, 2007). La semilla sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 30,000 ppm (T3) obtuvo un PSR de 0.25 g. En relación Ferrera-Cerrato, 2007, reportó que el combustóleo en suelo redujo 56% el peso seco total del frijol a los 90 días, lo cual corrobora el efecto negativo de los HC del petróleo en el crecimiento del *Z. mays* reportado por Quiñones-Aguilar *et al.*, 2003.

**Cuadro 5. Fenotipia del *Zea mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii* sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de floración.**

<i>Z. mays</i>	Altura de planta (cm)	Longitud radical (cm)
Control Relativo: suelo + solución Mineral 100%	113.55 <sup>a*</sup>	46.2 <sup>c</sup>
Control vegetal: Suelo + lombricomposta 60,000 ppm	67 <sup>b</sup>	72.1 <sup>b</sup>
T1: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	52.2 <sup>c</sup>	39.5 <sup>e</sup>
T2: suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	113 <sup>a</sup>	77.65 <sup>a</sup>
T3: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	45.05 <sup>d</sup>	42 <sup>d</sup>

T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

El cuadro 5 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre la AP a floración del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii* sembrado en suelo contaminado con GAS, bioestimulado

con LC a 60,000 ppm (T2), alcanzo una AP de 113 cm, similar al valor obtenido por su homologo CR que logró una AP de 113.55 cm, lo anterior sugiere que la BS con LC estimuló a la microbiota autóctona del suelo a oxidar los HC remanentes de la GAS, aportando los minerales esenciales para que *A. vinelandii* como bacteria BPCV en interacción con los exudados radiculares sintetizará fitohormonas como las auxinas que regulan el desarrollo de la planta (Castillo *et al.*, 2005) y simultáneamente la LC aportó a la planta minerales para un correcto crecimiento (Pérez *et al.*, 2008). El control vegetal 1 en el que el suelo fue bioestimulado con LC 6% alcanzó una AP de 55.2 %; y el *Z. mays* sembrado en suelo con 10,000 ppm de GAS bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) obtuvieron un valor de 52.2 y 45.05 cm respectivamente en su AP, lo que sugiere un efecto negativo de la GAS remanente en el suelo, al respecto se ha reportado que estos HC de la GAS forma películas en el suelo que impiden la circulación del oxígeno (O<sub>2</sub>) y además contiene HC aromáticos que destruyen el humus vegetal o reducen la fertilidad del suelo (Gómez *et al.*, 2007).

El cuadro 5 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre la LR a floración del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii* sembrado en suelo contaminado con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un la LR de 77.65 cm, valor estadísticamente significativo comparado con el CR que obtuvo una LR de 46.2 cm y que la alcanzada por el control vegetal 1 de 72.1 cm, lo anterior muestra indirectamente una detoxificación del suelo contaminado con GAS al crecer el *Z. mays* mucho mejor que el sembrado en suelo sin GAS, lo que sugiere que la BS con LC fue suficiente para suplir la demanda mineral del *Z. mays* a madurez fisiológica y que la actividad promotora de *A. vinelandii* mejoro el crecimiento del *Z. mays*, ya que esta



bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV) transformo los exudados radicales del *Z. mays* en fitohormonas (Balderas, 2013). La gramínea sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) registraron una LR de 42 y 39.5cm respectivamente, lo anterior sugiere que la GAS remanente a la BS con EFC y LC aún tuvo efectos tóxicos sobre el maíz (Juárez, 2012) la presencia de compuestos fitotóxicos como los HC de la GAS en las plantas ocasionan una menor acumulación de su biomasa y diversos efectos sobre la morfología de la raíz (Petenello *et al.*, 2012); de igual forma Rivera-Cruz & Trujillo-Narcia (2006) encontraron que la exposición de las plantas a ciertos HC pueden inhibir el crecimiento y la producción de biomasa, pues en el caso de la LR, los HC son uno de los factores restrictivos en donde se disminuye la población microbiana en la rizósfera y con ello la LR.

**Cuadro 6. Biomasa del *Zea mays* inoculado con *Azotobacter vinelandii* sembrado en suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado vía bioestimulación con extracto fúngico y lombricomposta a nivel de floración.**

Suelo/ <i>Z. mays</i>	Peso fresco (g)		Peso seco (g)	
	aéreo	radical	aéreo	radical
Control Relativo:				
Suelo + solución mineral 100%	39.25 <sup>b*</sup>	18.73 <sup>b</sup>	4.49 <sup>b*</sup>	2.07 <sup>b</sup>
Control vegetal 1: suelo + lombricomposta 60,000 ppm	17.51 <sup>c</sup>	14.98 <sup>c</sup>	1.92 <sup>c</sup>	1.85 <sup>c</sup>
T1: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	7.43 <sup>d</sup>	6.38 <sup>d</sup>	0.96 <sup>d</sup>	1.85 <sup>d</sup>
T2: suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm + <i>Azotobacter vinelandii</i> .	<b>40.81<sup>a</sup></b>	<b>19.22<sup>a</sup></b>	<b>5.79<sup>a</sup></b>	<b>2.59<sup>a</sup></b>
T3: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	6.4 <sup>e</sup>	6.54 <sup>d</sup>	0.84 <sup>e</sup>	0.84 <sup>e</sup>

T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

El cuadro 6 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre el PFA a floración del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii*, sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un PFA de 40.81 g, valor superior al alcanzado por su homólogo el CR que fue de 39.25g, lo que sugiere que la LC a esta concentración fue suficiente para mejorar las propiedades físicas del suelo y permitir el crecimiento de plántulas más vigorosas (Hernández-Rodríguez *et al.*, 2010) y la inoculación de la semilla con *A. vinelandii* estimuló la síntesis de fitohormonas (Loredo-Osti *et al.*, 2004). Por el contrario la gramínea sembrada en

suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) muestran un PFA de 7.43 y 6.4 respectivamente, los resultados anteriores fueron inferiores a los valores registrados por el *Z. mays* usado como CR, esto muestra que el *Z. mays* sembrado en suelo con GAS remanente a la BS, no mostró mejoría alguna en su desarrollo, lo que sugiere un estrés vegetal ocasionado por la baja disponibilidad mineral en el suelo y la acción tóxica conjunta ocasionada por la GAS, resultado análogo a lo reportado por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia (2004) al fitorremediar un suelo contaminado con petróleo, sembrado con *Mimosa priga* donde el PFA de esta fue inferior al alcanzado en el suelo sin contaminar.

El cuadro 6 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre el PFR a floración del *Z. mays/A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii*, sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un PFR de 19.22 g, superior al alcanzado por su homólogo el CR que mostro un PFR de 18.73 g, y que el control vegetal 1 que obtuvo 14.98 g en su PFR, lo anterior sugiere que la BS con LC proporcionó minerales como N, P, K y micronutrientes para el crecimiento del *Z. mays* (Durán y Henríquez, 2007) y la inoculación de la semilla con *A. vinelandii* estimulo el crecimiento vegetal, mediante la conversión de exudados de la semilla y radicales en sustancias promotoras del crecimiento vegetal (SPCV) (Díaz *et al.*, 2000). Por el contrario la gramínea sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) muestran un PFR de 6.38 y 6.54 respectivamente, los resultados anteriores fueron inferiores a los valores registrados por el *Z. mays* usado como CR, al respecto se ha reportado el efecto fitotóxico de los HC y demás componentes de la GAS, esto debido a su hidrofobicidad y viscosidad con lo que se forma una película en el suelo que

se adhiere a la raíz e impide el intercambio gaseoso y con ello se crea un ambiente anaeróbico que causa la lisis de las membranas de las raíces del *Z. mays* y la inhibición de su crecimiento (Peña-Castro *et al.*, 2006)

El cuadro 6 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre el PSA a floración del *Z. mays*/*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii*, sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,000 ppm (T2) registro un PSA de 5.79 g, superior al alcanzado por su homólogo el CR que mostro un PSA de 4.49 g, y que el control vegetal 1 que obtuvo 1.92 g en su PSA, estos resultados sugieren que la inoculación de *A. vinelandii* y la aplicación de la LC para BS o como enmienda promovieron el crecimiento sano del *Z. mays* en suelo contaminado con GAS, con un PSA superior al usado como CR que se estableció en suelo sin contaminante y se le proporciono una condición nutricional adecuada. Por el contrario la gramínea sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) muestran un PSA de 0.96 y 0.84 respectivamente, lo anterior muestra un efecto negativo de los HC de la GAS en suelo con gramíneas como lo reportan Sangabriel *et al.*, 2006, en la disminución del PSA total de un pasto, aunque también señala que las gramíneas tienden a ser más tolerantes a los HC en suelo comparadas con las leguminosas.

El cuadro 6 muestra el efecto de la BR de un suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, sobre el PSR a floración del *Z. mays*/*A. vinelandii* y sembrado en el mismo suelo para su FR. El *Z. mays* inoculado con *A. vinelandii*, sembrado en suelo con GAS, bioestimulado con LC a 60,00 ppm (T2) registro un PSR de 2.59 g, superior al alcanzado por su homólogo el CR que mostro un PSA de 2.07 g, y que el control vegetal 1 que obtuvo 1.85 g en su PSA, Lo anterior sugiere que la BS con LC para enriquecer con nutrientes y la acción conjunta de *A. vinelandii*

promovió el crecimiento radical en el *Z. mays*; al respecto se ha demostrado que esta BPCV sintetiza fitohormonas que modifican la morfología de la raíz e incrementan la formación de pelos radicales que favorecen la permeabilidad de iones aprovechables para el crecimiento de esta gramínea (Loredo-Osti *et al.*, 2004). Por el contrario la gramínea sembrada en suelo con GAS, bioestimulado con EFC y LC a 60,000 ppm (T1) y EFC con LC a 30,000 ppm (T3) mostraron un PSR de 1.85 y 0.84 respectivamente, estos resultados muestran un efecto fitotóxico especialmente por los HC aromáticos de la GAS (Balderas, 2013) sobre el *Z. mays* al impedir el intercambio gaseoso y colateralmente una deficiencia mineral en esta gramínea.

**Cuadro 7. Patrón de perfil de sensibilidad de *Azotobacter vinelandii* para su detección en la rizosfera de *Zea mays* en la fitorremediación del suelo contaminado con el remanente de la gasolina.**

Nombre de Antibiótico	Acrónimo	Concentración	<i>Azotobacter vinelandii</i> inoculado		<i>Azotobacter vinelandii</i> . Tratamiento 2	
			Resistencia	Sensibilidad	Resistencia	Sensibilidad
Cefalotina	CF	30 mcg		+		+
Ceftriaxona	CRO	30 mcg		+		+
Trimetropim-Sulfametoxazol	SXT	25 mcg		+		+
Cefotaxima	CTX	30 mcg		+		+
Netilmicina	NET	30 mcg		+		+
Pefloxacina	PEF	5 mcg		+		+
Nitrofurantoína	NF	300 mcg		+		+
Cloranfenicol	CL	30 mcg		+		+
Amikacina	K	30 mcg		+		+
Gentamicina	GE	10 mcg		+		+
Ampicilina	Am	10 mcg	-	0	-	0
Carbencilina	CB	100 mcg	-	0	-	0

Sensible = (+), Resistente = (-), Sin información = (0)

Se realizó un perfil de antibióticos para *Azotobacter vinelandii* para comprobar que el mismo *A. vinelandii* que se inoculo en la semilla en el tratamientos 2 fuera el mismo que se recuperaría de la raíz del *Z. mays* para atribuir a esta bacteria la acción benéfica de esta BPCV en el crecimiento del *Z. mays*.

**Cuadro 8. Densidad de la población bacteriana degradadora de gasolina de suelo contaminado con 10,000 ppm, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 6,000 ppm.**

Biorremediación/Bioestimulación	$\frac{\text{Unidades formadoras de colonias (UFC)}}{\text{g de suelo biorremediado}} \times 10^4$
Suelo Control Relativo Solución Mineral 100%	5.22 <sup>d</sup>
T1 suelo + gasolina 10,000 ppm +extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	23.40 <sup>c</sup>
T2 suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm	73.00 <sup>a</sup>
T3 suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico +lombricomposta 30,000 ppm	24.6 <sup>b</sup>

Promedio de 3 muestras. T = tratamiento \*Valores con letras distintas muestran diferencia estadística significativa según Tukey (P<0.05)

En el cuadro 8 se muestra el efecto de la biorremediación (BR) de suelo por bioestimulación (BS) con extracto fúngico crudo (EFC) y lombricomposta (LC) en la densidad de la población bacteriana degradadora de GAS (PBDGAS). La PBDGAS fue mayor en suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS y biorremediado con LC a 60,000 ppm con  $73.00 \times 10^4$  UFC/g debido a que la LC proporcionó más minerales necesarios para el crecimiento de la microbiota

oxidante de GAS (Feliú-Mójer, 2006; Rodríguez, 2005; Rojas, 2009). La PBDGAS de suelo contaminado con GAS 10,000 ppm biorremediado con LC 30,000 ppm y EFC y la del suelo BR con LC a 60,000 ppm y EFC fueron semejantes con  $24.60 \times 10^4$  y  $23.40 \times 10^4$  UFC/g respectivamente, menor a la PBDGAS del suelo BR únicamente con LC, lo que sugiere que al agregar EFC las enzimas extracelulares hidrolizaron la fracción aromática de la GAS y la presencia de esporas estimuló el crecimiento de los hongos que compitieron por los minerales con las bacterias como señala Sánchez-Yáñez (2007) que el potencial enzimático que tienen los hongos codificado en su genoma, tienen incluso uso para eliminar xenobióticos que dañan el equilibrio natural y flores que entre los organismos del suelo se produce una gran competencia por el N, los microorganismos que poseen capacidad enzimática mayor son los que más nitrógeno absorben, dentro de este grupo están las bacterias seguidas de los hongos. Mientras que en suelo sin bioestimar usado como control relativo (CR) la ausencia de nutrientes esenciales para la PBMARA ocasionó una disminución en su densidad y absoluto (CA) la PBMARA aumentó en respuesta a la adición de agua y a la ausencia de ARA. En suelo no contaminado con GAS en el CR, la PBDGAS fue la que tuvo un valor menor con  $5.22 \times 10^4$  UFC/g debido a la ausencia de nutrientes y a que no se adicionó GAS, este resultado concuerda en magnitud con los valores en el orden de  $10^3$  a  $10^4$  bacterias degradadoras por gramo de suelo seco para suelos no contaminados, reportados por Rosenberg (2006), mientras que para suelos con contaminación crónica se elevan hasta 4 órdenes de magnitud de  $0.7 \times 10^8$  a  $28.2 \times 10^8$  UFC/g como reporta Alghazawi *et al.*, (1987) lo cual no coincide con los resultados obtenidos debido a que la contaminación con GAS no fue un permanente. La LC estimuló mejor a la PBDGAS en relación con el efecto de la SM por la mayor diversidad de compuestos orgánicos e inorgánicos presentes en ella, que estimularon mejor a la microbiota

mineralizadora de GAS, mientras que la SM cuyos componentes sólo inorgánicos limitaron la actividad bacteriana en comparación con la LC.

**Cuadro 9. Porcentaje de bacterias Gram positivas y Gram negativas de suelo contaminado con 10,000 ppm de gasolina, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm**

Biorremediación/Bioestimulación	Gram positivas Por ciento (%)	Gram negativas (%)
Suelo Control Relativo Solución mineral 100 %	0	100
T1 suelo + gasolina 10,000 ppm +extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	18.19	81.81
T2 suelo + gasolina 10,000 ppm +extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	9.10	90.9
T3 suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	0	100

Promedio de 3 muestras. T = tratamiento

La tendencia en los suelos contaminados con GAS sometidos a BR fue la prevalencia de bacterias Gram negativas. Por lo tanto el porcentaje (%) de bacterias Gram positivas es del 11.11% mientras que las bacterias Gram negativas están en un porcentaje mayor 88.88%.

Deshusses (1994) señala que los géneros de bacterias más comúnmente identificados en biofiltros para la degradación de GAS son: *Pseudomonas* spp (Gram negativa), *Rhodococcus* spp (Gram positiva), *Hyphomicrobium* spp (Gram negativa), *Mycobacterium* spp (Gram positiva), *Flavobacterium* spp (Gram negativa), *Nocardia* spp (Gram positiva), *Thiobacillus*



spp (Gram positiva), por lo que sería posible encontrar alguno (s) de estos géneros de bacterias degradadoras de GAS en los suelos biorremediados, principalmente bacterias Gram negativas.

**Cuadro 10. Formas microscópicas observadas con tinción Gram de las bacterias oxidantes de gasolina presentes en el suelo contaminado con 10,000 ppm de esta mezcla y biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm**

Biorremediación/Bioestimulación	Gram negativas				Gram positivas
	Bacilos cortos	Bacilos largos	Cocos	Cocobacilos	Bacilos esporulados
Suelo Control Relativo	10	0	0	0	0
T 1: suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	2	6	1	0	0
T2: suelo + gasolina 10, 000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm	6	2	2	0	1
T 3: suelo + gasolina 10, 000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	8	1	1	1	0
Total	31	10	5	2	6

Promedio de 3 muestras. T = tratamiento

**Cuadro 11. Morfología macroscópica dominante de las colonias bacterianas oxidantes de gasolina cuantificadas en suelo contaminado con 10,000 ppm de esta mezcla, biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60.000 ppm.**

Biorremediación/Bioestimulación	Forma	Color	Bordes	Brillo	Tamaño (mm)
Suelo Control absoluto	Circular	Dorado-beige	Entero	Sí	3
T1 suelo + gasolina 10,000 ppm + lombricomposta 60,000 ppm	Circular	Dorado-beige	Entero	Sí	2
T2 suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	Circular	Blanco-beige	Entero	No	4
T3 suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	Circular	Dorado-beige	Entero	Sí	2

Promedio de 3 muestras. T = tratamiento

**Cuadro 12. Densidad de la población fúngica degradadora de gasolina de suelo biorremediado con extracto fúngico crudo y lombricomposta a 30,000 y 60,000 ppm.**

Biorremediación/Bioestimulación	$\frac{\text{Propágulos fúngicos}}{g} \times 10^2$
Suelo Control Relativo Solución Mineral 100 %	0 <sup>c</sup>
T1 suelo + gasolina 10,000 ppm +extracto fúngico crudo + lombricomposta 60,000 ppm	2.00 <sup>b</sup>
T2 suelo + gasolina 10,000 ppm +lombricomposta 60,000 ppm	0 <sup>c</sup>
T3 suelo + gasolina 10,000 ppm + extracto fúngico crudo + lombricomposta 30,000 ppm	13.00 <sup>a</sup>

Promedio de 3 muestras. T = tratamiento. Letras distintas con diferencia estadística significativa (P<0.05) según Tukey.

En el cuadro 12 se muestra el efecto de la BR de suelo por BS con EFC y LC en la densidad de la población fúngica degradadora de GAS (PHDGAS). El valor mayor de PHDGAS se obtuvo en el suelo BR con EFC y LC a 30,000 ppm con  $13.00 \times 10^2$  propágulos fúngicos/g. Sánchez-Yáñez (2007) señala que los cálculos de la población de hongos en cualquier suelo con base en la CVP tiene severas críticas ya que las colonias que crecen sobre el agar provienen de un derivado de la espora, de un fragmento de micelio vegetativo, en la naturaleza se desconoce bajo qué estado fisiológico latente o activo estaba la unidad fúngica viable en la muestra original, por lo cual el solo agitar el tubo de la dilución causa un error al estimar la población

fúngica ya que la agitación rompe el micelio y los cuerpos que contienen esporas en un número indeterminado de fragmentos, cada uno de los cuales genera una colonia. En el suelo BR con EFC y LC 60,000 ppm se observa un crecimiento mínimo de hongos, en contraste con el CA y el suelo BR únicamente con LC 60,000 ppm donde no se observó crecimiento, lo que sugiere que la ausencia del EFC no estimuló su crecimiento.

## **9. Conclusión**

La biorremediación de suelo contaminado con 10,000 ppm de GAS, mediante un EFC y LC seguida de la posterior fitorremediación del mismo suelo con *Z. mays*/*Azotobacter vinelandii* para la GAS remanente fue una opción para su recuperación. Mientras que se demostró que la biorremediación con EFC y LC favoreció una amplia diversidad de una microbiota con capacidad para mineralizar la GAS, lo cual aceleró su recuperación con la fitorremediación.

## **10. Literatura citada:**

- 1) Alghazawi, Z., Saadoun, I., Alshak'ah, A. (1987). Selection of bacteria and plant seeds for potential use in the remediation of diesel contaminated soils. *J Basic Microbiol* [Abstract], 45:251-256.
- 2) Armendáriz. B., Dolores Castañeda-A., Castellanos G., Jiménez-SalgadoT., Tapia-Hernández A., y Martínez-Carrera F. 2011. Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. *Terra Latinoamericana* 29: 95-102.
- 3) Asquith E., Geary M., Nolan A., Evans C. 2012. Comparative Bioremediation of Petroleum Hydrocarbon-Contaminated Soil by Biostimulation, Bioaugmentation and Surfactant Addition. *Journal of Environmental Science and Engineering Part A* 1: 637-650.
- 4) Balderas, I. (2013). Biorestauración de un suelo contaminado con aceite residual automotriz al 7.5% con solución mineral, abono verde y fitorremediación con sorgo. . Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Tesis (inérita) de licenciatura de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán México.
- 5) Boschini C. F., & Amador A. R., 2000. Fenología productiva y nutricional de maíz para la producción de forraje. *Agronomía Mesoamericana* 11:171-177.
- 6) Carpena, R. O., Bernal, M. P. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*. 16: 1-3.
- 7) Castillo G., Altuna B., Michelena G., Sánchez-Bravo J., & Acosta M., (2005). Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.

- 8) Cruz-Sánchez, J. S., López-Ortiz, C., Mendoza-López, M. R., Delgadillo-Martínez, J., Ferrera-Cerrato, R., Trejo-Aguilar, D., & Alarcón, A. (2007). Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo usando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 41(8): 817-826.
- 9) Chaîneau, C. H., J. L. Morel y J. Oudot. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26:1478-1483
- 10) Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J. R., Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 14: 597-612.
- 11) Deshusses, M. (1994). Biodegradation of mixtures of ketone vapours in biofilters for the treatment of waste air. PhD thesis, Swiss Fed. Inst. Of Technol., Zurich, Switzerland. (Inédita).
- 12) Díaz, A., Suárez, C., Yoelkis, M., Ciro, E., Orrantia, I., Castro, P. 2000. Efecto de la aplicación de *Azotobacter chroococcum* (BFN) sobre el desarrollo de posturas de cafeto (*Coffea arabica* L). *Revista Centro Agrícola* 26:41-44.
- 13) Durán L. & Henríquez C. (2007). Caracterización química, física y microbiológica de vermicompostes producidos a partir de cinco sustratos orgánicos. *Agronomía Costarricense* 31: 41-51.
- 14) Feliú-Mójer, M. (2006). Lombricomposta: nueva práctica para ayudar a conservar nuestros suelos. *CienciaPR* (on line). [www.cienciapr.org/news\\_view.php?id=97](http://www.cienciapr.org/news_view.php?id=97).
- 15) Ferrera-Cerrato R., Rojas-Avelizapa N., Poggi-Varaldo H., 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

- 16) Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Trejo-Aguilar D., Sangabriel W., Mendoza-López M., Cruz-Sánchez J., López-Ortiz C. y Delgadillo-Martínez J. 2008. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826
- 17) Fernández C., Llobrega T. M., Jiménez B., Altomare V., Labrador H. 2008. Biodegradación de asfalteno y resinas por microorganismos presentes en suelo contaminado con hidrocarburo. *Revista de la Facultad de Ingeniería U.C.V.*, 23(4): 7–15.
- 18) García-González, M.M., Farías-Rodríguez, R., Peña-Cabriales, J.J., Sánchez-Yáñez, J.M. (2005)., Inoculación del trigo var. Pavón con *Azospirillum spp.* y *Azotobacter beijerinckii* . *TERRA Latinoamericana*, 23: 65-72.
- 19) García-Reyna, M., Farías, R., Sánchez-Yáñez, J. M. 2005. Burkholderia, endófito del teocinte promotora crecimiento de maíz. Disponible en: <http://www.monografías.com/trabajos33/burkholderia/burkholderia.shtml>
- 20) Gómez C. M., García G. C., Hernández A. & Ramírez P. (2007). La industria de la refinación de aceite mineral usado en Argentina Oportunidad de negocios con beneficio ambiental. Disponible en línea en [http://www.ucema.edu.ar/posgrado-download/tesinas2007/MADE\\_Hernandez.pdf](http://www.ucema.edu.ar/posgrado-download/tesinas2007/MADE_Hernandez.pdf), acceso Octubre, 2012.
- 21) Gómez Wilmar, Gaviria Jair, Cardona Santiago *et al.*, 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diesel. *Dyna*; 160: 83-93
- 22) Hernández-Rodríguez O.A., Ojeda- Barrios D.O., López D.J.C., & Arras V.A.M. (2010). Effect of organic fertilizer on physical, chemical and biological soil properties. *Tecnociencia Chihuahua*. 1:1-6.

- 23) Hernández-Valencia I., & Mager D., (2003). Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano; Bioagro; 15: 149-155.
- 24) Instituto Mexicano del Transporte (2004). Medidas de Mitigación para uso de Suelos Contaminados por Derrames de Hidrocarburos en Infraestructura de Transporte Terrestre, Publicación técnica N°257, México.
- 25) Juárez, G. (2012). Biorremediación y fitorremediación de un suelo contaminado con aceite residual automotriz. Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Tesis de licenciatura de Químico Farmacobiología. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán México. (inérita)
- 26) Laura J., & Castellanos P. 2009. «Lignin-degrading filamentous fungi isolated from *Calamagrostis nitidula* Pilg.» Rev. Peruana de Biología., 16(1): 125- 128.
- 27) Maldonado-Chávez E., Rivera-Cruz M., Izquierdo-Reyes F., Palma-López D. 2010. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. Universidad y Ciencia 26: 121-136.
- 28) Leal, M. (2003). Biorremediación de un suelo agrícola contaminado con aceite residual automotriz. Tesis Doctorado (Inédita). Universidad de Colima, PICAFA. México. Recuperado de: [http://digeset.ucol.mx/tesis\\_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf](http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Maribel%20Leal%20Castillo.pdf)
- 29) Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente, 2001. Diario Oficial de la Federación. SEMARNAT. Disponible en línea: [http://www.cnsns.gob.mx/acerca\\_de/marco/reglamentos/equilibrio\\_ecologico\\_impacto\\_ambiental.pdf](http://www.cnsns.gob.mx/acerca_de/marco/reglamentos/equilibrio_ecologico_impacto_ambiental.pdf).



- 30)** Loredó-Ostí, López-Reyes, Espinosa-Victoria, (2004). Bacterias promotoras del crecimiento vegetal asociadas con gramíneas. *Revista: Terra Americana*. 22 : 65-72
- 31)** Manzano-Agugliaro, F., Escobedo, Q. H., & Sierra, A. Z. (2010). Aprovechamiento del estiércol de vacuno para la biorremediación ex situ de suelos contaminados por diésel en México. *Producción Vegetal*. 106(3): 197-207.
- 32)** Moreno R. A. (2005). Origen, importancia y aplicación de vermicomposta para el desarrollo de especies hortícolas y ornamentales Departamento de Suelos, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Disponible en línea en <http://uaaan.mx/academic/Horticultura/Memhort05/vermicomposta.pdf> acceso en Octubre 2014.
- 33)** Natera-Méndez, J.R., Roque C., Zapata K., & Otahola-Gómez V.A. (2004). Efecto de la concentración y tiempo de emergencia de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.)cv. *Rev. UDO Agrícola* 4:66-71.
- 34)** Nazareno Saparrat, M. C., Martínez, M.J., Alfio Tournier, H., Cabello, M.N., & Arambarri, A.M., 2000. «Production of ligninolytic enzymes by *Fusarium solani* strain isolated from different substrata.» *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 16(9): 799-803.
- 35)** Nuñez E., Fonseca E. Almazán, Cabrales Y., Miranda A. 2005. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Contribución a la Educación y la Protección del Medio Ambiente* 6: 51-60.
- 36)** Pardo C.J.L., Perdomo R. MC., L. Benavides J., 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *NOVA*, 2 : 40-49.
- 37)** Pasaye A.L., 2011. Biorremediación de un suelo impactado con aceite residual automotriz. . Laboratorio de Microbiología Ambiental, Instituto de Investigaciones Químico Biológicas. Tesis

(inérita) de maestría en Ingeniería Ambiental. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Michoacán México. Disponible en línea en [http://scholar.google.com.mx/scholar?q=Biorremediaci%C3%B3n+de+un+suelo+impactado+con+aceite+residual+automotriz&btnG=&hl=es&as\\_sdt=0](http://scholar.google.com.mx/scholar?q=Biorremediaci%C3%B3n+de+un+suelo+impactado+con+aceite+residual+automotriz&btnG=&hl=es&as_sdt=0)

- 38) Pérez A., Céspedes C., & Núñez P., (2008). Caracterización física-química y biológica de enmiendas orgánicas aplicadas en la producción de cultivos en República Dominicana. *J. Soil Sc. Plant Nutr.* 8 : 10-29
- 39) Pineda-Flores, G., & Mesta-Howard, A.M. 2001. «Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms.» *Rev. Latinoamericana de Microbiología*, 43(3): 143-150.
- 40) Plaza, G., Nalecz-Jawecki, G., Ulfig, K., and Brigmon, R. L. (2005). 'The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation', *Chemosphere* 59: 289-296.
- 41) Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E., Fernández-Linares, L., Ruiz-Medrano, R., & Xoconostle-Cázares, B. (2006). Isolation and identification of up-regulated genes in bermudagrass roots (*Cynodon dactylon* L.) grown under petroleum hydrocarbon stress. *Plant science*, 170(4): 724-731.
- 42) Petenello, M.C., Feldman, S.R., Agrarias, U.N.R, & Zavalla, A. (2012). Evaluación de la tolerancia a suelos contaminados con aceite diesel en especies vegetales con potencial biorremediado. *Acta Biológica Colombiana* 17(3): 589-598.
- 43) Rahman, K.; Rahman, S; Lakshmanaperumalsamy, P.; Marchant, R.; Banat, R. 2003. The potential of bacterial isolates from emulsification with a range of hydrocarbons. *Acta Biotecnológica* 23: 335-345.

- 44) Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelo con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 20: 369-376.
- 45) Rodríguez, S., Fernández, M., Bermudez, R.C., & Morris, H., 2003. «Tratamiento de efluentes industriales coloreados con *Pleurotus* spp.» *Rev. Iberoamericana de Micología*, 20(4): 164-168
- 46) Rodríguez Lozano, G. (2005). Potencial reproductivo de *Eisenia foetida* (Savigny 1826) en diferentes sustratos de materia orgánica. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México. Tesis de Maestría (Inédita).
- 47) Rojas Alba, J. D. (2009). Lumbricultura sustentable; ed. 5ª, Ed. UAM, en: Tecnologías para el desarrollo sustentable serie No. 1; Pp: 6-67. México. Universidad Autónoma Metropolitana. Distrito Federal, México (Inédito).
- 48) Rojas Contreras, A., Rodríguez Dorantes, A., Montes Villafán, S., Pérez Jiménez, S., Rodríguez Tovar, A., Guerrero Zúñiga, L. A. (2010). Evaluación de la promoción del crecimiento de *Cynodon dactylon* L. por rizobacterias productoras de fitohormonas aisladas de un suelo contaminado con hidrocarburos derivados del petróleo. *Polibotánica*, 29: 131-147.
- 49) Rosenberg, E. (2006). Hydrocarbon-oxidizing organisms. *Prokaryotes* 2: 564-577.
- 50) Quiñones-Aguilar E., Ronald Ferrera-Cerrato R., Gavi-Reyes F. Fernández-Linares L., Rodríguez-Vázquez R., y Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37: 585-594.
- 51) Sánchez-Yáñez, J.M. 2007. Breve Tratado de Microbiología Agrícola Teoría y Práctica. COSUSTENTA, CIDEM, IIQB/UMSNH, ISBN 978-970-95424-1-7, Morelia, Mich. pp. 130-133, 136-138, 153-155.
- 52) Sánchez-Yáñez, J. M. (2007). Los hongos fundamentales en la fertilidad y productividad del suelo. Disponible en: <http://www.monografias.com/trabajos45/hongos/hongos.shtml>.

- 53) Sánchez-Yañez, J. M. (2008). Biorremediación (Antología). Ed. Secretaría de Difusión Cultural y Extensión Universitaria. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Centro de Investigación y Desarrollo del Estado de Michoacan, Bionutra, SA de CV. Morelia, Mich, México.
- 54) Sangabriel W., Ferrera-Cerrato R., Trejo-Aguilar D., Mendoza-López M. R., Cruz-Sánchez J. S., López-Ortiz C., Delgadillo-Martínez J., y Alarcón A. 2006. Tolerancia y fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo por seis especies vegetales. Revista internacional de contaminación ambiental 22: 63-73.
- 55) Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). Stress physiology. Plant physiology, 4.
- 56) Torres, K., Zuluaga, T. 2009. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Tesis de grado en Ingeniería Química. Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia (inédita)
- 57) Troya, T. Muñoz-Mingarro, D., y Llinares, F., 2000. «Detección de actividades enzimáticas lignocelulolíticas de *Chaetomium spp.*» Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales, 9(1): 89-99.
- 58) Vallejo V., Salgado L., & Roldan F. 2005. Evaluación de la bioestimulación en la biodegradación de TPHs en suelos contaminados con petróleo. Biotechnol, 7: 67-78.
- 59) Vidali, M., 2001 «Bioremediation.» Pure and Applied Chemistry; 73 (7): 1163–1172.
- 60) Walpole E.R., Myers R., Myers LS., (2007). Probabilidad & Estadística para Ingeniería & Ciencias. Ed. Pearson, 8ª, ISBN: 13:978-970-26-0936-0.