



Casa abierta al tiempo

*UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA*

UNIDAD I ZTAPALAPA
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE PLANTAS POTENCIALMENTE
REMEDIADORAS DE SUELOS PANTANOSOS CONTAMINADOS POR
HIDROCARBUROS.

TESIS QUE PRESENTA LA

HIDROBIÓLOGA ADRIANA GOMEZ SANTOS.

PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTORA

DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS MARTÍNEZ

ASESOR INTERNO

DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

ASESOR EXTERNO

DRA. ALMA DELFINA LUCIA OROZCO SEGOVIA

México, D. F.

DI CIEMBRE, 2003.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, formó parte del padrón de programas de Postgrado de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología con el número de registro: 309-0 y actualmente se encuentra en el padrón de programas de PI FOP - CONACYT clave C/PFPN - 2002-35-32.

El presente trabajo fue realizado gracias a la beca-crédito otorgada por CONACYT con el número 163945/173469.

ANÁLISIS Y SELECCIÓN DE PLANTAS POTENCIALMENTE
REMEDIADORAS DE SUELOS PANTANOSOS CONTAMINADOS
POR HIDROCARBUROS.

TESIS QUE PRESENTA LA

HIDROBIÓLOGA ADRIANA GOMEZ SANTOS.

Para optar por el grado de:

MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

TUTORA

DRA. MARGARITA ELIZABETH GALLEGOS MARTÍNEZ

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD I ZTAPALAPA

COMITÉ TUTORIAL:

TUTORA

Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez
Laboratorio de Ecosistemas Costeros
Departamento de Hidrobiología
UAM-I
mgm@xanum.uam.mx

COTUTOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Laboratorio de Residuos Sólidos
Departamento de Biotecnología
UAM-I
mgr@xanum.uam.mx

ASESOR EXTERNO

Dra. Alma Delfina Lucía Orozco Segovia.
Laboratorio Ecología Funcional
Instituto de Ecología
UNAM
aorozco@miranda.ecologia.unam.mx

Este trabajo esta dedicado con todo mi amor:

- A **Susana** y **Gustavo** por darme la vida y enseñarme a perseverar para conseguir mis metas.
- A **Flor**, **Fernando** y **Bernarda** por haber sido grandes cimientos en mi vida.
- A **Irene** por seguir siendo un gran ejemplo.
- A mis hermanos **Marco** y **Maye** por ser los mejores.
- A **Víctor** por su amor y el apoyo que me ha ofrecido incondicionalmente no solo en esta meta sino en muchas mas.
- A mis hijos **Krizia** y **Patricio**, por aguantar el trabajo de su madre y la elaboración de esta tesis. Por ser el motor que me impulsó a conseguir esta empresa.

INDICE

	Página
1. RESUMEN	8
2. INTRODUCCIÓN	9
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
4. OBJETIVOS	14
5. HIPÓTESIS	14
6. MATERIALES Y MÉTODOS	15
6.1. Sitio de trabajo y acopio de especies	15
6.2. Bioensayo	15
6.2.1. Germinación de semillas	15
6.2.2. Preparación de soporte	16
6.2.3. Producción y manejo del inóculo	17
6.2.3.1. Hongos	17
6.2.3.2. Bacterias	18
6.2.4. Tasa de crecimiento de las hojas	18
6.2.5. Tasa de crecimiento de las raíces	18
6.3. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo.	19
6.4. Experimento de Fitorremediación	20
6.4.1. Unidades experimentales del experimento de fitorremediación	20
6.4.2. Estrategia experimental	21
6.4.3. Características fenológicas	23
6.4.4. Obtención de exudados	23
6.5. Otras determinaciones	24
6.5.1. Fenoles	24
6.5.2. Glucosa	25
6.5.3. Aminoácidos	25
6.6. Análisis microbiológicos	25
6.7. Eficiencia de remoción de hidrocarburos	25
6.8. Análisis estadístico	26

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
7.1. Bioensayos	26
7.2. Experimento de fitorremediación	28
7.2.1. Características fenológicas	28
7.3. Cuantificación de exudados	33
7.3.1. Fenoles	34
7.3.2. Glucosa y aminoácidos	36
7.4. Análisis microbiológicos	37
7.5. Eficiencia de la fitorremediación	38
7.6. Criterios de selección	39
8. CONCLUSIONES	42
9. RECOMENDACIONES	43
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1. RESUMEN

El presente trabajo se realizó para atender la necesidad de encontrar una técnica rápida que permitiera evaluar la eficiencia de remoción de hidrocarburos en suelos por plantas que se localizan en lugares contaminados. El lugar de estudio fue una zona pantanosa contaminada con hidrocarburos desde hace más de 20 años, localizada en el sur del estado de Veracruz en las proximidades de una refinería en operación. Los objetivos del trabajo fueron seleccionar plantas con capacidad fitorremediadora y el efecto de la adición de un inóculo de microorganismos degradadores de hidrocarburos. Para lograr los objetivos, los experimentos se dividieron en dos: bioensayos y fitorremediación. Se trabajó con las siguientes cuatro especies de plantas nativas: *Cyperus laxus* Lam., *Cyperus ligulatus* L., *Cyperus. digitatus* (Roxburgh) y *Echinocloa colonum* (L) Link. Para los bioensayos se evaluó el efecto de la presencia de diferentes concentraciones de hidrocarburos (0, 1, 2, 3, 4 y 5 %). En los experimentos de fitorremediación se evaluaron: características fenológicas, tasa de crecimiento de raíces y hojas y la cantidad de fenol exudado y la eficiencia fitorremediadora para cada especie, todo esto en presencia y ausencia de un inóculo previamente aislado de la rizósfera de *Cyperus laxus*. Los bioensayos se realizaron en frascos de 400 ml y los ensayos de fitorremediación en unidades experimentales de vidrio (30 x 20 x 15 cm) en todos los casos se utilizó agrolita como soporte modelo bajo condiciones de invernadero. Todas las especies fueron cultivables hasta 0.5% de hidrocarburos, al aumentar la concentración la tasa de crecimiento disminuyó. *Cyperus laxus* fue la especie más resistente Se demostró que la presencia del inóculo incrementó la eficiencia de fitorremediación, hasta en cinco y diez veces para *Cyperus ligulatus* (15.51) y *Echinocloa colonum* (13.71), respectivamente *Cyperus laxus* fue la especie mas eficiente en ausencia de inóculo.

Finalmente se encontró que la producción de fenol es un parámetro claro para la selección de plantas fitorremediadoras.

2. INTRODUCCIÓN

La extracción de petróleo crudo para satisfacer los requerimientos de energía mundial es de 65 millones de barriles por día, con lo cual, se incrementa el peligro de una descarga accidental al medio ambiente (Nicolotti y Egli, 1998). La actividad petrolera de nuestro país, que se incluye transportación, almacenamiento, transformación del petróleo, fugas o descargas accidentales, así como la disposición de recortes de perforación, lodos aceitosos y aceites lubricantes gastados, representa una fuente importante de contaminación (I turbe, *et al* 2002). Para controlar o tratar los suelos contaminados se han empleado varias técnicas de biorremediación, en las que se incluyen aplicación de calor, surfactantes o ácidos y manipulación física. Sin embargo, estos procesos tienen un alto costo y no resuelven del todo el problema (Anderson, *et.al.* 1993). Uno de los procesos de remediación que contribuyen a resolver estos problemas es la biorremediación que es la técnica que emplea seres vivos para la limpieza de sitios contaminados, éstos se estimulan con la adición de nutrientes y aeración para transformar compuestos químicos contaminantes a sustancias menos tóxicas (Bandyopadhyay *et.al.* 1994; Cunningham, y Ow, 1996). Dentro de las tecnologías de biorremediación de suelo o agua se encuentra la fitorremediación que es el uso de plantas que limpian o eliminan contaminantes, como los metales y/o contaminantes orgánicos, HAP, solventes, hidrocarburos, pesticidas), mediante reacciones químicas energizadas por la luz solar (Vogel, *et.al.* 1987). La fitorremediación es una técnica alternativa de bajo costo (Anderson, *et.al.* 1993). Esta técnica aprovecha la habilidad de las plantas de extraer y/o mineralizar xenobióticos del medio ambiente

En numerosos estudios se reporta que los niveles de contaminantes se reducen más rápidamente en suelos con plantas, que donde se carece de ellas (Gunther, *et al.* 1996; Liste y Alexander, 2000). También se ha demostrado que las plantas aumentan la remoción de los contaminantes orgánicos en la zona de la rizósfera (Reilley, *et al.*, 1996, Hutchinson *et al.* , 2001)

Uno de los mecanismos que se propone para explicar la remediación de contaminantes

es que las plantas excretan sustancias orgánicas a las que se denomina mucigel, que favorece el enriquecimiento de las poblaciones quimiorganotróficas en la rizósfera (Hsu y Bartha, 1979). Los exudados de la raíz influyen en el tipo de interacciones entre las plantas y los microorganismos del suelo. Una interacción “específica” es cuando los exudados son específicos en respuesta al contaminante presente. La interacción “no específica” es cuando el exudado de la planta es químicamente similar al contaminante orgánico, dando como resultado un incremento en la actividad microbiana y un incremento en la degradación de los contaminantes (Frick *et al.*, 1999).

La cantidad y calidad del mucigel producido por las raíces, depende de la especie de la planta, tipo de suelo y edad de la raíz (Foster, 1982). Este mucigel estimula el crecimiento de los microorganismos de las raíces, incrementando las tasas de biodegradación. A este fenómeno se le conoce como efecto rizósfera (Ferrera-Cerrato, 1989; Cunningham y Ow, 1996).

La rizósfera es la zona del suelo circundante a la raíz de la planta que contiene de 10 a 100 veces más exudados que un suelo sin plantas (Curl y Truelove, 1986; Meharg, *et al.* 1997). Los exudados de la raíz (azúcares, alcoholes, ácidos y enzimas) proveen suficiente carbono y energía para los microorganismos rizosféricos (Schnoor, *et al.*, 1995). Walton *et al.* (1994), sugieren que cuando hay estrés producto de xenobióticos en el suelo, la planta puede responder con el incremento o cambio de exudados, lo cual modifica la microflora rizosférica en composición o actividad, dando como resultado la remediación de sitios contaminados.

La rizósfera es una región en donde se presentan intensas y complejas interacciones entre el sistema de raíces, los microorganismos y el medio ambiente, con un incremento de la actividad microbiana total como resultado (April y Sims, 1990; Anderson *et al.* 1993). El potencial de bioremediación de la rizósfera está limitado a la cantidad de suelo que esté en contacto con la raíz (Meharg, *et al.* ,1997), y al posible movimiento de los hidrocarburos hacia las raíces de las plantas (Liste y Alexander, 2000).

Por lo anterior se asume que la vegetación idónea para la biorremediación de lugares contaminados debe presentar raíces continuas, profundas y fibrosas; que estimulan la degradación y desintoxicación de químicos orgánicos tóxicos y recalcitrantes (Aprill y Sims, 1990, Sung, K. *et al.* 2002). La cubierta vegetal además de contribuir a la limpieza de lugares contaminados, tiene los siguientes atributos ecológicos:

- Protege el suelo contra la erosión.
- Estabiliza el suelo, reduciendo el transporte de contaminantes.
- Reduce el movimiento de contaminantes solubles en agua.
- Distribuye la materia orgánica en el suelo.
- Mejora la aireación.
- Mejoran las propiedades físicas y químicas del suelo.
- Distribuye a los microorganismos a través del suelo.
- Incrementa la actividad microbiana.
- Incrementa el contacto entre las asociaciones de microorganismos con la raíz y los compuestos tóxicos en el suelo contaminado.

Los pastos que son plantas con crecimiento modular y con raíces fibrosas de forma continua, lo que origina una densa rizósfera son el tipo de vegetación ideal para fitorremediar. Rivera-Cruz *et al.* (2002) observaron un incremento significativo en las poblaciones microbianas en suelos afectados por derrames crónicos de petróleo, encontrando que los hongos y las bacterias aislados de estos suelos poseen potencial para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos poliaromáticos.

Los mecanismos que se reconocen en la fitorremediación, son los siguientes:

FITODEGRADACIÓN: Se refiere a la participación de enzimas que se encuentran dentro de la planta provocando reacciones químicas y degradación de contaminantes (Travis y Hattermer-frey, 1988).

FITOEEXTRACCIÓN: Es la captación de contaminantes por la raíz y su traslocación dentro de las plantas, sin reacción. Estos contaminantes son removidos cuando se cosecha la planta y puede ser quemada en incineradores especiales. (U.S. EPA/2000)

RIZOFILTRACIÓN: Es similar a la fitoextracción, pero en este caso los contaminantes se acumulan en la raíz sin traslocación. Se ha usado en medios hidropónicos, en aguas residuales o en descargas de fábricas y también se requiere cosechar las raíces (U.S. EPA/600, Cunningham, *et al.*, 1996).

FITOVOLATILIZACIÓN: Se refiere a la absorción de agua y contaminantes que se fitotransforman hasta moléculas volátiles que se eliminan a través de las hojas (Paterson, *et al.*, 1994).

BOMBA HIDRAULICA: Se refiere a ciertas plantas con raíces densas que se extienden hacia el manto acuífero y que absorben agua para controlar la migración lateral y vertical de los contaminantes y el gradiente hidráulico.

La fitorremediación asegura eliminar los residuos peligrosos del suelo, mediante la degradación y mineralización.

La fitorremediación ha demostrado ser factible, en hidrocarburos además en otras sustancias como TNT (Pavlostathis, *et al.*, 1998; Larson *et al.*, 1999), insecticidas (Hsu y Bartha, 1979; Garrison *et al.*, 2000), radionucleótidos (Gouthu *et al.*, 1999) y pesticidas (Wilson *et al.*, 1999).

Recientemente se ha incrementado el interés de utilizar plantas para remediar sitios contaminados, pero es necesario evaluar cuales son las especies óptimas para la limpieza de los mismos (Thompson, *et al.*, 1998; Thompson, *et al.*, 1999; Liste, y Alexander, 1999). Por otro lado, se ha reconocido la capacidad y la participación de los microorganismos de la rizósfera (Díaz Ramírez, *et al.*, 2003) en la fitorremediación. Sin embargo hay pocos estudios del efecto de la adición de inóculos en la fitorremediación.

Con base en lo anterior en este trabajo se planteo el uso de la vegetación nativa de un pantano tropical, localizado en el estado de Veracruz. El pantano ha sido contaminado por más de 20 años y actualmente tiene elevadas concentraciones de hidrocarburos intemperizados provenientes de las instalaciones petroleras adyacentes.

En la zona de estudio se han realizado trabajos florísticos (Gallegos, *et al.*, 2000) que han permitido caracterizar el tipo de vegetación, la distribución y abundancia de las

especies vegetales que se enlistan a continuación:

FAMILIA	GÉNERO Y ESPECIE
BLECHNACEAE	<i>Blechnum serrulatum</i> Rich.
CYPERACEAE	<i>Cyperus articulatus</i> L.
	<i>Cyperus digitatus</i> (Roxburgh).
	<i>Cyperus laxus</i> Lam.
	<i>Cyperus ligulatus</i> L.
	<i>Cyperus megalanthus</i> (Kuk) G. Turker
	<i>Cyperus ochraceus</i> Vahl.
	<i>Cyperus papyrus</i> L.
	<i>Rhynchospora cyperoides</i> (Sw) Mart.
POACEAE	<i>Echinochloa colonum</i> (L.) Link
	<i>Paspalum arundinaceum</i> Poir.
	<i>Paspalum conspersum</i> Schrad.
	<i>Paspalum</i> aff. <i>secans</i> HitchEchinochloa & Chase
	<i>Paspalum virgatum</i> L.
	<i>Phragmites australis</i> (Cav.) Steud.
LEGUMINOSAE	<i>Mimosa pigra</i> L.
MARANTACEAE	<i>Thalia geniculata</i> L.
ONAGRACEAE	<i>Jussiaea suffruticosa</i> L.
PONTEDERIACEAE	<i>Pontederia sagitata</i> Persl
TYPHACEAE	<i>Typha dominguensis</i> Pers

De la lista anterior sólo se puede afirmar que estas especies se desarrollan en presencia de los contaminantes, pero no se ha esclarecido cuales de estas plantas son capaces de fitorremediar.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México se han identificado grandes pasivos ambientales, uno de ellos es un pantano tropical contaminado con hidrocarburos intemperizados, que presenta gran diversidad de vegetación. Para identificar y comprobar cuales de las plantas nativas del sitio tienen capacidad fitorremediadora, se necesita un enfoque de investigación multidisciplinaria con estudios detallados que permitan discriminar entre un gran número de plantas, cual es la más eficiente para la degradación de hidrocarburos y cómo se puede incrementar esta eficiencia. Esta es la principal motivación del trabajo, implementar un método y los criterios respectivos para seleccionar en este y otros sitios plantas eficientes en la remoción de hidrocarburos.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- Seleccionar plantas con capacidad fitorremediadora, nativas de un pantano tropical contaminado con hidrocarburos y el efecto de la adición de un inóculo en la eficiencia.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- Caracterizar el ciclo de vida de cada una de las especies en estudio, en condiciones de invernadero.
- Seleccionar y establecer técnicas y criterios que permitan identificar la capacidad fitorremediadora.
- Conocer el efecto de la adición de inóculo en la degradación de hidrocarburos.

5. HIPÓTESIS

Las plantas nativas que crecen en suelos contaminados con hidrocarburos tienen capacidad fitorremediadora, la cual podrá ser mejorada con la adición de microorganismos degradadores de hidrocarburos (I inóculo).

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Sitio de trabajo y acopio de especies

Las especies vegetales se colectaron en un pantano próximo a una refinería en operación, ha sido contaminado por más de 30 años. Se sitúa en Minatitlán Veracruz, el clima de la zona es de tipo ecuatorial con una temperatura que oscila entre los 23 y 30 °C La precipitación pluvial media anual es de 2,041 mm. Las lluvias más abundantes se registran entre Julio y Septiembre periodo que se inunda el sitio.

6.2. Bioensayo

Los siguientes bioensayos se llevaron a cabo para conocer las condiciones óptimas para los experimentos de fitorremediación: manejo y germinación de semillas, preparación del soporte hidropónico, preparación y manejo del inóculo y la concentración de hidrocarburos que permitiera medir las variables de respuesta correspondientes.

6.2.1. Germinación de semillas

Con base en la información obtenida acerca de la distribución y abundancia de las especies en el pantano se colectaron semillas de las seis especies más representativas que se enlistan a continuación:

- *Cyperus laxus* Lam.
- *Cyperus ligulatus* L.
- *Cyperus digitatus* (Roxburgh).
- *Rhynchospora cyperoides* (Sw) Smart
- *Echinochloa colonum* (L.) Link
- *Typha dominguensis* Pers

Las semillas se colocaron en una mezcla de turba-tezontle, para su germinación y obtener plántulas de un mes

6.2.2. Preparación del soporte

El sustrato empleado fue agrolita, que es una arena inerte de silicatos. Ésta fue tamizada para obtener un grano entre 1.19 y 4.76 mm; se lavó dos veces con agua caliente, una vez seca, se le adicionaron hidrocarburos (crudo Maya) a diferentes concentraciones iniciales de trabajo: 0, 2.5, 5, 10, 25, y 50 %.

El crudo Maya se sometió a un calentamiento (60 °C) durante 24 h hasta eliminar la fracción volátil. Después del calentamiento, se disolvió en acetona-hexano 1:1, la mezcla se asperjó uniformemente sobre la agrolita seca, se homogeneizó y los solventes se evaporar durante 2 días a temperatura ambiente.

El bioensayo se llevó a cabo en frascos de vidrio de 400 ml, como se muestra en la Figura 1, a los que se les adiciono 30 g de agrolita previamente contaminada con las concentraciones mencionadas.



Figura 1: Unidades experimentales utilizadas para los bioensayos.

Para mantener la humedad de las unidades experimentales, próxima al 80% y para proporcionar los nutrientes necesarios a las plantas, se utilizó la solución Long Ashton modificada. En la solución se incorporaron N, P y K, en una relación de 5.5/1/7.6 y los micronutrientes necesarios para el desarrollo de las

plantas. La composición de la solución Long Ashton modificada, fue la siguiente (en mg l⁻¹): KNO₃, 808; Ca(NO₃)₂ · 4H₂O, 944; NaH₂PO₄ · H₂O, 184; MgSO₄ · 7H₂O, 368. A cada litro de solución se le agregó 1 ml de una solución de oligoelementos con la siguiente composición (en mg l⁻¹): MnSO₄ · 4H₂O, 2.23; CuSO₄ · 5H₂O, 0.25; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.29; H₃BO₃, 3.10; NaCl, 5.90; (NH₄)₆Mo₇O₂₄ · 4H₂O, 0.088; FeSO₄ · 7H₂O, 0.02.

6.2.3. Producción y manejo del inóculo.

El consorcio microbiano, usado como inóculo esta compuesto por 10 cepas de bacterias (*Bacillus cereus*, *Pseudomonas* sp, *Gordonia rubripertincta*, *Kocuria rosea*, *Arthrobacter oxydans*, *Bacillus subtilis* A, *Bacillus subtilis* B, *Micrococcus luteus* y dos no identificadas) y tres cepas de hongos (*Penicillium janthinellum*, *Aspergillus carneus* y *Aspergillus terreus*). Estos microorganismos fueron aislados de la rizosfera de *Cyperus Laxus* Lam, y se seleccionaron por su capacidad de degradación de hidrocarburos. (Díaz-Ramírez et al., 2003).

6.2.3.1. Hongos

De cada cepa de hongos se tomó una muestra con un asa esterilizada y se cultivo en 25 ml medio de propagación (g l⁻¹): NaNO₃, 5.14; MgSO₄ · 7H₂O, 0.25, KCL, 0.50; KH₂PO₄, 12.8; K₂HPO₄, 1.0; glucosa, 2.0; extracto de levadura, 3.0 y 2 ml de la solución mineral siguiente (g l⁻¹): FeSO₄ · 7H₂O, 0.10; CuSO₄ · 5H₂O, 0.015; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.161; MnSO₄ · 7H₂O, 0.088. Se incubó por 96 h a 150 rpm a 30 °C Transcurrido este tiempo los pellets formados se rompieron, centrifugaron y lavaron dos veces con una solución salina. Al final el centrifugado se resuspendió con un vortex en 25 ml de solución salina. Las tres cepas se mezclaron en volúmenes iguales. Se obtuvo un conteo inicial de 9.95 x 10⁶ unidades formadoras de colonias g⁻¹ peso seco agrolita (UFC g⁻¹).

En el bioensayo, a cada unidad experimental se le adicionaron 1.0 ml del

inóculo y para el experimento de fitorremediación 1.5 ml por sección de la unidad experimental (0.5 ml por planta), aproximadamente a 2 cm de las plántulas.

6.2.3.2. Bacterias

Cada cepa bacteriana se cultivó en botellas serológicas de 125 ml, con 25 ml del medio de cultivo ($g\ l^{-1}$): 8, caldo nutritivo (BD Bioxon), se incubaron durante 72 h a 150 rpm y 30 °C Posteriormente se tomaron 2.5 ml de cada uno de los cultivos, se transfirieron a 22.5 ml del mismo medio de cultivo y se incubaron hasta la fase exponencial. Las células se colectaron y lavaron tres veces con una solución isotónica, ésta suspensión de células se ajustó a una densidad óptica de 0.23-0.26 a 600 nm en un espectrofotómetro Ultrospec II LKB Biochorn. Volúmenes iguales de cada cepa se mezclaron y se usaron como inóculo, obteniéndose un conteo inicial de 9.92×10^7 unidades formadoras de colonias g^{-1} peso seco agrolita (UFC g^{-1}).

En el bioensayo, a cada unidad experimental se le adicionaron 1.0 ml del inóculo y para el experimento de fitorremediación 1.5 ml por sección de la unidad experimental (0.5 ml por planta), aproximadamente a 2 cm de las plántulas.

6.2.4. Tasa de crecimiento de las hojas.

Las plántulas de un mes se colocaron en las unidades experimentales. Se midió la longitud de las hojas al empezar el bioensayo y cada semana, durante 21 días. Se realizó una grafica de cm /día para cada una de las especies, para obtener la pendiente que es la tasa de crecimiento. Este análisis también se realizó para el experimento de fitorremediación.

6.2.5. Tasa de crecimiento de las raíces.

Para determinar la tasa de crecimiento se midió la longitud de la raíz al

empezar el bioensayo y a los 21 días después de sacrificadas las plantas. El experimento de fitorremediación tuvo el mismo tratamiento al finalizar el tiempo de trabajo. Se realizó una grafica de cm /día, para obtener la pendiente que es la tasa de crecimiento.

6.3. Determinación de hidrocarburos totales de petróleo.

Se utilizó el método EPA 3540 que permite la extracción sólido-líquido de los compuestos orgánicos semivolátiles y no volátiles en suelos y sedimentos (USEPA 1986). Se pesaron 5 g de agrolita (peso seco) y 5 g de sulfato de sodio anhidro (Baker, grado reactivo) en un cartucho de celulosa (Wahntman 33 x 80 mm), este se colocó en un sistema Soxhlet, se adicionaron 160 ml de acetona-hexano 1:1 (Baker grado reactivo) cada muestra se mantuvo en extracción continua con reflujo por 18 hrs.

Para recuperar el solvente la muestra extraída se colocó en un rotoevaporador marca Büchi R-205 durante 10 minutos a 50° C y 50 RPM, el residuo se vació en una charola de aluminio, previamente pesada para evaporar todo el solvente y determinar la concentración de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) por gravimetría. Para la determinación por espectrofotometría infrarroja se utilizó el método EPA 3510-C; en donde el extracto se disuelve en un volumen conocido de tetracloroetileno (25 ó 50 ml). Los hidrocarburos se cuantifican en la zona de 2950 y 2930 cm^{-1} . Para la preparación de la curva de calibrado, se peso una cantidad de crudo Maya, se disolvió en un volumen conocido de tetracloroetileno (25 ó 50 ml), para obtener la solución madre, concentrada. Posteriormente se realizaron diluciones apropiadas con solvente puro para obtener al menos 5 puntos; los espectros de los estándares se corren usando solvente limpio como referencia.

Se utilizó un espectroscopio FTIR Perkin Elmer 2000, de transformadas de Fourier capaz de medir la absorbancia en el intervalo de 2700 a 3100 cm^{-1} .

Las muestras se leyeron en las mismas condiciones que los estándares, para la altura del pico en 2930 cm^{-1} y para el área entre 3035 y 2810 cm^{-1} , en todos los casos:

Resolución:	4 cm^{-1}
Apodización:	Kaiser – Bessel
Ganancia:	1
Velocidad OPD:	0.2 (cm/s)
Corrección de fase:	auto
Tipo de interferograma:	bi-direccinal
J-stop:	4.080 cm^{-1}

6.4. Experimento de Fitorremediación

El experimento se realizó durante seis meses con las cuatro especies, (*Cyperus laxus*, *Cyperus ligulatus*, *Cyperus digitatus* y *Echinocloa colonum*), que fueron cultivables bajo las condiciones de invernadero.

6.4.1. Unidades experimentales del experimento de fitorremediación

Las unidades experimentales fueron de vidrio ($30 \times 20 \times 15\text{ cm}$), ver Figura 2, divididas en tres secciones, a cada una se les colocó 265 g de agrolita, y tres plántulas de un mes de una misma especie en cada compartimiento, para tener tres repeticiones de tres plantas, y realizar los análisis estadísticos correspondientes. En los experimentos donde se requirió agrolita contaminada, la concentración de hidrocarburos que se utilizó fue de 6000 ppm (0.6%). Donde se requirió que fueran inoculados, éste se adicionó 15 días después. Las unidades experimentales se cubrieron con papel aluminio para evitar que las raíces estuvieran expuestas a los rayos solares. Se hidrataron con solución Long-Ashton hasta llegar a una humedad del 80%. Éstas unidades se colocaron en el invernadero a una temperatura de $18\text{-}25\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una humedad relativa de 75-80%



Figura 2: Unidad experimental de vidrio con tres compartimentos y tres plantas cada uno.

6.4.2. Estrategia experimental

Para cumplir con los objetivos de esta tesis, se diseñó una estrategia experimental, que permitió llevar a cabo los experimentos necesarios. La estrategia experimental tiene como base la presencia o ausencia de dos variables: los hidrocarburos y el inóculo. De ambos se generan 4 variables de los experimentos

- Ausencia de inóculo
- Presencia de inóculo
- Ausencia de hidrocarburos
- Presencia de hidrocarburos.

Éstas características están representadas por los círculos en la Figura 3. Las intersecciones de ellos, originaron cuatro tratamientos, a los que fueron sometidas cada de las especies en las unidades experimentales.

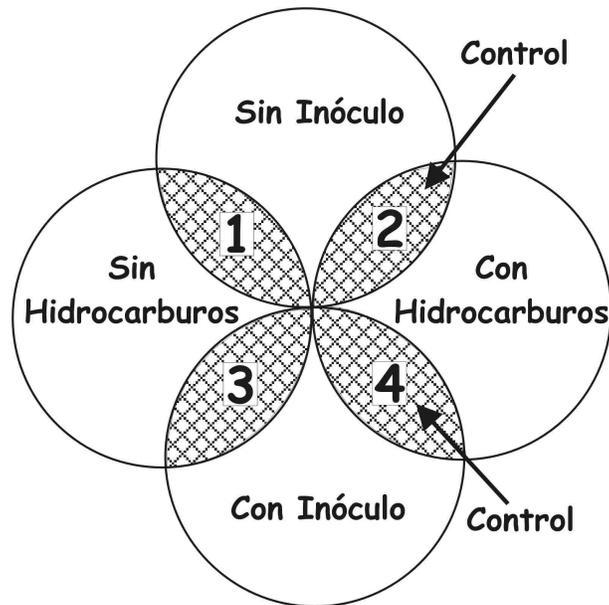


Figura 3: Esquema de la Estrategia experimental. Con los universos y las intersecciones para cada experimento con los cuatro tratamientos.

Los tratamientos se esquetizan en la tabla 1 y fueron:

Tratamiento 1: Sin inóculo y sin hidrocarburos.

Tratamiento 2: Sin inóculo y con hidrocarburos.

Tratamiento 3: Con inóculo y sin hidrocarburos.

Tratamiento 4: Con inóculo y con hidrocarburos.

Tabla 1: Se muestran los tratamientos para los experimentos realizados.

Sin inóculo		Con inóculo	
Sin hidrocarburos	Con Hidrocarburos	Sin hidrocarburos	Con Hidrocarburos
Con plantas (1)	Con plantas (2)	Con planta (3)	Con plantas (4)
	Sin planta (control)		Sin planta (control)

Como control del experimento, se implementaron dos unidades experimentales más, las dos con hidrocarburos con y sin inóculo, y sin plantas.

6.4.3. Características fenológicas

6.4.3.1. Tasa de crecimiento y Biomasa

Durante todo el experimento cada mes se midieron las hojas de las plantas. Una vez que el experimento concluyó, seis meses después, las plantas se sacrificaron y se midieron las raíces y las hojas para determinar sus tasas de crecimiento (Figura 4). Por último se separaron las raíces de las hojas, y se secaron en una estufa WTC Binder a 60 °C, después de 72 h se pesaron para obtener la biomasa.



Figura 4: Raíces de *Echinochloa colonum* al finalizar el experimento

6.4.4. Obtención de exudados

Para dar seguimiento al experimento se tomaron 5 o 6 g de agrolita de la parte media de cada una de las secciones de la unidad experimental, la muestra se lavó con agua destilada (7 ml) y se agitó con un vortex durante 30 segundos, el sobrenadante se filtró con papel de poro mediano, de esta solución se separó la muestra para determinar los análisis microbiológicos y el pH directamente con un potenciómetro digital (Conductronic pH 130).

El sobrenadante se pasó por un filtro Millipore de 45 μ para determinar las concentraciones de los exudados, como glucosa, fenoles y aminoácidos.

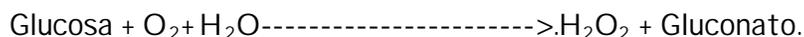
6.5. Otras determinaciones

6.5.1. Fenoles

Los fenoles se determinaron por la reacción colorimétrica de Folin-Ciocalteu (Liste y Alexander 1999). Se tomaron 5 ml de muestra del sobrenadante, se le agregaron 0.75 ml de Na₂CO₃ al 20 % y 0.025 ml de reactivo de Folin-Ciocalteu (Hycel de México). Se dejó reaccionar durante 60 min. en la oscuridad y se leyó en el espectrofotómetro Ultrospec II LKB Biochorn a 750 nm. Para la curva de calibrado, se preparó la solución madre, concentrada, solución de Fenol (20 μ g/ml),. Posteriormente se realizaron varias diluciones con agua destilada para obtener al menos 5 puntos y se leyeron en el espectrofotómetro.

6.5.2. Glucosa

Se determinó mediante una reacción colorimétrica con un Kit de glucosa Spinreact, por el método de Trinder según las siguientes reacciones:



Se tomaron 20 μ l de la solución filtrada de la agrolita y se adicionaron 2.0 ml de reactivo (Tris pH 4, Feno, glucosa oxidasa, peroxidasa, 4-aminofenazona), se incubaron durante 30 min. a temperatura ambiente y se leyeron en un espectrofotómetro a 505 nm

Preparación de la curva de calibrado: se preparó una solución de glucosa (20 μ g/ml), para obtener la solución madre, se realizaron las diluciones con agua destilada para obtener al menos 5 puntos que se procesaron de la misma

manera que las muestras experimentales.

6.5.3. Aminoácidos.

Se determinaron por el método de Lowry, se prepararon tres reactivos:

Reactivo A: Carbonato de sodio disuelto en hidróxido de sodio 0.1 N.

Reactivo B: Tartrato de Sodio-Potasio al 2 %.

Reactivo C: Sulfato de Cobre Penta hidratado al 1.0 %.

Reactivo D: Se mezclan los reactivos anteriores en la siguiente relación de 9.8 ml del reactivo A, 0.1 ml del reactivo B y 0.1 ml del reactivo CYPERS

En un tubo de ensaye se colocó 25 µl de muestra, se le adicionó 4.0 ml de reactivo D y 400 µl de solución de Folin Ciocalteau (Hycel de México) diluida con agua desionizada 1:1. Posteriormente se leyeron en el espectrofotómetro a 520 nm

Preparación de la curva calibrado: Se realizó con albúmina de suero bovino, se preparo la solución madre a una concentración de 5000 ppm, se realizaron diluciones con agua desionizada, para obtener 6 puntos que se procesaron de la misma manera que las muestras experimentales.

6.6. Análisis microbiológico

A partir de un ml de solución del sobrenadante, se hicieron diluciones seriadas, que se inocularon en cajas Petri por triplicado, con dos tipos de medio de cultivo, agar de soya y tripticaseina (AST), para el crecimiento de bacterias y agar de papa y dextrosa (PDA) con cloranfenicol, para el crecimiento de hongos filamentosos. Se realizaron conteos cada 24, 36 y 72 h.

6.7. Eficiencia de remoción de hidrocarburos

La eficiencia de remoción de los hidrocarburos en los distintos experimentos y con las distintas especies, se determino como sigue:

$$\text{Eficiencia} = \frac{\text{Hidrocarburos removidos}}{(\text{g de raíz} \times \text{días del experimento})}$$

6.8. Análisis estadísticos

Lo análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SPSS. Los valores promedio o medias de los tratamientos de cada uno de los resultados, se analizaron con una prueba de Tuckey para obtener las diferencias significativas entre especies y tratamientos $P (< 0.05)$. Se usaron letras para la comparación entre los tratamientos y números para la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

7. RESULTADOS Y ANÁLISIS

7.1. Bioensayo

De las seis especies que lograron germinar se eliminó *Typha dominguensis*, ya que con esta especie se tuvieron dificultades para su manejo en el invernadero. Su tasa de germinación fue muy baja (20%) y de este porcentaje solo el 2% sobrevivió durante un mes.

En la Figura 5, se muestra la tasa de crecimiento de las hojas de las cinco especies en estudio, en la abscisa se muestran las concentraciones de hidrocarburos y en la ordenada la tasa de crecimiento (cm. /día). Se observa que *Cyperus laxus* es la especie mas resistente a las diferentes concentraciones de hidrocarburos ensayadas, seguida de *Cyperus digitatus* y *Cyperus ligulatus*. La especie que menos creció durante el bioensayo fue *Rhynchospora cyperoides*, por lo que se decidió no seguir utilizándola en los experimentos de fitorremediación.

En la figura 6 se observa la tasa de crecimiento de las raíces, en la abscisa se muestran las concentraciones de hidrocarburos y en la ordenada la tasa de crecimiento. El comportamiento es igual al observado en la tasa de crecimiento de las hojas, en donde, *Cyperus laxus* es la especie que tuvo una mayor tasa de crecimiento seguida de *Cyperus digitatus* y *Cyperus ligulatus*.

A 1 % de hidrocarburos todas las especies mostraron una disminución de las tasas de crecimiento de hojas (Fig. 5) y raíces (Fig. 6), por lo que se decidió trabajar a

una concentración de 0.6 % de hidrocarburos.

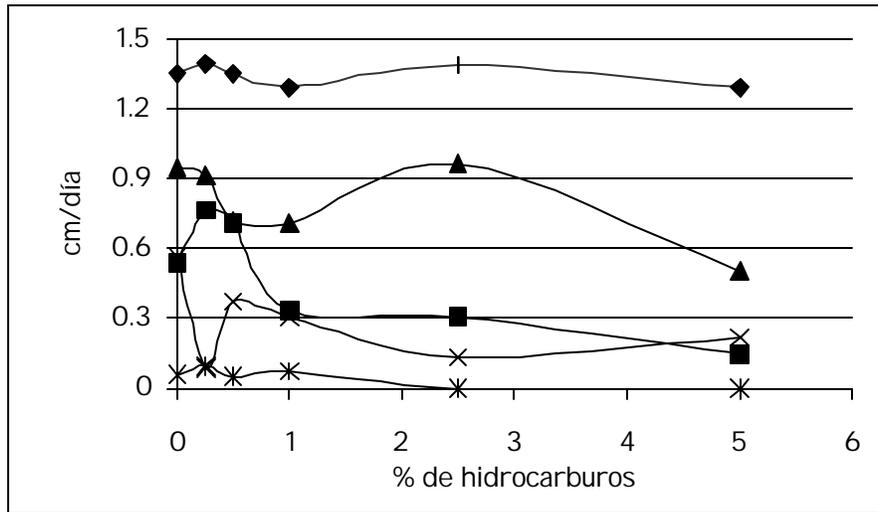


Figura 5: Tasa de crecimiento de hojas a distintas concentraciones de hidrocarburos para las especies en estudio. (- -) *Cyperus laxus*, (- -) *Cyperus ligulatus*, (- -) *Cyperus digitatus*, (-x-) *Echinochloa colonum*, (-H-) *Rhynchospora cyperoides*.

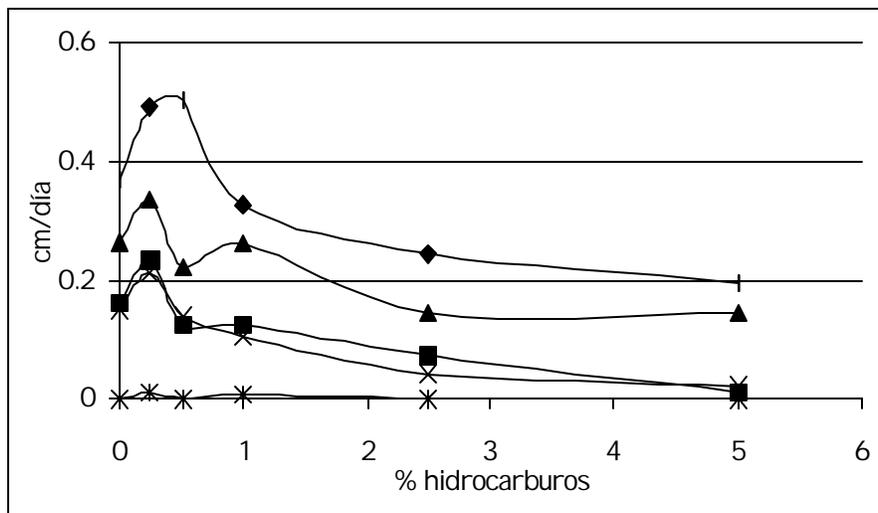


Figura 6: Tasa de crecimiento de raíces a distintas concentraciones de hidrocarburos para las especies en estudio. (- -) *Cyperus laxus*, (- -) *Cyperus ligulatus*, (- -) *Cyperus digitatus*, (-x-) *Echinochloa colonum*, (-H-) *Rhynchospora cyperoides*.

7.2. Experimento de fitorremediación

7.2.1. Características fenológicas

Cyperus laxus en el tratamiento 1 (sin inóculo sin hidrocarburos) Fig. 3 tuvo un ciclo de vida que completo en menor tiempo, ya que floreció a los 75 días, sin embargo es la especie menos robusta ya que presentó los valores de biomasa de raíz (1.53 g) y de hojas (8.32) más bajos, (Tabla 2). En el mismo tratamiento 1, *Echinochloa colonum* no floreció, pero fue la especie más robusta, ya que presentó los valores mayores en biomasa de hojas y raíces (Tabla 2). La especie *Cyperus ligulatus* mostró la tasa de crecimiento de las hojas mayor con respecto a las otras especies, pero la raíz creció de manera muy lenta. *Cyperus digitatus* a pesar de presentar la mayor tasa de crecimiento de la raíz, fue la especie menos robusta y floreció a los 105 días.

Tabla 2: Características fenológicas de las cuatro especies en el tratamiento 1. Los números es la comparación entre las especies, el mismo número indica que no hay diferencias significativas P (<0.05).

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración
C. laxus	0.24±0.04	1	0.46±0.03	2	1.53±1.04	1	8.32±5.27	1	75 días
C. ligulatus	0.23±0.007	1	0.75±0.003	4	4.52±1.4	1	15.17±5.18	1	
C. digitatus	0.58±0.12	2	0.20±0.01	1	2.5±1.54	1	8.52±3.7	1	105 días
E. colonum	0.15±0.02	1	0.62±0.06	3	5.2±3.89	1	18.46±12.37	1	

Para el tratamiento 2 (sin inóculo, son hidrocarburos), tabla 3, *Cyperus laxus* y *Echinochloa colonum*, tuvieron una disminución en el tiempo requerido para la floración de 75 a 60 días, y de 105 a 75 días respectivamente. En *Cyperus laxus* disminuyó la tasa de crecimiento de la raíz, pero alcanzó mayor biomasa de la misma, aunque *Echinochloa colonum* presentó mayores la tasas de

crecimiento tanto de raíces como de hojas, la biomasa de las raíces con respecto a las otras especies fue menor.

Tabla 3: Características fenológicas de las cuatro especies en el tratamiento 2. Los números es la comparación entre las especies, el mismo número indica que no hay diferencias significativas P (<0.05).

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración
C. laxus	0.17±0.07	1	0.49±0.02	12	2.58±1.15	1	8.05±3.14	1	60 días
C. ligulatus	0.22±0.02	1	0.52±0.11	2	2.57±2.28	1	6.58±5.95	1	
C. digitatus	0.13±0.02	1	0.30±0.04	1	2.54±1.30	1	7.35±4.78	1	75 días
E. colonum	0.75±0.01	2	0.58±0.08	2	1.86±0.99	1	8.3±2.44	1	

En el tratamiento 3 (con inóculo, sin hidrocarburos), la tasa de crecimiento de las raíces y las hojas disminuyó en todas las especies y la biomasa se incrementó a excepción de *Cyperus digitatus*, Tabla 4. *Cyperus laxus* y *Cyperus. digitatus* mostraron el mismo periodo requerido para florecer que en el tratamiento 1 (sin inoculo y sin hidrocarburos). *Echinocloa colonum* que no había florecido en este caso lo hizo a los 227 días. *Cyperus ligulatus* no logró florecer en estas condiciones.

Tabla 4: Características fenológicas de las cuatro especies en el tratamiento 3. Los números es la comparación entre las especies, el mismo número indica que no hay diferencias significativas P (<0.05).

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración g
C. laxus	0.20±0.08	1	0.45±0.10	2	2.3±1.68	1	12.14±9.21	1	75 días
C. ligulatus	0.16±0.0001	1	0.70±0.003	3	4.7±3.75	1	18.86±12.17	1	
C. digitatus	0.53±0.05	2	0.07±0.04	1	1.44±0.45	1	5.67±3.13	1	105 días
E. colonum	0.14±0.007	1	0.57±0.05	12	13.95±5.54	2	47.57±18.03	2	227 días

En el tratamiento 4 (con inóculo e hidrocarburos) se observa una disminución en las tasas de crecimiento de raíces y hojas de todas las especies, Tabla 5. en comparación al tratamiento 2 (sin inóculo y con hidrocarburos), (Tabla 3). La biomasa de raíces y hojas se incrementaron a excepción de *Cyperus ligulatus* que en los dos tratamientos 2 y 4 disminuyeron. *Cyperus laxus* a pesar de presentar una disminución en las tasas de crecimiento de raíces y hojas es la especie más robusta presentando los mayores valores de biomasa de raíces y hojas, Tabla 5.

Tabla 5: Características fenológicas de las cuatro especies en el tratamiento 4. Los números es la comparación entre las especies, el mismo número indica que no hay diferencias significativas P (<0.05).

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración
C. laxus	0.06±0.02	1	0.42±0.01	1	4.28±2.24	2	11.95±5.43	2	60 días
C. ligulatus	0.11±0.04	12	0.36±0.08	1	1.32±1.04	1	3.08±2.42	1	
C. digitatus	0.10±0.003	12	0.41±0.07	1	2.61±1.06	12	7.71±4.45	12	75 días
E. colonum	0.16±0.03	2	0.62±0.001	2	2.46±1.19	12	8.03±2.82	12	

Las tasas de crecimiento de raíces y hojas, en presencia de inóculo presentaron una disminución, pero por el contrario la biomasa de las mismas se incrementaron, Tabla 4 y 5. *Cyperus laxus* es la especie más robusta en presencia de hidrocarburos ya que presento los valores mayores de biomasa de raíces y de hojas, se observó una relación en la disminución en el tiempo de floración, con la disminución de la biomasa de las raíces y las hojas en el caso de *Cyperus laxus*.

7.2.1.1. Tasa de crecimiento hojas

Debido a que se sembraron a distintos tiempos a los 81 días se realizó un análisis estadístico de las especies con los tratamientos 3 y 4 y a los 91

días en los tratamientos 1 y 2. En la tabla 6 se muestran las tasas de crecimiento de todas las especies, en donde se puede observar que *Cyperus laxus* y *Cyperus digitatus* crecen más en presencia del inóculo y de los hidrocarburos. De manera general se observa que en todas las especies en los tratamientos 2 y 4, con hidrocarburos aumentó la velocidad de crecimiento. *Cyperus ligulatus* presentó en los tratamientos 2, 3 y 4 menor tasa de crecimiento, sin embargo es la especie que presentó mayor tasa de crecimiento en el tratamiento 1, sin inóculo y sin hidrocarburos.

Tabla 6: Tasa de crecimiento de hojas en el primer muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. laxus		A-1		AB-1		C-1		BC-2
C. ligulatus		A-2		A-1		A-1		A-1
C. digitatus		A-1		AB-1		AB-1		B-2
E. colonum		A-2		A-1		A-1		A-2

En un segundo análisis estadístico se realizó a los 186 días de todas las especies en los tratamientos 3 y 4 y a los 233 en los tratamientos 1 y 2. En la Tabla 7 se observa que las tasas de crecimiento de *Cyperus laxus* y *Echinochloa colonum*, no presentaron diferencias significativas en los distintos tratamientos. En presencia de inóculo y de hidrocarburos tratamiento 4 *Cyperus digitatus* presentó la mayor tasa de crecimiento, *Cyperus ligulatus* mayores tasa de crecimiento en el tratamiento 1 y en el caso de *Echinochloa colonum* la tasa de crecimiento se incrementó en presencia de hidrocarburo, tratamientos 2 y 4. Estas diferencias se pueden explicar no solo por la edad sino por la capacidad genética innata de las diferentes especies de plantas y la respuesta del desarrollo de la raíz a

las fluctuaciones medioambientales durante la exposición al suelo contaminado (Olson, *et. al.*, 2003)

Tabla 7: Tasa de crecimiento de hojas en el segundo muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. laxus	0.46±0.03	A-2	0.45±0.10	A-2	0.49±0.02	A-12	0.42±0.01	A-1
C. ligulatus	0.75±0.003	C-4	0.70±0.003	AB-2	0.52±0.11	BC-3	0.36±0.08	A-1
C. digitatus	0.20±0.01	AB-1	0.07±0.04	BC-1	0.30±0.04	A-1	0.41±0.07	C-1
E. colonum	0.62±0.06	A-3	0.57±0.05	A-2	0.58±0.08	A-12	0.62±0.001	A-2

7.2.1.2. Tasa de crecimiento de las raíces.

Las tasas de crecimiento de las raíces al final del experimento, 186 días tratamiento 3 y 4 y a los 233 días tratamientos 1 y 2, se presentan en la Tabla 8. Se observó que las tasas de crecimiento de las raíces de las distintas especies de *Cyperus*, disminuyó en presencia de hidrocarburos e inóculo, debido probablemente a que destinan la energía a la degradación de los hidrocarburos que se encuentran en el suelo, la especie que se vio menos afectada fue la gramínea *Echinochloa colonum*, en la que se observó que en presencia de inóculo aumentó la tasa de crecimiento de sus raíces.

Tabla 8: Tasa de crecimiento de raíz. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. laxus	0.24±0.04	B-1	0.20±0.08	AB-1	0.17±0.07	AB-1	0.06±0.02	A-1
C. ligulatus	0.23±0.007	C-1	0.22±0.02	BC-1	0.16±0.0001	AB-1	0.11±0.04	A-12
C. digitatus	0.58±0.12	B-2	0.13±0.02	A-1	0.53±0.05	B-2	0.10±0.003	A-12
E. colonum	0.15±0.02	A-1	0.75±0.01	B-2	0.14±0.007	A-1	0.16±0.03	A-2

7.3. Exudados

La finalidad de evaluar el pH en todo el experimento es conocer si es afectado por la presencia de los distintos tratamientos en los experimentos de fitorremediación. En la tabla 9 se presenta un resumen de los análisis estadísticos realizados para comparar los resultados obtenidos, entre cada uno de los experimentos y cada una de las especies.

Por lo anterior en el primer muestreo, que se llevo a cabo a los 81 días tratamientos 3 y 4 y a los 91 días tratamientos 1 y 2, se observó que no hubo variaciones en el pH entre los tratamientos y las especies, a excepción de *Cyperus ligulatus*, que con la adición de inóculo presentó un aumento en el pH.

Tabla 9: Tabla comparativa de valores de pH en el primer muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. Laxus		A-1		A-1		A-1		B-2
C. ligulatus		AB-12		A-1		B1		B-12
C. digitatu		A-12		A-1		A-1		A-1
Graminea		A-2		A-1		A-1		A-12

El segundo muestreo efectuado a los 186 días con los tratamientos 3 y 4 y a los 233 días en los tratamientos 1 y 2, se observó un aumento del pH, (Tabla 10), con la adición de hidrocarburos, tanto en los tratamientos sin inóculo (tratamiento 2), como con inóculo (tratamiento 4). Los valores de pH más altos se encontraron en los tratamientos sin inóculo (tratamiento 1 y 2). Esta diferencia de los valores de pH a los distintos tiempos, probablemente se deba al tiempo de duración del experimento y a la presencia de las plantas en los distintos tratamientos. La presencia de hidrocarburos aumentó el pH,

probablemente por la acumulación de CO₂ (atrapado como carbonatos) por la remoción de los hidrocarburos (Tabla 10).

Tabla 10: Tabla comparativa de valores de pH en el segundo muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas P (< 0.05).

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. laxus	6.10±0.06	A-1	7.04±0.12	B-2	6.50±0,08	A-1	6.98±0.26	B-1
C. ligulatus	6.94±0.15	A-2	7.02±0.10	A-2	6.79±0.15	A-1	6.84±0.05	A-1
C. digitatus	7.11±0.04	AB-2	7.33±0.10	B-3	6.77±0.21	A-1	6.95±0.21	AB-1
E. colonum	6.14±0.20	B-1	5.56±0.09	A-1	6.45±0.12	BC-1	6.7±0.21	C-1

7.3.1. Fenoles

Las concentraciones de fenoles obtenidas en el primer muestreo a los 81 días de los tratamientos con inóculo (3 y 4) y a los 91 días de tratamiento sin inóculo (1 y 2) se presentan en la Tabla 11, Se observó que los valores en los cuatro tratamientos tienen un rango que va desde 4.29 y 10.0 (µg de fenol/g agrolita). *Cyperus digitatus* es la especie que en el tratamiento 4 presencia de inóculo e hidrocarburos, presenta mayor cantidad de fenoles. *Cyperus. laxus* y *Echinocloa colonum* en el tratamiento 1 sin inóculo y sin hidrocarburos, son las especies que presentan mas fenoles. En las demás especies no se observaron diferencias significativas entre ellas ni entre los tratamientos. Los valores encontrados de fenoles en los cuatro tratamientos y en todas las especies son mas altos que los reportados para especies de otros sitios contaminados. Hedge y Fletcher, 1996, reportan para *Morus rubra* L., un valor de 3.41 ± 0.73 (µg/g de arena) de fenol.

Tabla 11: Tabla comparativa de la cantidad de fenoles en el primer muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
	1		2		3		4	
C. laxus		A-2		A-1		A-1		A-1
C. ligulatus		A-1		A-1		A-1		A-1
C. digitatu		A-1		AB-1		AB-1		B-1
E. colonum		Aa-2		A-1		A-1		A-1

Las concentraciones de fenoles obtenidas en el segundo muestreo a los 186 días en los tratamientos 3 y 4 con inóculo, y a los 233 días en los tratamientos 1 y 2 sin inóculo, se muestran en la Tabla 12. En el primer muestreo las concentraciones de fenoles fueron mayores, que las concentraciones obtenidas en el segundo muestreo. Esto probablemente pueda deberse al estrés que genera el cambio de medio ambiente sobre la planta, esto se refleja en la producción de fenoles (Zheng, Z., 1998, Leigh, *et al.*, 2002), los que propician a su vez, que las poblaciones de hongos y bacterias aumenten, favoreciendo la degradación de hidrocarburos.

Tabla 12: Tabla comparativa de valores de cantidad de fenoles en el segundo muestreo. Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos		Sin hidrocarburos		Con hidrocarburos	
C. laxus	2.53±1.54	A-1	2.36±0.22	A-2	3.68±0.85	A-1	3.24±0.59	A-123
C. ligulatus	2.93±0.01	A-1	5.32±0.10	B-3	3.27±1.10	A-1	4.02±1.06	AB-3
C. digitatus	3.59±0.89	B-1	2.18±0.26	A-2	2.16±0.32	A-1	2.34±0.15	AB-12
E. colonum	4.51±0.64	B-1	2.78±0.47	A-2	3.69±0.38	AB-1	3.83±0.46	AB-23
Sin planta			1.41±0.21	1			2.00±0.10	1

En la tabla 13 se presentan la cantidad de fenol $\mu\text{g} / \text{g}$ de raíces, que las plantas producen al final del experimento, donde se observa que *Echinochloa colonum* y *Cyperus ligulatus* en presencia de inóculo e hidrocarburos producen mayor cantidad de fenol $\mu\text{g} / \text{g}$ de agrolita. En el caso de *Cyperus digitatus* produjo más fenoles en ausencia de hidrocarburos y *Cyperus laxus* no mostró diferencias significativas en dicha producción en todos los tratamientos. Estas diferencias de la producción de fenoles probablemente ocurrieron por el efecto del estrés de los distintos tratamientos sobre las plantas, activando su sistema de defensa bioquímico y dando como resultado un cambio en la calidad y cantidad de la composición de los exudados, (Gleba, *et al.*, 1999).

Tabla 13: Tabla comparativa de valores de cantidad de fenoles / g raíz ($\mu\text{g} / \text{g}$ raíz). Las letras comparan los tratamientos. Los números es la comparación entre las especies. Mismas letra o números indican que no hay diferencias significativas $P (< 0.05)$.

	Sin inóculo				Con inóculo			
	Sin hidrocarburos 1		Con hidrocarburos 2		Sin hidrocarburos 3		Con hidrocarburos 4	
<i>C. laxus</i>	13.87±2.88	A 12	14.59±3.89	A 12	12.74±4.18	A 12	8.35±3.70	A 1
<i>C. ligulatus</i>	7.02±0.82	A 1	11.48±2.51	A 12	13.65±5.91	AB 2	23.94±6.33	B 2
<i>C. digitatus</i>	17.14±6.54	A 2	9.65±2.68	A 12	15.54±1.14	A 2	10.68±3.10	A 12
<i>E. colonum</i>	9.96±1.87	AB 12	18.91±3.29	B 2	3.14±0.84	A 1	20.41±7.84	B 12

7.3.2. Glucosa y Aminoácidos

Ninguno de los dos parámetros se pudo cuantificar por los métodos propuestos, probablemente porque estos exudados se difundieron dentro de la agrolita y fueron consumidos por las bacterias y hongos del medio inmediatamente al liberarse (Joner y Leyval, 2003).

7.4. Análisis microbiológicos

En la Figura 7 se presentan los números de unidades formadoras de colonias de hongos a los distintos tiempos. En la abscisa se muestran las distintas especies vegetales y en la ordenada las unidades formadoras de colonias (UFC) de hongos. *Cyperus laxus* es la especie que durante todo el tiempo mantuvo su número de unidades formadoras de colonias, mientras que en las demás especies este número se vio disminuido en el tiempo, aunque no hay diferencias significativas entre ellas.

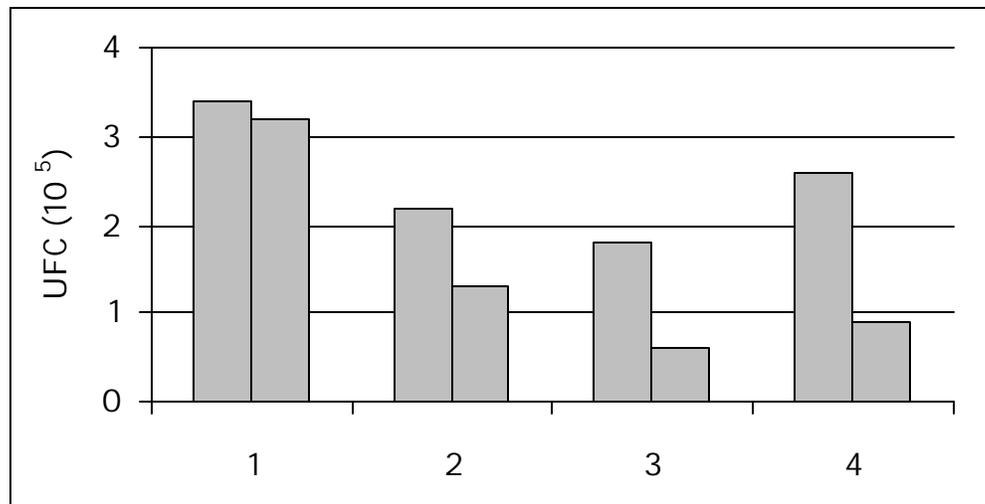


Figura 7: Unidades Formadoras de Colonias (Hongos) (1) *Cyperus laxus*, (2) *Cyperus ligulatus*, (3) *Cyperus digitatus*, (4) *Echinochloa colonum*. UFC iniciales 9.95×10^6 .
 Tiempo de muestreo  122 días  200 días

En lo que se refiere a las unidades formadoras de colonias de bacterias en la Figura 8 se muestra su comportamiento. En el eje de la abscisa se encuentran las especies vegetales y en la ordenada las unidades formadoras de colonias de bacterias (UFC) durante el tiempo del experimento se observa que no hay diferencias significativas, pues el orden de magnitud no cambia, la especie que primero alcanzó al número máximo de UFC en el tiempo fue *Echinochloa colonum*.

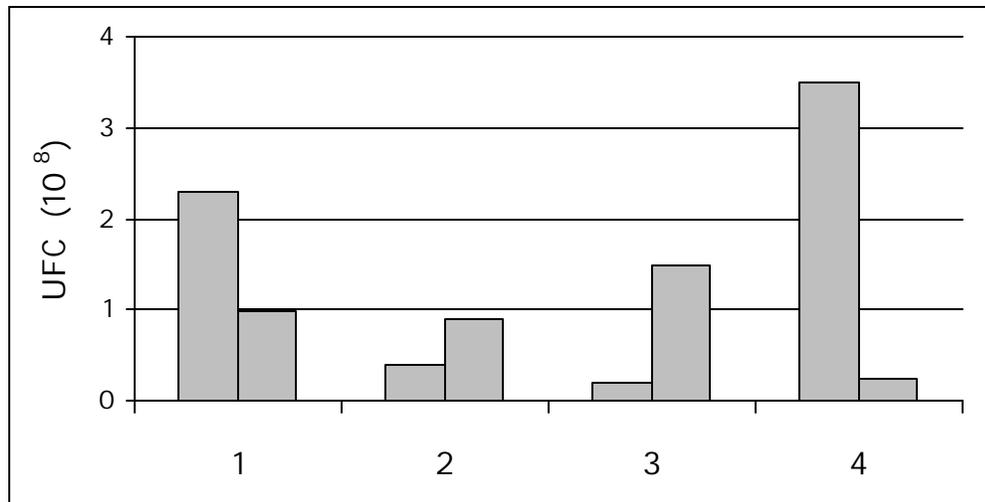


Figura 8: Unidades Formadoras de Colonias (Bacterias) (1) *Cyperus laxus*, (2) *Cyperus ligulatus*, (3) *Cyperus digitatus*, (4) *Echinochloa colonum*. UFC iniciales 9.92×10^7 .
 Tiempo de muestreo  122 días  200 días

Las especies que presentaron el mayor número de UFC de hongos y de bacterias en menor tiempo fueron *Cyperus laxus* y *Echinochloa colonum*. *Cyperus digitatus* y *Cyperus ligulatus* en el primer muestreo presentaron menos UFC, comparado con el muestreo final (200 días) sin llegar a alcanzar cantidad observada en las otras dos especies. El número de microorganismos (bacterias y hongos) en todas las especies se encuentra en los valores normales reportados por Suprum, *et al.*, 2000.

7.5. Eficiencia de la fitorremediación

La eficiencia medida en $\mu\text{g HTP} - \text{g raíz}^{-1} - \text{días}^{-1}$, fue mayor en la especie *Cyperus laxus* 7.4 en ausencia de inóculo, los valores mas bajos registrados fueron para *Echinochloa colonum* 1.24 y para *Cyperus ligulatus* 3.79, (Tabla 14). En presencia de inóculo estas mismas especies, presentan un aumento en su eficiencia, la cual fue de 13.71 y 15.51 respectivamente.

Con base en estos valores la especie que se podría utilizar para la remoción de hidrocarburos sin la necesidad de adicionar inóculo, sería *Cyperus laxus*, pero requiere de más tiempo para ello, mientras que *Echinochloa colonum* y *Cyperus*

ligulatus con la presencia de inóculo mostraron mayor eficiencia de remoción de hidrocarburos. El uso del inóculo aumentó la eficiencia de remoción de los hidrocarburos en todas las especies.

Tabla 14: Eficiencia de la fitorremediación ($\mu\text{g HTP} - \text{g raíz}^{-1} - \text{días}^{-1}$). Los números es la comparación entre especies. Mismos números indican que no hay diferencias significativas $P(< 0.05)$.  Menos eficiente  mas eficiente

g HTP- g raíz ⁻¹ - días ⁻¹						
	Sin inóculo			Con inóculo		
C. laxus	7.44	± 1.80	3 	9.68	± 3.88	12 
C. ligulatus	3.79	± 1.08	12 	15.51	± 6.28	2 
C. digitatus	5.73	± 1.07	23 	8.60	± 1.55	1 
E. colonum	1.24	± 0.53	1 	13.71	± 3.00	12 

7.6. Criterios de selección

Como se muestra en la tabla 15 y 16 los fenoles por gramo de raíz es un buen parámetro para relacionar la eficiencia de la planta con la remoción de hidrocarburos. En el caso de *Cyperus laxus*, es la especie que sin inóculo produjo uno de los valores mayores de fenoles y la mayor eficiencia de la remoción de hidrocarburos. Cuando se adicionó el inóculo *Cyperus ligulatus* y *Echinochloa colonum* fueron las especie más eficientes para la remoción de hidrocarburos y también mostraron, un incremento en la producción de fenoles Tabla 16. En el caso de *Cyperus laxus* y *Cyperus digitatus*, se observó que fueron las especies menos eficientes en la remoción de hidrocarburos en presencia de inóculo y también mostraron una disminución en los tiempos de floración se puede suponer que la producción de fenoles esta ligada a la floración de las plantas, cuando ocurre este fenómeno disminuye la producción de fenoles y por ende la eficiencia de remoción de hidrocarburos.

Tabla 15: Compendio de características fenológicas, concentración de fenol (μg fenol/g raíz) y Eficiencia de la fitorremediación (μg HTP - g raíz⁻¹ - días⁻¹). En los experimentos sin inóculo y con hidrocarburos.

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración	Fenol g-fenol	Eficiencia g-fenol/g raíz	
C. laxus	0.20±0.08	1	0.45±0.10	2	2.3±1.68	1	12.14±9.21	1	75 días	12.74±4.18	7.44 ± 1.80	3
C. ligulatus	0.16±0.0001	1	0.70±0.003	3	4.7±3.75	1	18.86±12.17	1		13.65±5.91	3.79 ± 1.08	12
C. digitatus	0.53±0.05	2	0.07±0.04	1	1.44±0.45	1	5.67±3.13	1	105 días	15.54±1.14	5.73 ± 1.07	23
E. colinum	0.14±0.007	1	0.57±0.05	12	13.95±5.54	2	47.57±18.03	2	227 días	3.14±0.84	1.24 ± 0.53	1

En la tabla 15 se muestran un compendio de los resultados obtenidos en el tratamiento 2, sin inóculo y con hidrocarburos, se puede observar que los parámetros fenológicos, como son: tasa de crecimiento y biomasa de raíces y hojas, no mostraron una correlación directa con la eficiencia en la remoción de hidrocarburos, sin embargo la producción de fenoles por gramo de raíz se relaciona directamente, aunque se observó una disminución en la cantidad de fenoles debida probablemente a los eventos de floración de la planta.

Tabla 16: Compendio de características fenológicas, concentración de fenol (μg fenol/g raíz) y Eficiencia de la fitorremediación (μg HTP - g raíz⁻¹ - días⁻¹). En los experimentos con inóculo y con hidrocarburos

	Tasa crecimiento raíces cm/día		Tasa crecimiento hojas cm/día		Biomasa de raíz g		Biomasa de hojas g		Floración	Fenol g-fenol	Eficiencia g-fenol/g raíz	
C. laxus	0.06±0.02	1	0.42±0.01	1	4.28±2.24	2	11.95±5.43	2	60 días	8.35±3.70	9.68 ± 3.88	12
C. ligulatus	0.11±0.04	12	0.36±0.08	1	1.32±1.04	1	3.08±2.42	1		23.94±6.33	15.51 ± 6.28	2
C. digitatus	0.10±0.003	12	0.41±0.07	1	2.61±1.06	12	7.71±4.45	12	75 días	10.68±3.10	8.60 ± 1.55	1
E. colinum	0.16±0.03	2	0.62±0.001	2	2.46±1.19	12	8.03±2.82	12		20.41±7.84	13.71 ± 3.00	12

En la tabla 16 se observó que la producción de fenoles por gramo de raíz esta directamente relacionado con la eficiencia en la remoción de hidrocarburos y en este caso la floración también parece afectar la producción de fenoles y con ello la disminución en la eficiencia de la remoción de los hidrocarburos. Probablemente lo que sucede es que la energía destinada a la producción de fenoles, es utilizada por la planta para florecer como en el caso del tratamiento sin inóculo.

8. CONCLUSIONES

- Las especies que lograron florecer en los distintos tratamientos fueron *Cyperus laxus*, *Cyperus digitatus* y *Echinochloa colonum*
- Bajo condiciones de exposición de hidrocarburos *Cyperus laxus* y *digitatus* disminuyeron el tiempo de floración.
- *Echinochloa colonum* floreció solo en el tratamiento en el que se adicionó inóculo y sin hidrocarburos.
- La cantidad de fenoles en la rizósfera de la planta, puede ser un buen parámetro para determinar si una planta tiene más capacidad fitorremediadora que otra. A mayor cantidad producida de fenoles, la planta es más eficiente
- *Cyperus laxus* es la especie que mostró mayor eficiencia en la remoción de hidrocarburos sin la adición de inóculo
- El inóculo aumentó la eficiencia de remoción de hidrocarburos en todas las especies.
- *Cyperus ligulatus* y *Echinoloa colonum* son las especies que mostraron mayor eficiencia en la remoción de hidrocarburos, con la adición de inóculo.

9. RECOMENDACIONES:

- Continuar con las investigaciones con estas mismas especies, para conocer otros métodos de determinación de exudados, que se puedan relacionar con la remoción de hidrocarburos, y poder extrapolar estas técnicas a otras especies vegetales que se encuentren en lugares distintos al que se trabajó en esta tesis.
- Realizar determinación de fenoles en otras especies de otros sitios contaminados con hidrocarburos, y compararlos con los encontrados en este estudio.
- Trabajar con las mismas especies vegetales en suelos de la zona de estudio para evaluar la cantidad de fenoles producidos en otro medio ambiente y si estos fenoles se pueden evaluar del suelo directamente..

10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson, T.A., E. A. Guthrie, B.T. Walton. 1993. Bioremediation in the Rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
2. Aprill, W., R. C. Sims. 1990. Evaluation of the use prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere* 20: 253-265.
3. Bandyopadhyay, S., S.K. Bhattacharya, P. Majumdar. 1994. Engineering aspects of bioremediation. In: Remediation of hazardous wastes contaminated soils. Wise, D.L. and Trantolo, D.J. Marcel Dekker, Inc. United States of America. 55-75.
4. Cunningham, S.D. and Ow, D.W. 1996. Promises and prospects of phytoremediation. *Plant Physiology*. 110: 715-719.
5. Cunningham, S. D., T. A. Anderson, A. P. Schwab, F. C. Hsu. 1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Advances in Agronomy*. 56:55-114.
6. Curl, E. A. y B. Truelove. 1986. *The Rhizosphere*. Springer-Verlag, Berlin.
7. Díaz-Ramírez, I, Ramírez-Saad, H, Gutiérrez- Rojas, M., Favela Torres E. 2003. Biodegradation of Maya crude oil fractions by bacterial strains and a defined mixed culture isolated from *Cyperus laxus* rhizospheric soil in a contaminated site Canadian J. Microbiol. (en prensa)
8. Ferrera-Cerrato, R. 1989. Rizosfera *In:* R. Ferrera-Cerrato (Edi). Ecología de la raíz. Sociedad Mexicana de Fitopatología. Montecillos, Estado de México.
9. Foster, R. C. 1982. The fine structure of epidermal cell mucilages of roots. *New Phytol.* 91:727-740.
10. Frick, R. E., R. E. Farrel and J.J. Germida. 1999. Assessment of phytoremediation as an in-situ technique for cleaning oil-contaminated sites. Petroleum Technology Alliance of Canada (PTAC). P.82.

11. Gallegos, Martínez, M, Gómez-Santos A., González-Cruz, L. Montes de Oca García, M. A., Yáñez Trujillo, L., Zermeño Eguía Lis, J. A., Gutiérrez Rojas , M. 2000. Diagnostic and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a mexican tropical swamp. **Water Sci. Technol.** 42 (5,6): 377-384
12. Garrison, A. W., V. A. Nzungung, J. K. Avants, J. J. Ellington, W. J. Jones, D. Rennels, L. Wolfe. 2000. Phytodegradation of p.p'-DDT and the enantiomers of o.p'-DDT. **Environ. Sci. Technol.** 34:1663-1670.
13. Gleba, D., N.V. Borisjuk, L. G. Borisjuk, R. Kneer, A. Poulev, M. Skarzhinskaya, Dushenkov, S. Logendra, Y. Y. Gleba, I. Raskin. 1999. Use of plants roots for phytoremediation and molecular farming. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 96: 5973-5977.
14. Gouthu, S., R. Weginwar, T. Arie, S. Ambe, T. Osaki, S. Enomoto, F. Ambe, I Yanaguchi. 1999. Subcellular distribution and translocation of radionuclides in plants. **Environ. Toxicol. Chemist.** 18:2023-2027.
15. Gunther, T., Dornberger, U., Fritsche, W. 1996. Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. **Chemosphere** 33:203-215.
16. Hedge, R.S. and J.S. Fletcher. 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
17. Hsu, T.S, R. Bartha. 1979. Accelerated mineralization of two organophosphate insecticides in the rhizosphere. **Applied Environ. Microbiol.** 37:36-41.
18. Hutchinson, S. L., M. K. Banks, A. P. Schwab. 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. **J. Environ. Qual.** 30:395-403
19. Iturbe Argüelles R., Flores Torres C., Chávez López C., Roldán Martín A. 2002. Saneamiento de suelos contaminados con hidrocarburos mediante biopilas. Ingeniería Investigación y Tecnología III. 1, 25-35. Instituto de Ingeniería, UNAM.
20. Joner, E. J., C. Leyval. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic

- hydrocarbons (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol.* 37:2371-2375.
21. Larson, S. T., R.P Jones, L Escalon, D. Parker. 1999. Classification of explosives transformation products in plant tissue. *Environ. Toxicol. Chemist.* 18:1270-1276.
22. Leigh, M. B., J. S. Fletcher, X. Fu, F.J Schmitz. 2002. Root turnover: an important source of microbial substrates in rhizosphere remediation of recalcitrant contaminates. *Environ. Sci. Technol.* 36:1579-1583.
23. Liste, H-H, M. Alexander. 1999. Rapid Screening of plants promoting phenanthrene degradation. *J. Environ. Qual.* 28:1376-1377
24. Liste, H-H, M. Alexander. 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40:7-10.
25. Meharg, A.A., J.W.G. Cairney, N. Maguire. 1997. Mineralization of 2,4-dichlorophenol by ectomycorrhizal fungi in axenic culture and in symbiosis with pine. *Chemosphere.* 34:2495-2504.
26. Nicolotti, G., S. Egli. 1998. Soil contamination by crude oil: impact on the mycorrhizosphere and on the revegetation potential of forest trees. *Environ. pollut.* 99: 37-43.
27. Olson, A. E., T. Wong, M.B Leight, J.S. Fletcher. 2003. allometric modeling of plant root growth and its application in rhizosphere remediation of soil contaminants. *Environ. Sci. and Technol.* 37(3): 638-643.
28. Paterson, S., Mackay, D., McFarlane, C. 1994. A model of organic chemical uptake by plants from soil and atmosphere. *Environ. Sci. and Technol.* 28:2259-2266.
29. Pavlostathis, S. G., K. K. Comstock, M. E. Jacobson, F. M. Saunders. 1998. Transformation of 2,4,6-trinitrotolueno by the aquatic plant *Myriophyllum spicatum*. *Environ. Toxicol. and Chemistry.* 17:2266-2273.
30. Reilley, K.A., M.K. Banks, A.P. Schwab. 1996. Organic chemical in the environment. *J. Environ. Qual.* 25:212-219.

31. Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares, R. Rodríguez-Vázquez. 2002. Adaptación y selección microbiana autóctona en medios de cultivo enriquecidos con benzo(a)pireno. *Agrociencia* 36:503-514.
32. Suprum, S. M., E. S. Kharkevich, T. M. Nogina, Y. M. Parhkomento, N. N. Zhdanova, G. V. Donchenco. 2000. Perspectives on the use of hydrocarbon-oxidizing micromycetes and rhodococci for purification of oil-polluted soils. In: *Biorremediation of contaminated soils*. Ed. Wise, D. L., D. J. Trantolo, E. J. Cichon, H. I. Inyang, U. Stottmeister. New York, USA.
33. Schnoor, J.L., Licht, L.A., McCutcheon, S.CYPERUS, Wolfe, N.L., Carreira, L.H. 1995. Phytoremediation of organic and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 19:318-323.
34. Sung, K; C. L. Munster, R. Rhykerd; M. C. Drew, M. Yavuz Corapcioglu. 2002. The use of box lysimeters with freshly contaminated soils to study the phytoremediation of recalcitrant organic contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 36:2249-225.
35. Thompson, P.L., L.A. Ramer, A.P. Guffey, J. L. Schnoor. 1998. Decrease transpiration in poplar trees exposed to 2,4,6-trinitrotolueno. *Environ. Tox. and Chemistry.* 17: 902-906.
36. Thompson, P.L., L.A. Ramer, J. L. Schnoor. 1999. Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine traslocation in poplar Trees. *Environ. Tox. and Chemistry.* 18.:279-284.
37. Travis, C. C., H.A. Hattemer-Frey. 1988. Uptake of organics by aerial plant parts: a call for research. *Chemosphere.* 17:277-283.
38. United States, Environmental Protection Agency. 1986. Laboratory manual physical/Chemical Methods. Washington, D. C. *Test methods for evolution solid waste*. Office of solid waste and emergency response, Vol. 18. Method EPA 3510-C.

39. United States, Environmental Protection Agency. 1986. Laboratory manual physical/Chemical Methods. Washington, D. C. **Test methods for evaluation solid waste**. Office of solid waste and emergency response, Vol. 18. Method EPA 3540
40. United States, Environmental Protection Agency. 2000. Introduction to phytoremediation. Office of research and development, Cincinnati, Ohio. 72 p.
41. Vogel, T.M., C. S. Criddle, P.L. McCarty. 1987. Transformation of halogenated aliphatic compounds. **Environ. Sci. Technol.** 21:722-736.
42. Walton, B. A.; Hoylman, A. M.; Perez, M. M.; Anderson, T. A.; Johnson, T. R.; Guthrie E. A.; Christman, R. F. 1994. Rhizosphere microbial communities as a plant defense against toxic substances in soils. **In:** Anderson, T. A., Coast, J. R. (Eds.). Bioremediation through rhizosphere technology, American Chemical Society, Washington D. C. pp. 82-92
43. Wilson, P. Ch., T, Whitwell, S.J. Klaine, 1999. Phytotoxicity, uptake and distribution of (14C) simazine in *Canna Hybrida* 'Yellow King Humbert'. **Environ. Tox. Che.** 18:1462-1468.
44. Zhen, A., J. L. Pinkham, K. Shetty. 1998. Identification of polymeric dye-tolerant oregano (*Origanum vulgare*) clonal lines by quantifying total phenolics and peroxidase activity. **J. Agric. Food Chem.** 46:4441-4446.

Los integrantes de este jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la siguiente tesis el día 18 de Diciembre de 2003

Dra. Margarita Elizabeth Gallegos Martínez.
Presidente

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
Secretario

Dra. Laura Josefina Pérez Flores
Vocal