



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
CHAPINGO**



**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN
SUELOS**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA PARA
EL DESARROLLO SOSTENIBLE**

**TOLERANCIA, ADAPTABILIDAD Y CAPACIDAD FITORREMEDIADORA DE
ESPECIES FORRAJERAS EN SUELO AGROFORESTAL CONTAMINADO
CON PETRÓLEO CRUDO**

TESIS

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN AGROFORESTERÍA PARA EL DESARROLLO
SOSTENIBLE**

PRESENTA:

OLIVIA TORRES RAMIREZ



**DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DIRECCIÓN DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES**

CHAPINGO, ESTADO DE MÉXICO, MAYO DE 2015



**TOLERANCIA, ADAPTABILIDAD Y CAPACIDAD FITORREMEDIADORA DE
ESPECIES FORRAJERAS EN SUELO AGROFORESTAL CONTAMINADO CON
PETRÓLEO CRUDO**

Tesis realizada por **Olivia Torres Ramírez** bajo la supervisión del Comité Asesor
abajo mencionado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para
obtener el grado de:

**MAESTRA EN CIENCIAS EN AGROFORESTERÍA PARA EL DESARROLLO
SOSTENIBLE**

Directora:

Dra. Elizabeth Hernández Acosta

Asesor:

Dr. Marcos M. González Peña

Asesor:

Dr. Ranferi Maldonado Torres

DEDICATORIA

A mi hija Grisell Nava Torres, por estar a mi lado en todos los momentos buenos, alegres, difíciles e injustos. Por soportar jornadas de trabajo superiores a lo usual, por comer, dormir y hasta vivir en el laboratorio, junto conmigo.

Por encontrar el lado divertido a mi trabajo, por dormir hasta tarde, por dejarme estudiar y por aceptar dormirse sin un cuento. Por decir que mi comida era la mejor del mundo (aunque no se la comiera), gracias también por los berrinches y desesperarme a tal grado, que la investigación fuera lo menos difícil de manejar en ese momento. Gracias changorrín por darle sonrisas, felicidad, sabor y amor a mi vida.

A mi amado esposo Osvaldo Nava García, por corregir errores del pasado, por luchar por mí. Gracias por tus numerosas muestras de afecto y por apoyar mi carrera. Gracias por todos estos años juntos.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada durante el tiempo de estudios de postgrado.

A mi alma máter la Universidad Autónoma Chapingo por proporcionar alimento a mi intelecto.

A mi familia: Mi hija y esposo. A mis padres: Clara y Bruno; por apoyarme en cada etapa de este reto, tanto emocional como económicamente. Especialmente a mi hermano, por estar a mi lado en los momentos más difíciles y por ayudarme en la etapa más pesada de la investigación.

A la Dra. Elizabeth Hernández Acosta, por su constante apoyo, atención y consejo antes, durante y después del proceso de experimentación.

Al Dr. Marcos M. González Peña, por sus aportaciones, excelentes consejos y recomendaciones para bien de la investigación.

Al M.C. Prócoro Díaz Vargas y al Dr. Javier Suarez Espinosa, por su valiosa ayuda en el análisis estadístico de los datos.

A compañeros y amigos que apoyaron en instalación del experimento, trabajo de laboratorio y toma de datos: Inocencio, Freddy, Iraís, Érica, Julio Cesar Nancy, Alma y Laura.

A mis compañeros de maestría y a Norma, porque hicimos un gran equipo y amistades para toda la vida.

DATOS BIOGRÁFICOS

Olivia Torres Ramírez, nació en Cosolapa, Oaxaca el 17 de Mayo de 1986. Su CURP es TORO860517MVZRML07. De profesión Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia. Con número de cédula: 6862779.

Realizó estudios de nivel básico en el Municipio de Tezonapa, Veracruz. Preparatoria en el CBTIS 101 en la comunidad de Motzorongo, Tezonapa, Veracruz, teniendo importantes participaciones en diversos concursos de conocimiento y destreza, obtuvo primer lugar estatal en concurso de prototipos representando al estado de Veracruz en 2003. Segundo Lugar estatal como Técnico Laboratorista Clínico en concursos de la DGETI. La licenciatura la realizó en la Universidad Autónoma Chapingo de 2005 a 2010, periodo durante el cual obtuvo tres altos rendimientos y dos cuadros de honor. Se tituló por promedio en 2010. Ingresó a la Maestría en Agroforestería para el desarrollo Sostenible en 2013. Participó como ponente en el III Congreso Internacional y XVII Congreso Nacional de Ciencias Agronómicas en abril de 2015. Trabajó en Unión de Cooperativas Zona Norte de Veracruz en 2010, y con productores de hule de Tezonapa, Veracruz en 2011.

RESUMEN

TOLERANCIA ADAPTABILIDAD Y CAPACIDAD FITORREMEIADORA DE ESPECIES FORRAJERAS EN SUELO AGROFORESTAL CONTAMINADO CON PETRÓLEO CRUDO

Olivia Torres Ramírez. Tesis de Maestría en Ciencias.
Postgrado en Agroforestería para el Desarrollo Sostenible. Universidad Autónoma Chapingo.
Directora de Tesis: Dra. Elizabeth Hernández Acosta.

La alta explotación petrolera efectuada en años recientes en la zona norte del estado de Puebla, ha causado contaminación de suelo por derrames de hidrocarburos, limitando la funcionalidad de los ecosistemas para producir, por lo que se requiere de técnicas que devuelvan dicha funcionalidad. La fitorremediación es una opción que ha demostrado tener alta eficacia en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. El objetivo de la investigación fue: evaluar la tolerancia, adaptación y capacidad fitorremediadora que tienen *Mucuna pruriens* y *Leucaena leucocephala* sobre un suelo agroforestal contaminado con petróleo crudo y comparar qué especie es la más apropiada para ser usada como una alternativa en la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos en la zona del activo Aceite Terciario del Golfo. Se estableció un experimento completamente al azar con arreglo factorial de tres factores: concentración de petróleo crudo (0, 10 000, 25 000, 35 000 y 50 000 mg kg⁻¹), especie vegetal (sin planta, mucuna y leucaena) y tiempo de muestreo (60 y 120 días). En planta se evaluaron las variables: germinación; longitud, volumen y biomasa de raíz; altura, nodulación y biomasa de parte aérea y total, análisis de tejido vegetal de N, P, K. En suelo: pH, CE, MO, N, P, K y CIC. Los hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) fueron determinados por el método gravimétrico. Los resultados mostraron que ambas especies son tolerantes y logran adaptarse a la presencia de hidrocarburo en suelo, no tienen efecto significativo sobre las propiedades químicas evaluadas en suelo y lograron remover hasta un 40% del los HTP's al cabo de 120 días.

PALABRAS CLAVE: Fitorremediación, *Mucuna purines*, *Leucaena leucocephala*, Contaminación de suelo, Hidrocarburos.

ABSTRACT

TOLERANCE, ADAPTABILITY AND ABILITY FOR PHYTORREMEDIAL OF FEED CROPS ON CONTAMINATED AGROFORESTAL SOIL WITH CRUDE OIL

The high oil exploitation carried out in recent years at zone north area of Puebla State, has caused contamination by oil spills, limiting the ecosystems functionality to produce, and it is clear that techniques are required to return such functionality. Phytoremediation is an option that has proved to be highly effective in the remediation of hydrocarbon-contaminated soils. The objective of this research was: to assess the tolerance, adaptation and phytoremediation ability of *Mucuna pruriens* and *Leucaena leucocephala* on agroforestry soil contaminated with crude oil, and to compare which species is most appropriate to be used as an alternative in the remediation of soil contaminated with hydrocarbons in the Active Tertiary Gulf Oil area. An experiment was established with randomized complete factorial arrangement of three factors: concentration of crude oil (0, 10,000, 25,000, 35,000 y 50,000 mg kg⁻¹), plant species (without plant, *mucuna* and *leucaena*) and sampling time (60 and 120 days). Plant variables evaluated were: germination, length, volume and root biomass; height, nodulation, biomass of aerial part and total biomass, plant tissue analyses of N, P, K. In soil: pH, EC, OM, N, P, K y CEC. The total hydrocarbons of petroleum (THP's) were measured by a gravimetric method. The results showed that both species are tolerant (better *Leucaena*) and manage to adapt (better *mucuna*) to the presence of hydrocarbons in soil; these species have no significant effect on soil chemical properties and removed up to 40% of the THP's in 120 days.

Key words: Phytoremediation, *Leucaena leucocephala*, *Mucuna pruriens*, soil contamination, Hydrocarbons.

INDICE GENERAL

HOJA DE APROBACIÓN DE TESIS	ii
DEDICATORIA:	iii
AGRADECIMIENTOS.....	ivi
DATOS BIOGRÁFICOS.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INDICE GENERAL.....	ix
LISTA DE CUADROS	xiv
LISTA DE FIGURAS	xviii
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVOS.....	3
1. OBJETIVO GENERAL	3
2. OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
1. CONTAMINACIÓN DEL SUELO	4
1.1. Suelos contaminados por hidrocarburos	5
2. EL PETRÓLEO.....	6

3.	TIPOS DE HIDROCARBUROS	7
3.1.	Hidrocarburos alifáticos	7
3.2.	Hidrocarburos alicíclicos.	7
3.3.	Parafinas volátiles	8
3.4.	Parafinas no volátiles	8
3.5.	Naftenos.....	8
3.6.	Oleofinas	8
3.7.	Aromáticos	9
3.8.	Resinas y asfaltenos	10
4.	PROBLEMÁTICA.....	10
5.	CONTAMINACIÓN DE SUELO POR PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS 12	
6.	TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN	13
6.1.	Biorremediación	14
7.	FITORREMEDIACIÓN.....	15
7.1.	Mecanismos en la fitorremediación	16
7.2.	Plantas fitorremediadoras	17
8.	DEGRADACIÓN POR MICROORGANISMOS.....	20
9.	COMETABOLISMO	21

10.	MINERALIZACIÓN	21
11.	TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS	22
11.1.	Toxicidad en función de la concentración	22
MATERIALES Y MÉTODOS.....		24
1.	LUGAR DE TOMA DE MUESTRA DEL SUELO.....	24
2.	CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LUGAR DE MUESTREO	25
3.	TOMA DE MUESTRA DE SUELO	26
4.	MANEJO DE SUELO.....	26
5.	PREPARACIÓN DEL SUSTRATO	27
6.	UNIDADES EXPERIMENTALES.....	28
7.	DISEÑO EXPERIMENTAL	29
8.	PREINSTALACIÓN AL EXPERIMENTO	29
9.	INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO	30
10.	VARIABLES A EVALUAR ANTES, DURANTE Y AL FINALIZAR EL EXPERIMENTO	32
10.1.	Prueba de germinación	32
10.2.	Altura de planta	33
10.1.	Área foliar	33
10.2.	Longitud de raíz.....	33

10.3.	Volumen radicular	33
10.4.	Presencia o ausencia de nódulos rizosféricos	34
10.5.	Peso seco de parte aérea y raíz	34
11.	VARIABLES DEL SUELO.....	34
12.	CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO (HTP'S).....	35
12.1.	Extracción con Soxhlet.....	35
12.2.	Determinación de humedad del suelo	37
12.3.	Método gravimétrico.....	38
13.	DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE LAS PLANTAS	39
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....		41
1.	TOXICIDAD	41
2.	VARIABLES MORFOLÓGICAS EN PLANTA.....	43
2.1.	Altura de planta	43
2.2.	Área foliar	46
2.3.	Longitud de raíz.....	49
2.4.	Volumen radicular	53
2.5.	Nodulación	56

2.6.	Biomasa aérea	58
2.7.	Biomasa de raíz	60
2.8.	Biomasa total	63
3.	SUELO.....	67
3.1.	Caracterización del suelo agroforestal empleado en la investigación.	67
3.2.	Potencial de hidrógeno (pH).....	67
3.3.	Conductividad eléctrica (CE).....	71
3.4.	Materia orgánica (MO)	75
3.5.	Nitrógeno.....	78
3.6.	Fósforo	82
3.7.	Potasio	85
3.8.	Capacidad de intercambio catiónico.....	89
4.	ANÁLISIS DE TEJIDO VEGETAL	93
5.	REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS	98
	CONCLUSIONES	104
	LITERATURA CITADA	105

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Análisis elemental de crudos típicos.	7
Cuadro 2. Clasificación de la toxicidad en función de la concentración.	23
Cuadro 3. Diseño de tratamientos para cada tiempo de muestreo.	28
Cuadro 4. Técnicas utilizadas para la determinación de variables medidas en suelo.	34
Cuadro 5. Material, equipo y reactivos para la extracción con soxhlet.	35
Cuadro 6. Medias de altura (cm) de <i>L. leucocephala</i> y <i>M. pruriens</i> (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).	45
Cuadro 7. Medias de área foliar (cm ²) de <i>Leucaena</i> y <i>Mucuna</i> (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).	48
Cuadro 8. Medias de longitud de raíz de <i>Leucaena</i> y <i>Mucuna</i> (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).	50
Cuadro 9. Medias de volumen radicular de <i>Leucaena</i> y <i>Mucuna</i> (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO),	

y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentracetración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentracetración de hidrocarburo*especie de planta (IHP)..... 54

Cuadro 10. Presencia (P) o ausencia (A) de nódulos rizosféricos en diferentes concentraciones de petróleo crudo (HIDRO) con las plantas *Mucuna* y *Leucaena* (PTA) a los tiempos de muestreo (TPO) 60 y 120 días..... 57

Cuadro 11. Medias de biomasa aérea (g) de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentracetración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentracetración de hidrocarburo*especie de planta (IHP)..... 59

Cuadro 12. Medias de biomasa de raíz (g) de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentracetración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentracetración de hidrocarburo*especie de planta (IHP)..... 62

Cuadro 13. Medias de biomasa total de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentracetración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentracetración de hidrocarburo*especie de planta (IHP)..... 64

Cuadro 14. Efectos de petróleo crudo mg kg⁻¹ de suelo (HB), especie vegetal (PTA), tiempo de muestreo (TPO), interacción plata*tiempo de muestreo (IPT), interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) e interacción hidrocarburo*planta (IHP) para la variable pH. 68

Cuadro 15. Efectos de concentración de petróleo crudo mg kg ⁻¹ de suelo (HIDRO), especie vegetal (PTA), tiempo de muestreo (TPO), interacción plata*tiempo de muestreo (IPT), interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) e interacción hidrocarburo*planta (IHP) sobre la variable conductividad eléctrica (dS m ⁻¹).....	72
Cuadro 16. Comportamiento de porcentaje de materia orgánica en HIDRO=mg kg ⁻¹ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.	76
Cuadro 17. Comportamiento de nitrógeno inorgánico (mg kg ⁻¹) en HIDRO=mg kg ⁻¹ de petróleo crudo en suelo, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo e IHP=Interacción hidrocarburo*planta.	79
Cuadro 19. . Comportamiento de fósforo soluble en HIDRO=mg kg ⁻¹ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.	83
Cuadro 20. Comportamiento de potasio intercambiable en HIDRO=mg kg ⁻¹ de petróleo crudo en suelo, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.	87
Cuadro 21. Comportamiento de capacidad de intercambio catiónico (cmol kg ⁻¹) en HIDRO=mg kg ⁻¹ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.	90

Cuadro 22. Contenido nutrimental en porcentaje de N, P, K, de las especies *Mucuna* y *L. leucocephala* a diferente concentración de petróleo crudo (HB)..... 94

Cuadro 23. Porcentaje de remoción de petróleo crudo en HIDRO= mg kg^{-1} de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta. 99

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Responsables a) y causas b) de pasivos ambientales en México (SEMARNAT, 2013).....	11
Figura 2. Número de emergencias ambientales del año 2007 a 2011 en México (Fuente: SNIARN 2009).....	11
Figura 3. Clasificación de los diferentes tipos de remediación de suelos contaminados.....	14
Figura 4. Localización de la parcela agroforestal naranja- maíz-frijol ubicando los puntos de muestreo en el área de estudio en el municipio Francisco Z. Mena.....	24
Figura 5. Edafología del sitio muestreado según INEGI (2012).....	25
Figura 6. Muestreo de suelo en la parcela agroforestal (maíz y/o frijol- cítrico) en el municipio Francisco Z. Mena.	26
Figura 7. Preparación de sustrato, incorporación de petróleo crudo.....	27
Figura 8. Preinstalación: evaporación del solvente a) y germinación de semillas b).....	30
Figura 9. Trasplante de plántulas pregerminadas en laboratorio.	31
Figura 10. Prueba de germinación a diferentes concentraciones de petróleo crudo sobre papel filtro.	32
Figura 11. Adición de sulfato de sodio anhidro al suelo seco a) y vaciado al cartucho de celulosa b).....	36
Figura 12. Montaje del equipo de extracción Soxhlet de 250 ml.....	36

Figura 13. Pesado de suelo seco en balanza analítica.....	37
Figura 14. Extracción de solvente mediante evaporación.....	38
Figura 15. Germinación de semillas a concentraciones logarítmicas de petróleo crudo.....	43
Figura 16. Altura de planta expresada (cm) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.	46
Figura 17. Área foliar (cm ²) por las especies <i>M. pruriens</i> y <i>L. leucocephala</i> a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.	49
Figura 18. Longitud de raíz de las especies <i>M. pruriens</i> y <i>L. leucephala</i> a diferentes concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días después de trasplante.	52
Figura 19. Volumen radicular (cm ³) expresado por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días. ..	56
Figura 20. Biomasa seca de parte aérea (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días. ..	60
Figura 21. Biomasa de raíz (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.	63
Figura 22. Biomasa total (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.	65
Figura 23. . Comportamiento del pH a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.....	71

Figura 24. Comportamiento de la conductividad eléctrica a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	74
Figura 25. Comportamiento del porcentaje de materia orgánica a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	77
Figura 26. Comportamiento del contenido de nitrógeno inorgánico (mg kg ⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	80
Figura 27. Comportamiento del contenido de nitrógeno fósforo soluble (mg kg ⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	84
Figura 28. Comportamiento del potasio intercambiable (mg kg ⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	88
Figura 29. Comportamiento la capacidad de intercambio catiónico (cmol(+) kg ⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.	91
Figura 30. Análisis vegetal de la especie <i>Mucuna pruriens</i> en las cinco concentraciones de petróleo crudo evaluadas.....	96
Figura 31. Análisis vegetal de la especie <i>Leucaena leucocephala</i> en las cinco concentraciones de petróleo crudo evaluadas.....	97
Figura 32. Porcentaje de remoción de petróleo crudo a las distintas concentraciones de hidrocarburo evaluadas y bajo el efecto de presencia o	

ausencia de planta (<i>Mucuna pruriens</i> y <i>Leucaena leucocephala</i>) a los 60 (a) y 120 (b) días.....	100
--	-----

INTRODUCCIÓN

La explotación petrolera en la zona de la sierra norte del estado de Puebla, ha traído múltiples beneficios al desarrollo social y económico. Sin embargo, el ambiente se ha afectado negativamente, causando contaminación del aire, agua y suelo. Lo anterior hace necesario el uso de alternativas que den solución a la problemática. En años recientes, la fitorremediación se ha convertido en una opción para remediar suelos contaminados con hidrocarburos.

La fitorremediación consiste en el uso de plantas verdes que aceleran la pérdida de hidrocarburos en el suelo por procesos de volatilización (Hou *et al.*, 2001) y degradación rizosférica, con la participación de microorganismos estimulados por los exudados de las raíces (Cunningham *et al.*, 1996), considerando que algunos microorganismos pueden utilizar hidrocarburos para su crecimiento como única fuente de carbono (Ramírez *et al.*, 2006). Al respecto Dietz and Schnoor (2001) afirman que los productos químicos orgánicos pueden ser absorbidos por las raíces y trasladados, metabolizados o transpirados por las plantas.

La fitorremediación también es una técnica ambientalmente aceptable basada en la formación de cubierta vegetal sobre el suelo, se realiza '*in situ*', es de bajo costo, no utiliza reactivos químicos, aplica prácticas agrícolas comunes y mejora las condiciones físicas y químicas del suelo. (Cunningham *et al.*, 1996; Suresh and Ravishankar, 2004)

La presente investigación tiene importancia en primer lugar porque la fitorremediación ha implicado principalmente el uso de malezas (Banks *et al.*, 2000), por lo que el uso de cultivos forrajeros mejora el valor económico de la técnica. Asimismo mucuna (*Mucuna puriens*) es una leguminosa utilizada como abono verde, cultivo de cobertera contra malezas y forraje con alto valor

proteico. *Mucuna* tiene usos medicinales y se puede usar como reemplazo del café. Por otra parte *leucaena* (*Leucaena leucocephala*), es una leguminosa muy usada en sistemas silvopastoriles especialmente como banco de proteína, de fácil manejo y rápido crecimiento. La semilla de *leucaena* es utilizada como alimento humano, proporcionando altas cantidades de proteínas, potasio y calcio; también es utilizada como cerco vivo y leñosa (Hernández, 2011). Por lo anterior, las especies son muy atractivas para la adopción de los productores, sin dejar de mencionar que las condiciones en los trópicos son favorables para su crecimiento, y se ha hecho poca investigación sobre la utilización de fitorremediación en éste clima (Gallegos *et al.*, 2000). Por lo que existe la necesidad de evaluar los potenciales de fitorremediación en los trópicos, especialmente en la sierra norte de Puebla, donde la explotación petrolera ha tenido auge en los últimos años y que además ocurren accidentes en los que se pone en riesgo la integridad de los ecosistemas y de los sistemas de producción primaria.

Basado en lo anterior, el objetivo de la investigación fue: evaluar la tolerancia, adaptación y capacidad fitorremediadora de las dos especies a un suelo agroforestal contaminado con petróleo crudo, para utilizarlas como una alternativa en la remediación de suelos contaminados por hidrocarburos en la Zona del Activo Aceite Terciario del Golfo.

El aporte de la presente investigación es que, al probarse que las especies *mucuna* y *leucaena* toleran, se adaptan y tienen capacidad para remediar suelos contaminados con petróleo crudo, pueden ser utilizadas como alternativa en la remediación de este tipo de suelos, por ser de fácil manejo y requerir pocos insumos. Además de que tienen varios usos, son nativas del lugar y mejoran de las propiedades del suelo.

OBJETIVOS

1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar la tolerancia, adaptación y capacidad fitorremediadora que tienen *Mucuna pruriens* y *Leucaena leucocephala* sobre un suelo agroforestal contaminado con petróleo crudo.

2. OBJETIVOS ESPECIFICOS

Realizar pruebas de germinación con las especies estudiadas para conocer la tolerancia de mucuna y leucaena al estar en contacto con petróleo crudo.

Comparar el desempeño de las dos especies en estudio bajo las mismas condiciones de crecimiento y determinar el efecto sobre las propiedades químicas del suelo contaminado a diferentes concentraciones de hidrocarburo.

Determinar el efecto que tienen mucuna y leucaena sobre la reducción de Hidrocarburos Totales del Petróleo (HTP's), en suelo contaminado con distintas dosis de petróleo crudo, para conocer su capacidad en la fitorremediación de suelos.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. CONTAMINACIÓN DEL SUELO

En la actualidad, la contaminación de los suelos es una problemática que afecta a todo tipo de suelos, los de uso industrial, urbano y agrícola. Se habla de contaminación de suelo, cuando se altera alguno de sus componentes, lo que hace que no cumpla con su funcionalidad original o natural. Martínez y López (2000) mencionan que, un suelo contaminado es todo aquel cuyas características, físicas, químicas o biológicas han sido alteradas negativamente por la presencia de componentes peligrosos de origen antropogénico, en concentración tal que representen un riesgo para la salud humana o para el medio ambiente.

Ruda *et.al.*, (2004) plantean que la contaminación del suelo se divide en tres tipos: 1) contaminación física, con variaciones en parámetros como la temperatura y la radioactividad; 2) contaminación biológica, al inducir la proliferación de especies o cepas patógenas o ajenas a los microorganismos presentes en el suelo de forma natural; y 3) la contaminación química, que es por adición de elementos o compuestos en concentraciones que alteren la composición originaria del suelo, subrayando que este tipo de contaminación es la predominante.

Al respecto Contreras (2005) menciona que la contaminación de suelos es la problemática ambiental que ha sufrido mayor crecimiento en los últimos años en comparación con otros componentes ambientales, debido principalmente a que el suelo había sido considerado por años como un recurso renovable. Sin embargo, a medida que pasan los años se ha revertido este pensamiento, y hoy se considera al suelo como un recurso esencialmente no renovable, debido principalmente a que presenta una rápida degradación y también una regeneración extremadamente lenta (Ávila, 1998).

1.1. Suelos contaminados por hidrocarburos

Ortínez *et al.* (2003) mencionan que el comportamiento de los contaminantes orgánicos, está en función de las características físicas y químicas del suelo, como son la unidad del medio, permeabilidad, estructura, tamaño de las partículas, contenido de humedad y de materia orgánica, así como la profundidad del manto freático y factores climatológicos.

Prácticamente todos los problemas de contaminación de suelos, son causados por la actividad antropogénica, ya sea por derrames accidentales o irresponsables durante la descarga de subproductos o bien durante el transporte dentro y fuera de las instalaciones industriales y de mantenimiento. Saval (1995) refiere que particularmente en hidrocarburos, debido al manejo y al uso de grandes cantidades de petróleo, existe un gran riesgo potencial de contaminación de aguas y suelos. Durante la exploración, explotación y producción de hidrocarburos, la contaminación puede ser resultado de accidentes en el transporte, así como la deposición deliberada de desechos de petróleo en el suelo, siendo en el transporte donde se tienen la mayoría de los casos de contaminación por petróleo crudo.

La contaminación del suelo por hidrocarburos, causa cambio en las condiciones físicas, químicas y biológicas de éste; lo que hace que el desarrollo de organismos del suelo, así como la cobertura vegetal, se vea afectada por la presencia de los mismos y se reduzca o elimine en los casos más extremos.

Saval (1995) menciona que cuando la cantidad de petróleo en el ambiente es mayor de la que puede ser reciclada, el petróleo se convierte en un contaminante, presentando un impacto negativo, ya que entre sus componentes existen altas concentraciones de sustancias que son consideradas como residuos peligrosos por su efecto dañino a la salud. Algunos ejemplos de estas sustancias nocivas son el benceno, tolueno, etilbenceno, xilenos, naftaleno, antraceno, fenantreno, cresoles, fenol, ciclopentano, ciclohexano y etileno.

2. EL PETRÓLEO

El petróleo es una mezcla compleja de cientos de compuestos químicos, sus características y la proporción de sus constituyentes varían en función de su origen geológico y geográfico.

El petróleo se define como un líquido natural oleaginoso e inflamable, constituido por una mezcla de hidrocarburos, que se extrae de lechos geológicos continentales o marítimos. Mediante diversas operaciones de destilación y refinación, se obtienen de él distintos productos utilizables con fines energéticos o industriales, como la gasolina, la nafta, el keroseno, y el gasóleo, entre otros.

Cerutti (2001) menciona que el petróleo crudo se presenta en la naturaleza como un líquido móvil de color amarillento, pudiendo llegar a tener el aspecto de un material semisólido de color negro. En la composición del petróleo entran fundamentalmente hidrocarburos gaseosos, líquidos y sólidos, estando estos últimos disueltos o suspendidos en los líquidos. Además se encuentran otras sustancias, consideradas impurezas, tales como compuestos de azufre, oxígeno, nitrógeno, trazas de metales y sales de sodio, calcio y magnesio.

Hay diferentes tipos de crudo con composición bastante variable, según sean más o menos ricos en hidrocarburos saturados (parafinas), hidrocarburos insaturados (olefinas), hidrocarburos cíclicos saturados, o hidrocarburos aromáticos.

Cuadro 1. Análisis elemental de crudos típicos.

Elemento	Porcentaje por peso
Carbono	84-87
Hidrógeno	11-14
Azufre	0.06-2.0
Nitrógeno	0.1-2.0
Oxígeno	0.1-2.0

(Tomado de Mc. Cain, 1999)

3. TIPOS DE HIDROCARBUROS

3.1. Hidrocarburos alifáticos

Los hidrocarburos alifáticos son sustancias en las cuales los átomos de carbono que forman la base de la estructura están organizados en forma de cadenas, que pueden ser lineales o ramificadas. Dependiendo de la ausencia o presencia de ligaduras múltiples, se clasifican en alcanos, alquenos o alquinos. Las propiedades fisicoquímicas y toxicológicas de estos compuestos dependen en gran medida, de la presencia de doble ligaduras en la cadena y, en su caso, de su posición (Fraume 2007).

3.2. Hidrocarburos alicíclicos.

Los hidrocarburos alicíclico son compuestos en los que los átomos de carbono forman un anillo; pueden variar en el número de átomos en el ciclo. De la presencia de dobles ligaduras y de su posición en el ciclo, dependen las propiedades físicas y químicas del hidrocarburo (Fraume, 2007).

3.3. Parafinas volátiles

Las parafinas volátiles representan hasta un 30% del petróleo crudo. Son *n*-alcanos e isoprenoides (alcanos ramificados) de un tamaño C1 a C10. Es la fracción más volátil del crudo, y por lo tanto la más susceptible de pérdidas abióticas por volatilización. La fracción gas natural contiene, principalmente C1 a C5. Los isopropenoídes volátiles, están representados principalmente por el isobutano e isopentano. Los isoprenoides volátiles también pueden llegar hasta C10 (2,6 dimetil octano) (Newbery y Thierry, 2007).

3.4. Parafinas no volátiles

Las parafinas no volátiles se definen como aquellos *n*-alcanos e isopropenoídes entre C11 y C40. Aunque se han descrito cadenas más largas y pueden constituir entre el 15 y 20% de crudos no degradados; mientras que los isoprenoides varían de C12 a C22 y constituyen entre 1-2% del crudo, llegando a 15% en crudos degradados. Los componentes entre C11 y C15 son de volatilidad intermedia (Newbery y Thierry, 2007)..

3.5. Naftenos

Los naftenos son una familia de hidrocarburos que está compuesta por las cicloparafinas o cicloalcanos. Los compuestos más abundantes de esta familia son los ciclopentanos alquilados (fundamentalmente metilados), que pueden llegar a representar un 31% del crudo. Los compuestos mono y dicíclicos corresponden entre el 50 y 55% de esta fracción, los tricíclicos al 20% y los tetracíclicos al 25%. Esta familia engloba a los hopanos (Cerutti, 2001).

3.6. Oleofinas

Silos (2008) menciona que las oleofinas son alquenos, las cuales están poco presentes en el crudo de petróleo, encontrándose en concentraciones traza. Adquieren importancia en los productos resultantes del refinado, ya que se

generan durante el proceso de *cracking*, existiendo hasta un 30% en gasolinas y un 1% en otros combustibles.

3.7. Aromáticos

El crudo de petróleo contiene una mezcla compleja de hidrocarburos aromáticos. Esta fracción la componen moléculas que contienen uno o varios anillos bencénicos en su estructura. Así se encuentran hidrocarburos monoaromáticos (un anillo bencénico), diaromáticos (2 anillos bencénicos) y poliaromáticos (HAPs, con más de dos anillos bencénicos) (Fraume, 2007; Newbery y Thierry, 2007).

3.7.1. Hidrocarburos monoaromáticos

Se encuentran el benceno y sus alquilados (monoalquilados como el tolueno y dialquilados como los xilenos), formando la familia de los BTEX (benceno, tolueno, etilbenceno y xileno), de gran importancia ambiental debido a su volatilidad y toxicidad (Cerutti, 2001).

3.7.2. Hidrocarburos poliaromáticos

Cerutti (2001) también menciona que entre los hidrocarburos diaromáticos, se encuentran, el naftaleno y sus alquilados (mono, di, tri y tetrametilnaftalenos). Constituyen la familia mayoritaria de hidrocarburos aromáticos presentes en el petróleo crudo. Entre los hidrocarburos poliaromáticos de tres anillos, encontramos el fenantreno, antraceno, fluoreno, y sus derivados alquilados. El fenantreno y los metilfenantrenos, representan los componentes mayoritarios de los triaromáticos. Entre los hidrocarburos poliaromáticos de más de tres anillos, están el fluoranteno (3 anillos bencénicos y uno no bencenico), pireno y criseno (4 anillos aromáticos), pireno y benzoapireno (5 anillos aromáticos) y coroneno (un HAP peri condensado con 6 anillos).

3.8. Resinas y asfaltenos

Las resinas y asfaltenos son mezclas complejas, integradas por núcleospolicíclicos o naftenoaromáticos. Contienen cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre. A veces están asociadas con pequeñas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel. Constituyen desde el 10% de los crudos poco degradados o ligeros, hasta 60% en crudos muy degradados. Es la fracción que presenta una mayor recalcitrancia de un crudo de petróleo. Se trata de agregados de piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados (Silos, 2008).

4. PROBLEMÁTICA

La contaminación del suelo por hidrocarburos ha existido desde inicios de la civilización humana. Sin embargo nunca se le había puesto la atención que merece debido a la ausencia de leyes y reglamentaciones acordes a la problemática; es por eso que actualmente se tienen múltiples problemas de contaminación por hidrocarburos.

Es hasta principios de 1990, que en México se empiezan a crear leyes y normas que regulan el problema. Con la entrada en vigor de leyes como la Ley General de Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente, Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos, Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos. Con las Normas Oficiales Mexicanas, se obtiene mayor regulación en el ámbito; dónde la NOM-138 SEMARNAT /SS-2003, establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Sin embargo desafortunadamente para esto ya existen pasivos

ambientales que resolver, de los cuales como se muestra en la Figura 1, PEMEX es el principal responsable, por derrames contaminación en pozos.

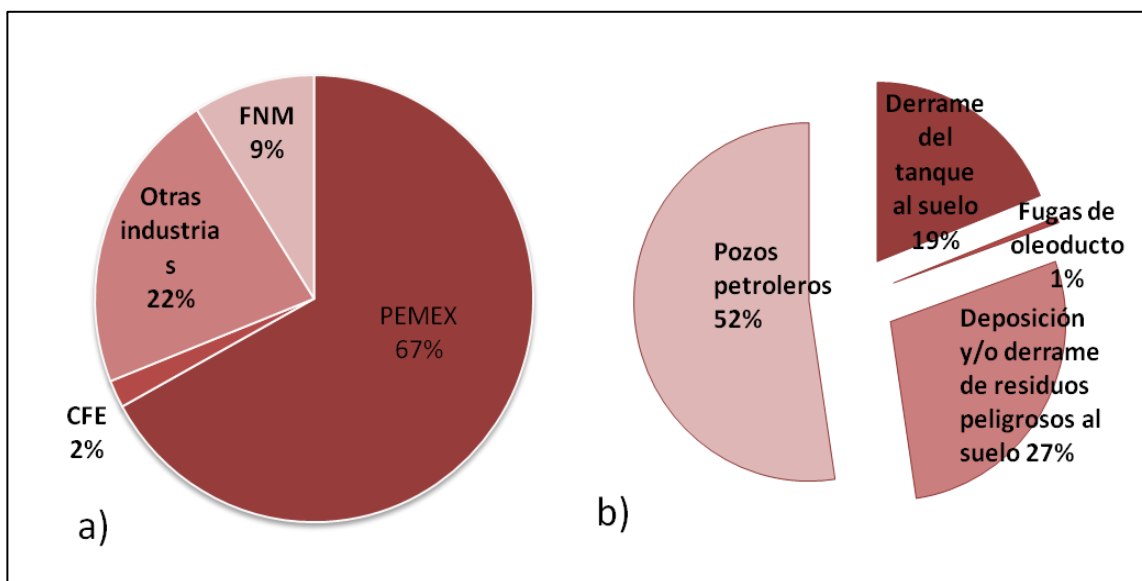


Figura 1. Responsables a) y causas b) de pasivos ambientales en México (SEMARNAT, 2013).

Actualmente, según datos de INEGI, 2007 Veracruz reporta 912.6 ha de suelo contaminado, mientras que Puebla 104.4 hectáreas, de los cuales como se observa en la Figura 2, la mayoría son causados por hidrocarburos.

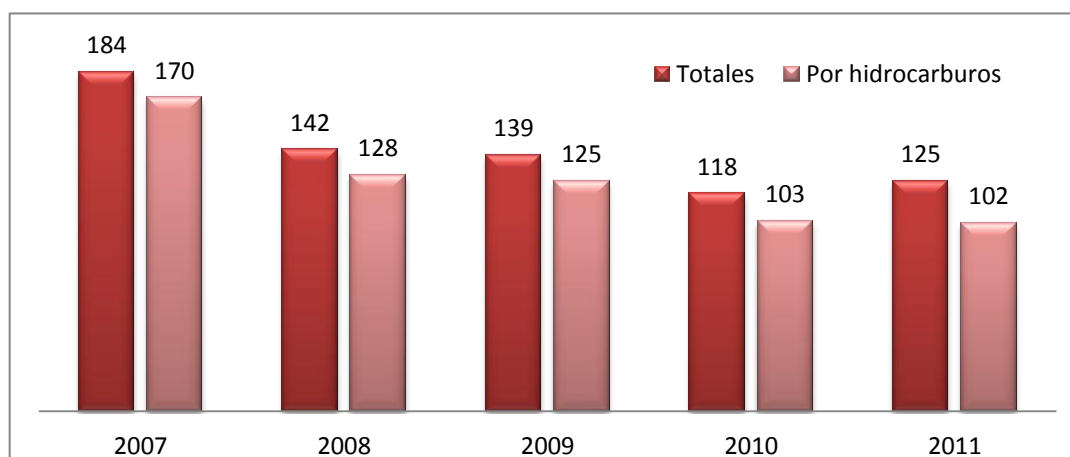


Figura 2. Número de emergencias ambientales del año 2007 a 2011 en México (Fuente: SNIARN 2009).

5. CONTAMINACIÓN DE SUELO POR PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS

Debido al manejo y uso de grandes cantidades de petróleo, existe un riesgo potencial de la contaminación de aguas y suelos. La contaminación puede ser resultado de accidentes en el transporte, así como la deposición deliberada de desechos de petróleo en el suelo. Las actividades de exploración y explotación del petróleo son las principales fuentes de derrame de crudo. Además, los procesos de refinamiento, transporte, almacenamiento y expendio del petróleo, son fuentes de contaminación.

El petróleo derramado se mueve a través del suelo por gravedad llegando extensivamente a las aguas subterráneas. Dependiendo de la capacidad absorbente del suelo, el petróleo puede fluir sobre la superficie casi sin penetrar al suelo, o puede ser absorbido en el mismo sitio del derrame. El petróleo puede fluir a través de las discontinuidades estructurales y texturales del suelo por decenas de metros antes de aparecer en la superficie. Benavides *et al.* (2006) afirman que los hidrocarburos impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos, como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, pueden ser procesos más o menos lentos, que a su vez ocasionan una mayor toxicidad.

Además el petróleo causa el incremento de la salinidad del suelo, lo que dificulta su tratamiento, debido a que altos gradientes de salinidad pueden destruir la estructura terciaria de las proteínas, desnaturalizar enzimas y deshidratar células, lo cual es letal para muchos microorganismos usados para el tratamiento de aguas y suelos contaminados.

Particularmente hablando del petróleo crudo, Dietz and Schnoor (2001) mencionan que es menos soluble en agua, menos tóxico y generalmente

menos móvil que la mayoría de los productos refinados, por lo que ocupa menos área al derramarse y no restringe tanto el uso del suelo.

6. TÉCNICAS DE REMEDIACIÓN

Existen diversas formas de descontaminar el suelo (Figura 3), entre las que podemos encontrar descontaminación por medios físicos, químicos y biológicos. Aunque también se pueden clasificar como técnicas de remediación tradicionales y técnicas innovadoras. Las técnicas tradicionales incluyen los tratamientos de fácil aplicación y cuyos costos de operación son relativamente bajos, con excepción de la incineración y la solidificación, que requieren de equipos especiales para su aplicación y cuyos costos de operación son elevados. Las técnicas de tratamiento innovadoras consisten en la aplicación de procesos químicos, biológicos o físicos a desechos peligrosos o materiales contaminados a fin de cambiar su estado en forma permanente.

SEMARNAT (2012) menciona que los procesos de remediación pueden clasificarse de distinta manera, ya seas por la estrategia de remediación (destrucción o alteración de la estructura química de los contaminantes, extracción o separación de los contaminantes aprovechando sus propiedades físicas o químicas y aislamiento o inmovilización de contaminantes), por el lugar de aplicación (tratamiento *in situ*, tratamiento *on site*, y tratamiento *ex situ*), o por el tipo de tratamiento (biológicos, físicos, químicos, térmicos).

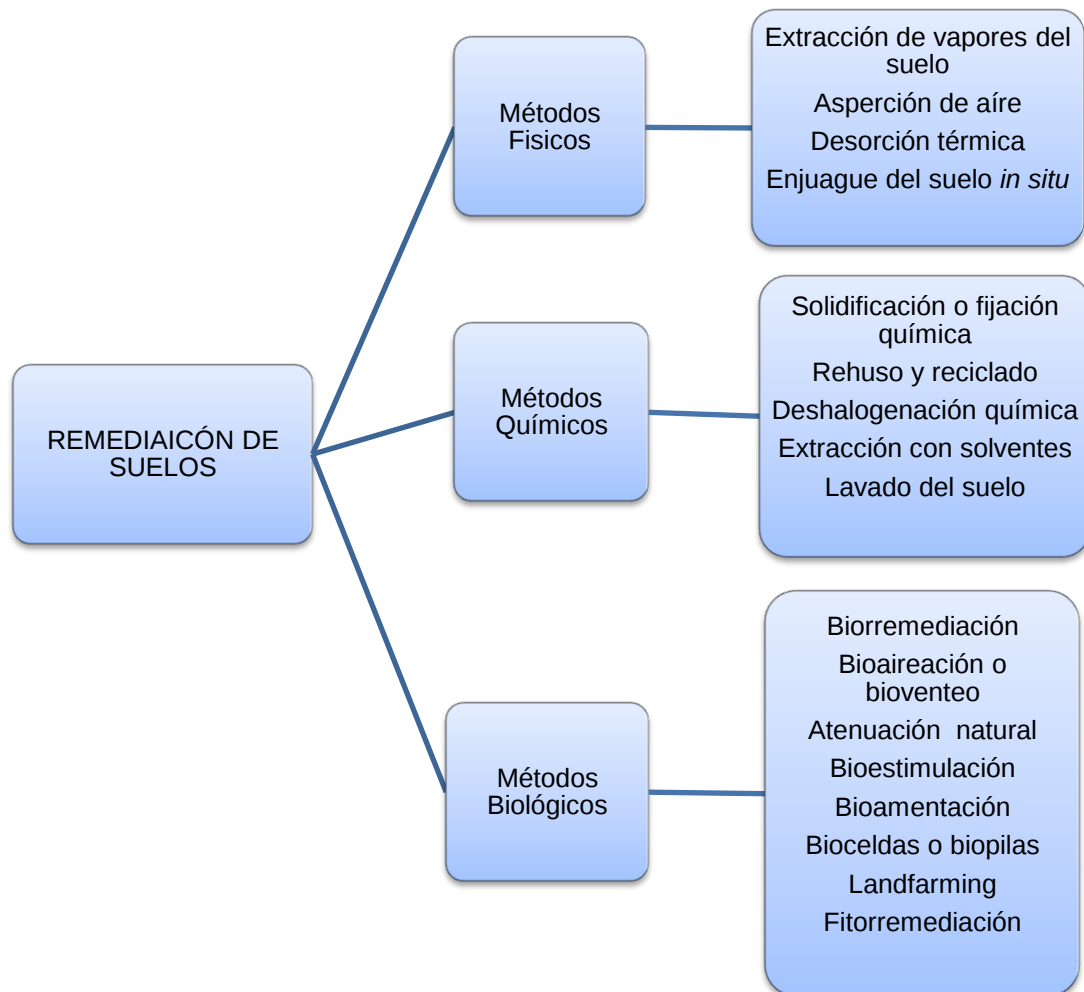


Figura 3. Clasificación de los diferentes tipos de remediación de suelos contaminados.

6.1. Biorremediación

La biorremediación, se refiere a cualquier método que usa microorganismos para reciclar materiales orgánicos y separar iones inorgánicos (Castillo *et al.*, 2005). La biorremediación presenta ventajas con respecto a otras técnicas de remediación, por ser un proceso natural para destruir contaminantes orgánicos.

Así mismo los productos formados son generalmente inocuos, la relación costo/efectividad es menor comparada con otras tecnologías, y puede ser ejecutada *in situ*.

De acuerdo a Gonzáles (2009) la biorremediación puede ser definida como el uso de organismos vivos, componentes celulares y enzimas libres, con el fin de realizar una mineralización (compuesto orgánico blanco se transforma en $H_2O + CO_2$), una transformación parcial, humificación de los residuos o agentes contaminantes y una alteración del estado redox de metales.

7. FITORREMEDIACIÓN

La fitorremediación es un proceso de descontaminación, que involucra el empleo de plantas que pueden remover, transferir, estabilizar, descomponer y/o degradar contaminantes del suelo, sedimentos y agua, como solventes, plaguicidas, hidrocarburos poliaromáticos, metales pesados, explosivos, elementos radiactivos y fertilizantes, para hacerlos más biodisponibles para la planta (McGrath *et al.*, 2001; Dietz and Schnoor, 2001). Esta técnica consiste en el uso de plantas, sus microorganismos y/o enzimas asociadas, así como de la aplicación de técnicas agronómicas para degradar, retener o reducir a niveles inofensivos los contaminantes ambientales a través de procesos que logran recuperar la matriz o estabilizar al contaminante. Dentro de las técnicas de restauración de suelos afectados por la contaminación, la fitorremediación ha adquirido auge por ser un procedimiento pasivo, estéticamente agradable y útil para remediar simultáneamente una gran variedad de contaminantes (Frick *et al.*, 1999). Es una tecnología emergente utilizada para limpiar contaminantes del ambiente, que ha dado resultados positivos en la degradación de ciertos contaminantes orgánicos (Alkorta and Garbisu, 2011).

El uso de plantas en suelos contaminados con hidrocarburos, surge del hecho de que la naturaleza puede subsanar incluso los peores daños ambientales ocasionados por hidrocarburos del petróleo, empleando para ello su capacidad

de regeneración, siempre y cuando tenga tiempo para hacerlo (Ortínez *et al.* 2003). Sin embargo se requieren décadas para que el hidrocarburo se descomponga por completo, a menos que se promueva el proceso apoyando a los microorganismos para que logren ese trabajo en menor tiempo.

Desde el punto de vista económico y ecológico, la fitorremediación es una técnica de remediación atractiva para suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (Olson *et al.*, 2008). Sin embargo, su aplicación en la escala comercial sigue siendo decepcionante, ya que es muy difícil para las nuevas tecnologías entrar en el mercado (Witters, 2012). A pesar de que la fitorremediación es una tecnología alternativa de bajo costo para limpiar suelos contaminados con petróleo, ha sido difícil que se implemente (Ferrera *et al.*, 2007).

Por último, se puede decir que el objetivo final de la fitorremediación de un suelo contaminado no debe ser sólo eliminar o reducir el contaminante, sino sobre todo, recuperar la calidad del mismo. Los indicadores biológicos de la calidad del suelo, en especial aquellos relacionados con las comunidades microbianas, presentan un enorme potencial para el seguimiento y control de un proceso fitorremediador (Carpena y Bernal, 2007).

7.1. Mecanismos en la fitorremediación

Algunos compuestos orgánicos pueden ser transportados a través de las membranas vegetales. De éstos, los compuestos de bajo peso molecular a menudo se pueden eliminar del suelo y liberar a través de las hojas por los procesos de evapotranspiración (fitovolatilización). Algunos de los compuestos no volátiles pueden ser degradados o convertidos en compuestos no tóxicos por vía enzimática, modificación y secuestro en planta (fitodegradación, fitoextracción). Otros compuestos son estables en las plantas y se puede quitar junto con la biomasa para el secuestro o la incineración (Gerhardt *et al.*, 2009). Así, existen plantas capaces de acumular al contaminante en sus tejidos, es

decir, lleva a cabo una fitoextracción (Ortiz *et al.*, 2009). Otras plantas contribuyen a la precipitación del contaminante a través de exudados radicales, lo que se le conoce como fitoestabilización. Algunas plantas tienen la capacidad de absorber, concentrar y precipitar al contaminante por medio de sus raíces proceso al que se le llama rizofiltración, mientras que otras plantas liberan sustancias específicas que provocan que el contaminante sea degradado, lo que se llama fitodegradación. Cuando los contaminantes orgánicos solubles y el agua son absorbidos por la planta y convertidos en gases que son liberados a la atmósfera por los estomas, se efectúa la fitovolatilización (Ferrera *et al.*, 2006).

7.2. Plantas fitorremediadoras

Entre las familias de plantas más utilizadas para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, se encuentran las gramíneas y las leguminosas, probando ser excelentes en la disminución de contaminantes (San Gabriel *et al.*, 2006). Los pastos son las plantas que mejor se adaptan a la presencia de hidrocarburo en suelo, por tener raíces fibrosas y extensas, lo que les permite abarcar mayor área de superficie de raíz en el suelo (Hernández y Mager, 2003). Sin embargo, por el hecho de poder conseguir el nitrógeno de la atmósfera, las leguminosas tienen una mayor capacidad de realizar sus funciones sin tener que competir con los microorganismos por el suministro de nitrógeno disponible en el suelo contaminado (San Gabriel *et al.*, 2006), y además, mejoran las características deseables de los suelos para su correcto funcionamiento.

Un ejemplo es el de *Phaseolus coccineus* que tiene potencial de uso en la fitorremediación al reducir el efecto negativo del combustóleo en el desarrollo de la planta (Ferrera *et al.*, 2007). Por su parte Njoku *et al.* (2009) encontraron que el crecimiento de soya (*Glicine max*) reduce la acidez del suelo contaminado con petróleo crudo. Este estudio también evidenció que a menos

de 110 días, el crecimiento de soya reduce la toxicidad de petróleo crudo en el suelo.

Las plantas, pueden servir múltiples funciones que influyen en el destino de los contaminantes orgánicos del suelo, al mismo tiempo promueven la degradación de las fracciones disponibles por estimulación de la actividad microbiana. Estos organismo aumentan el número de sitios de la matriz orgánica disponible para los hidrocarburos aromáticos policíclicos, influyendo en la adsorción y unión eventual (Parrish *et al.*, 2005).

El propósito de la fitorremediación es reconocido como una tecnología prometedora para la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP). Sin embargo, se sabe poco acerca de cómo las especies de plantas y de los patrones de cultivo afectan el proceso de la eliminación de los HAP (Meng *et al.*, 2011).

Por otra parte, se sabe que las plantas tienen la capacidad de degradar a los hidrocarburos, gracias a que algunos compuestos hidrófilos, tales como butil éter methil eter- y 1,4-dioxano, pueden ser absorbidos por las éstas a través de enlaces de hidrógeno con el agua de la transpiración (Dietz y Schnoor, 2001)

7.2.1. *Mucuna purines*

Mucuna pruriens (Lineo) D.C. conocida como fríjol terciopelo y pica pica manso, es una especie de la familia de las Fabáceas (leguminosas), que requiere un clima cálido húmedo para su máximo crecimiento, y se utilizan generalmente como cultivo de cobertura, en lugares con larga temporada sin heladas. Esta leguminosa crece desde el nivel del mar hasta los 2 100 m de altitud. El rango de precipitación para su desarrollo va de 650 a 2 500 mm. Tolera un amplio rango de suelos, desde arenas a arcillas, y crece en suelos con alta acidez (Skerman *et al.*, 1991).

Como muchas otras leguminosas, *M. pruriens* tiene la capacidad de formar asociaciones simbióticas con bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico. Al respecto Bruner *et al.* (2011) mencionan que mucuna se usa principalmente como un cultivo de cobertura o abono verde, aporta materia orgánica y nitrógeno (N) al suelo. Se informan rendimientos de biomasa fresca de 5.5 a 21 t ha⁻¹ y de N de hasta 331 kg ha⁻¹.

Otro uso para la mucuna es como un forraje de alta calidad. Se puede pastorear el ganado, las ovejas y las cabras en campos de frijol terciopelo cuando las vainas están maduras. Los bejucos también se pueden usar como un heno o ensilaje de alta proteína. El follaje con las vainas tiene un contenido proteico de 15.7%, las vainas solas de 16.4%, el heno 17.9% y las semillas secas de 20 a 35% de proteína.

Mucuna pruriens produce compuestos nematocidas y puede reducir las poblaciones de nematodos en rotaciones con otros cultivos. También tiene efectos alelopáticos que suprime el crecimiento de malezas.

7.2.2. *Leucaena leucocephala*

Leucaena leucocephala (Lamarck) de Wit, pertenece a la familia Fabaceae, tiene hábito de crecimiento arbustivo que va desde 1 a 20 m de altura, y su ciclo de vida es perenne. Actualmente, se le ha atribuido especial importancia en el ámbito agroforestal, por tratarse de una especie de amplio valor forrajero, fácil crecimiento y manejo, y por mejorar las condiciones de suelo, ya que tiene la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico al suelo, al estar en simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*.

Es una leguminosa nativa de México que se encuentra distribuida en todo el país. Zárate (1994) menciona que el género se encuentra distribuido a lo largo de la costa del Pacífico, desde Sonora hasta Chiapas; también en Veracruz. Habita en vegetación de selva baja caducifolia, bosque espinoso, bosque

tropical sonorense, encinar, orilla de manglar, y bosque secundario de *Brosimum* sp. *Leucaena* prospera a altitudes de 0-750 m, en suelo derivado de rocas ígneas o ígneo metamórficas.

Leucaena leucocephala representa una opción para enfrentar los problemas de escasez de forraje, al tener buenas propiedades nutricionales en rumiantes. Además, los árboles forrajeros proporcionan beneficios adicionales por conservar los recursos naturales, controlar la erosión del suelo y promover la diversidad de plantas y animales (Hernández, 2011).

8. DEGRADACIÓN POR MICROORGANISMOS

La eficiencia de la fitorremediación en suelos contaminados con hidrocarburos se basa en que la planta forma asociaciones raíz-microorganismos degradadores de hidrocarburo, y esto favorece que se lleve a cabo la degradación con mayor facilidad a que se dejara solo el suelo a la acción de la microfauna. Escalante *et al.* (2004), reportan que la rizodegradación es la acción que las raíces de las plantas llevan a cabo en asociación con la microflora y/o productos excretados que transforman el contaminante en la zona de la rizosfera. Al respecto, Contreras (2005) menciona que el recuento de bacterias siempre suele ser mayor en la rizosfera que en zona del suelo donde no se encuentran raíces. Esto se debe a que las raíces secretan cantidades considerables de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas estimulando el crecimiento intenso de bacterias y hongos. Se sabe que tanto la abundancia como la diversidad de microorganismos en el suelo, depende directamente del horizonte del suelo bajo estudio.

Por su parte, Solanas (2009) menciona que cuando se habla de biodegradación microbiana de hidrocarburos, nos referimos al hecho de que los microorganismos pueden crecer a expensas de la utilización de estos

compuestos químicos, que aunque parezca difícil de creer, se alimentan de benceno, naftaleno o pireno. Debido a que existen diferentes compuestos de hidrocarburos, Gonzales (2009) explica, que varían en la habilidad de ser degradados, ya que en los derrames, la fracción de hidrocarburo más volátil es evaporada con facilidad, dejando a los compuestos aromáticos y alifáticos para ser oxidados por diversos grupos de microorganismos. Otras fracciones como los hidrocarburos de cadena ramificada, y los policíclicos permanecen mucho más tiempo en el ambiente, principalmente si llegan a zonas anaerobias.

9. COMETABOLISMO

El término cometabolismo se utiliza con una doble definición: 1) proceso desarrollado fortuitamente por enzimas que son inducidas por una molécula diferente de aquella que se metaboliza y 2) procesos en los que los miembros de una comunidad microbiana metabolizan los subproductos metabólicos de otros. En condiciones naturales, no siempre es posible atribuir la biodegradación de una molécula a un grupo de microorganismos concretos.

10. MINERALIZACIÓN

Mineralización es la degradación completa de un compuesto a sus constituyentes minerales, en donde el carbono orgánico es oxidado hasta CO_2 . Dado que la descomposición de un sustrato orgánico por medio del proceso de respiración aeróbica tiene como productos principales CO_2 y H_2O , la evolución de CO_2 puede utilizarse como un indicador bastante preciso de la actividad respiratoria de comunidades en agua y suelo. Dicho objetivo se cumple en la medida que el ensayo de mineralización se realiza bajo condiciones aeróbicas. Al respecto, Pascual-S y Venegas (2008) plantean, que se puede medir la actividad metabólica de microorganismos heterotróficos estudiando la mineralización de sustratos orgánicos.

11. TOXICIDAD DE LOS HIDROCARBUROS

Fernández *et al.* (2006) mencionan, que la toxicidad es el grado de efectividad de una sustancia tóxica en humanos, animales, plantas o microorganismos. Este efecto adverso puede tomar varias formas, como enfermedad, deformidad, modificaciones del comportamiento, cambios en la reproducción, daño genético o muerte. La toxicidad se evalúa mediante ensayos que consisten en exponer organismos vivos (algas, bacterias, vegetales y fauna en general) a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones, y registrar los efectos sobre los mismos.

Existen distintas pruebas para determinar el grado de toxicidad del hidrocarburo. Sin embargo, en este tipo de pruebas no se puede establecer con precisión la mortalidad de una plántula, por lo que se utilizan otros parámetros que indiquen otros efectos tóxicos (Cuevas *et al.*, 2012), entre los que se encuentran indicadores como: germinación, producción de biomasa y elongación de raíz y tallo. Para estandarizar los datos, la germinación promedio de los tratamientos se establece como porcentaje en relación al control, el cual se asume como 100 %.

11.1. Toxicidad en función de la concentración

De los parámetros de toxicidad más usados se encuentran: la CL_{50} (concentración letal media), la CE_{50} (concentración efectiva media), concentración inhibitoria (concentración de tóxico que inhibe un proceso biológico), NOEC (Máxima concentración de tóxico para la cual no se observan efectos sobre los organismos ensayado), LOEC (Mínima concentración de tóxico en la cual se observan efectos sobre los organismos). Se puede decir que una sustancia es más tóxica si requiere de una menor concentración para producir la letalidad o algún otro daño que aunque no cause la muerte del espécimen, cause manifestaciones de toxicidad que limiten su desarrollo, reproducción y sobrevivencia. Para tal efecto se ha establecido una clasificación para asignar categorías de toxicidad en función de la concentración (Cuadro 2).

Cuadro 2. Clasificación de la toxicidad en función de la concentración.

Categorías de toxicidad en función de la concentración de contaminante.	Valor
Extremadamente tóxico	$<1 \text{ mg kg}^{-1}$
Altamente tóxico	$1-50 \text{ mg kg}^{-1}$
Moderadamente tóxico	$50-500 \text{ mg kg}^{-1}$
Ligeramente tóxico	$0.5-5 \text{ g kg}^{-1}$
Prácticamente atóxico	$5-15 \text{ g kg}^{-1}$
Relativamente inocuo	Más de 15 g kg^{-1}

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE TOMA DE MUESTRA DEL SUELO

El suelo se recolectó en la comunidad Moctezuma del municipio Francisco Z. Mena, Puebla, localizado en la zona de producción de petróleo nombrada Activo Aceite Terciario del Golfo, a responsabilidad de PEMEX. Se ubicó una parcela agroforestal adyacente a un pozo petrolero, por la cual pasan bajo tierra, ductos que transportan petróleo crudo proveniente de los pozos aledaños, condición en la que se encuentran un gran número de parcelas de cítricos con manejo agroforestal en la zona y que están en alto riesgo de sufrir impactos ambientales por los derrames de hidrocarburos. En la Figura 4, se presenta la ubicación de la zona de toma de muestra de suelo; empezando por el estado, municipio y la superficie de la parcela con sus respectivos sitios de muestreo.

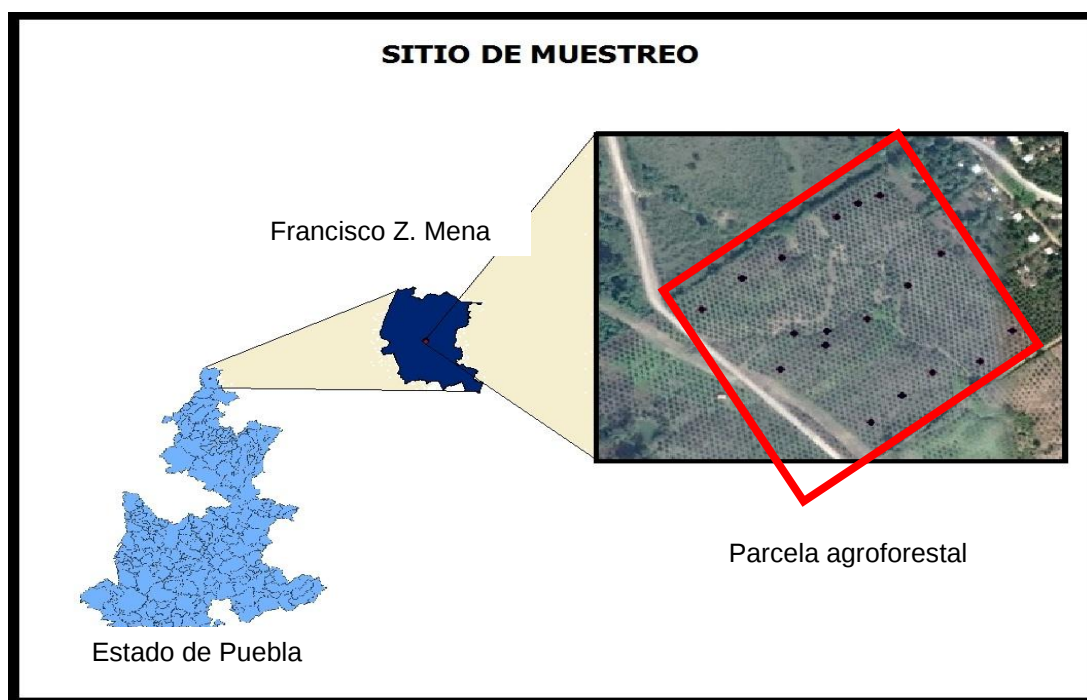


Figura 4. Localización de la parcela agroforestal naranja- maíz-fríjol ubicando los puntos de muestreo en el área de estudio en el municipio Francisco Z. Mena.

2. CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL LUGAR DE MUESTREO

La parcela consta de un sistema agroforestal en el que se tiene naranja como cultivo perenne y maíz, y frijol como cultivos anuales alternados en el año, donde se cultiva maíz en una temporada y frijol en la siguiente, o bien dos ciclos de maíz durante el año. El sistema es de temporal y de bajos insumos. La siembra de los cultivos anuales se realiza en invierno y verano en los callejones del cultivo perenne.

El suelo que se utilizó en la mayor parte de las muestras fue vertisol pélico con textura fina. Algunos puntos de muestreo fueron tomados en suelo regosol calcárico con textura media, ambos con uso de suelo de pastizal cultivado (Figura 5). La parcela está localizada entre las coordenadas 20°43'47''N y 95°50'50''O a una altura de 256 m en el punto más alto de muestreo y 193 en el más bajo. El clima del sitio es cálido sub-húmedo con abundantes lluvias en verano, precipitación media anual de 1500 a 2000 mm y temperatura media anual superior a 24°C.

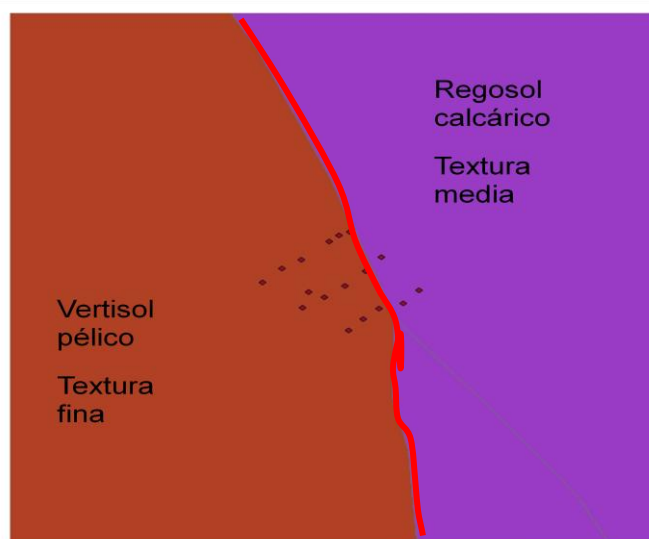


Figura 5. Edafología del sitio muestreado según INEGI (2012)

3. TOMA DE MUESTRA DE SUELO

El día 3 de abril de 2014 se tomaron 18 muestras de suelo a una profundidad de 20 cm, de 9 kg cada una, las cuales estaban distribuidas a lo largo y ancho de la parcela, que se encontraba dividida por un arroyo (en la parte baja). Se tomaron tres muestras de la parte alta, tres de la parte media y tres de la parte baja del terreno, por ambos lados del terreno, como se muestra en la Figura 6.



Figura 6. Muestreo de suelo en la parcela agroforestal (maíz y/o frijol- cítrico) en el municipio Francisco Z. Mena.

4. MANEJO DE SUELO

El suelo recolectado (aproximadamente 162 kg), se extendió sobre plástico y se secó al aire durante tres días. Posteriormente se rompieron terrones, y se hicieron partículas pequeñas para homogenizarlo. De este suelo triturado y homogenizado, se pesaron especímenes de 900 g y se colocaron en botellas de vidrio color ámbar previamente cortadas, limadas y lavadas, como lo sugiere la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, para continuar con el establecimiento del experimento en invernadero.

5. PREPARACIÓN DEL SUSTRATO

Las macetas de color ámbar que contenían al suelo seco (900 g), se vaciaron en una cacerola de peltre para incorporar petróleo crudo a diferentes concentraciones: (10,000; 25,000; 35,000 y 50,000 mg) de petróleo crudo por kilogramo de suelo. Para lograr las concentraciones mencionadas, se pesaron las siguientes cantidades de petróleo crudo: 9, 22.5, 31.5 y 45 g, respectivamente.

Se mezcló el petróleo crudo con el suelo muestreado, para lograr una mejor homogenización, se colocó el suelo en cacerolas de peltre (recomendadas por no retener al hidrocarburo en la superficie) y se adicionó el hidrocarburo diluido en hexano a concentración 1:2 (para poder lograr una mejor homogenización del petróleo crudo). El suelo humedecido se mezcló con ayuda de una cuchara de peltre (Hernández, 2002), y se pasó a las macetas de vidrio correspondientes, debidamente identificadas con etiquetas (Figura 7).



Figura 7. Preparación de sustrato, incorporación de petróleo crudo.

6. UNIDADES EXPERIMENTALES

Las unidades experimentales fueron las botellas de vidrio color ámbar cortadas y lijadas en los bordes, sin orificios para drenaje, para evitar la pérdida de agua. Las dimensiones de las unidades experimentales fueron de 10 cm de diámetro por 18 de altura, a las cuales se les adicionó 900 g de suelo y sus correspondientes concentraciones de petróleo crudo. Los tratamientos establecidos en el diseño experimental se presentan en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Diseño de tratamientos para cada tiempo de muestreo.

Tratamiento	Concentración (mg de hidrocarburo por kg de suelo)	Especie	Total de Unidades Experimentales
T1	0	Sin Planta	8
T2	0	Mucuna	8
T3	0	Leucaena	8
T4	10000	Sin Planta	8
T5	10000	Mucuna	8
T6	10000	Leucaena	8
T7	25000	Sin Planta	8
T8	25000	Mucuna	8
T9	25000	Leucaena	8
T10	35000	Sin Planta	8
T11	35000	Mucuna	8
T12	35000	Leucaena	8
T13	50000	Sin Planta	8
T14	50000	Mucuna	8
T15	50000	Leucaena	8

7. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se estableció un diseño experimental completamente al azar con diseño de tratamientos en factorial de tres factores: concentración de hidrocarburo, especie de planta y días después de siembra; con 5, 3 y 2 niveles respectivamente, con cuatro repeticiones cada tratamiento. Presentando el siguiente modelo:

Modelo:

$$Y_{cpse} = \mu + H_c + E_p + F_t + (HE)_{cp} + (HF)_{ct} + (EF)_{pt} + (HEF)_{cpt} + E_{cpte}$$

Donde:

Y_{cpse} = Variable respuesta.

μ = Media general de la variable respuesta.

$c=1,2,3,4,5$ (0; 10,000; 25,000; 35,000 y 50,000 mg kg⁻¹)

$p=1,2,3$ (sin planta, mucuna y leucaena)

$t=1,2$ (60 y 120 días después de siembra)

8. PREINSTALACIÓN AL EXPERIMENTO

Una vez que se preparó el suelo con las diferentes concentraciones de hidrocarburo, las macetas se dejaron al aire libre (sin planta) durante siete días, para garantizar que todo el solvente que se utilizó para hacer la mezcla (petróleo crudo-hexano), se volatilizara del suelo y quedara únicamente petróleo crudo en el sustrato preparado (Figura 8a).

Por otra parte, nueve días antes de instalar el experimento, se pusieron a germinar las semillas de leucaena, y cinco días después se prepararon las de mucuna, esto con base a las pruebas preliminares de germinación. Para realizar la germinación, las semillas se colocaron en toallas de papel húmedas, cubiertas por una bolsa de plástico transparente (Figura 8b).



Figura 8. Preinstalación: evaporación del solvente a) y germinación de semillas b).

9. INSTALACIÓN DEL EXPERIMENTO

El experimento se manejó bajo condiciones controladas de invernadero, en el invernadero del Departamento de Suelos ubicado en la UACH. El propósito de manejar a las plantas en invernadero, fue para tener condiciones cercanas a las del clima tropical (especies que se desarrollan en éstas condiciones).

El día 30 de abril de 2014, se procedió a colocar dos plántulas (de las semillas previamente germinadas) de cada especie en el recipiente del tratamiento correspondiente (Figura 9), esto para garantizar que la sobrevivencia al trasplante; al transcurrir siete días de plantadas, se quitó una de ellas,

seleccionando la de mejor vigor, mejor desarrollo o mejor situada en la maceta. Instalado el experimento, el manejo de las plantas fue básico ya que se aplicó riego una o dos veces al día, según las condiciones ambientales dentro del invernadero, con la precaución de agregar muy poca agua al suelo, suficiente para la planta, evitando saturar el suelo, debido a que los recipientes no contaban con drenaje (para evitar lixiviación de hidrocarburos). Otros cuidados que se dieron a las plantas fueron: evitar la presencia de plagas de manera manual, también se colocó rafia para tutoreo, para que mucuna condujera su desarrollo en forma vertical y después horizontal, evitando que se enredaran unas con otras.

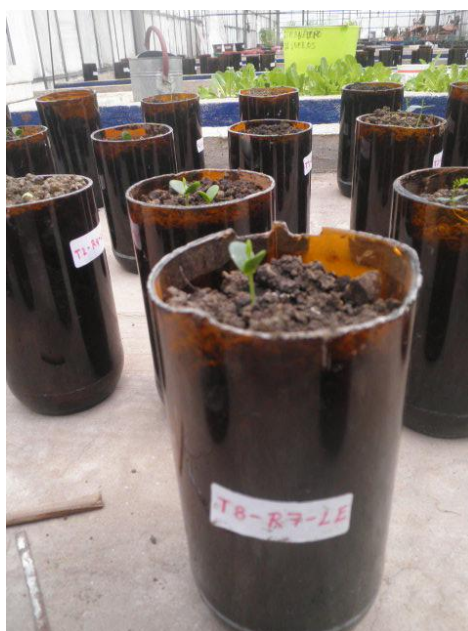


Figura 9. Trasplante de plántulas pregerminadas en laboratorio.

10. VARIABLES A EVALUAR ANTES, DURANTE Y AL FINALIZAR EL EXPERIMENTO

10.1. Prueba de germinación

La toxicidad del petróleo crudo sobre las dos especies estudiadas se determinó de la siguiente forma: se lavaron las semillas con solución de hipoclorito de sodio al 5%. Posteriormente se colocaron 20 semillas de cada especie en cajas Petri con algodón con tres repeticiones para cada tratamiento. Los tratamientos fueron: 100, 1 000, 10 000, 100 000 mg.l⁻¹ de petróleo crudo por litro de hexano, también se instaló un testigo positivo (solo con hexano), y el testigo negativo (solo con agua destilada). Para esto se hicieron las diluciones a las concentraciones mencionadas usando hexano como solvente, por lo que para eliminar el solvente de los tratamientos se metieron a la campana de extracción durante tres horas antes de colocar las semillas sobre el algodón con la caja Petri (Figura 10). Después las cajas se metieron a la cámara de germinación a 30 °C, y diariamente se revisó que las semillas tuvieran suficiente humedad para embibirse, de lo contrario, se adicionaba 1-2 ml de solución de agua con dimetil sulfóxido al 0.05%. Las semillas permanecieron en la cámara de germinación hasta que el 65% de las semillas del testigo negativo habían germinado. El criterio de semilla germinada, fue el de la radícula con longitud superior a 5 mm.



Figura 10. Prueba de germinación a diferentes concentraciones de petróleo crudo sobre papel filtro.

10.2. Altura de planta

Después de 60 y 120 días de experimento (dos tiempos de muestreo) se procedió a medir las variables respuesta, empezando con la determinación de altura de planta.- Para esto se cortó la planta al ras de suelo, y se colocó sobre una superficie plana en papel de estraza y se midió desde la base hasta el ápice con cinta métrica.

10.1. Área foliar

El área foliar se midió con el aparato Portable area meter LI-COR, modelo LI-3000. Las hojas fueron desprendidas del pedicelo y se hicieron pasar individualmente por la banda, y se tomó la lectura que reportaba el equipo.

10.2. Longitud de raíz

Para medir la longitud de raíz se hizo lo siguiente: se quebró la maceta de vidrio, para que al retirar el suelo se pudiera extraer la raíz de la manera más integra posible. Con una espátula se quitó el suelo adherido a la maceta, para posteriormente medir la raíz con cinta métrica, desde la base del tallo hasta la punta de la raíz.

10.3. Volumen radicular

Para evaluar el volumen radicular, fue necesario que la raíz se encontrara limpia y libre de partículas de suelo. Se utilizaron probetas de 10, 50 y 100 ml, según el tamaño de la raíz en cuestión; para esto se llenó la probeta a un volumen conocido y seguido a esto se metió la raíz limpia dentro de la probeta, de esta manera se tomó la lectura del volumen de agua desplazado en la probeta.

10.4. Presencia o ausencia de nódulos rizosféricos

Una vez que se tuvo la raíz fuera del suelo por completo, se lavó y revisó si existía presencia o ausencia de nodulación.

10.5. Peso seco de parte aérea y raíz

Una vez tomadas las medidas en fresco, se colocaron las muestras en bolsas de papel debidamente identificadas; después se metieron a la estufa a una temperatura constante de 80°C durante 24 horas y posteriormente se verificó cada seis horas hasta obtener un peso contante. Se pesó en balanza semi-analítica de la marca Precisa modelo BJ 410 C.

11. VARIABLES DEL SUELO

Todas las variables medidas en suelo fueron por los métodos descritos en la NOM-021-RECNAT-2000, mediante las técnicas presentadas en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Técnicas utilizadas para la determinación de variables medidas en suelo.

VARIABLE DE SUELO	TÉCNICA USADA PARA SU DETERMINACIÓN
Textura	Por el método de Bouyoucos
Potencial de hidrógeno (pH)	Se midió con potenciómetro en una relación suelo-agua destilada 1:2
Conductividad eléctrica (CE)	En pasta de saturación y determinado con puente de conductividad.
Carbono orgánico (MO)	Método de Walkey y Black.
Nitrógeno inorgánico	Por el procedimiento de micro-Kjeldalh
Fósforo Soluble	Por el método Bray-I, extraído con mezcla de NH_4F + HCl y el desarrollo de color con ácido ascórbico cuantificado colorimétricamente por Espectrometría Visible.
Potasio Extractable	Extraído con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1.0 N ajustado a pH= 7.0 en relación 1:20 y determinados por Espectrofotometría de Emisión Atómica.
Capacidad de intercambio catiónico (CIC)	Por saturación con acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) 1.0 N ajustada a pH 7.0 y cuantificado por arrastre de vapor y titulado con ácido sulfúrico.

12. CUANTIFICACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO (HTP'S)

La cuantificación de los hidrocarburos presentes en petróleo crudo, se realizó mediante el método gravimétrico, usando como técnica de extracción al Soxhlet.

12.1. Extracción con Soxhlet

En el Cuadro 5 se muestran los materiales y reactivos utilizados para la extracción.

Cuadro 5. Material, equipo y reactivos para la extracción con soxhlet.

Material y Equipo	Reactivos
Equipo de reflujo Soxhlet de 250 ml.	Sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4).
Sistema de refrigeración y circulación de agua.	Diclorometano (cloruro de metileno, CH_2Cl_2) grado HPLC.
Perlas de ebullición.	
Cartuchos de celulosa.	
Balanza analítica.	
Viales de 40 ml	
Espátula	

12.1.1. Procedimiento

Se colocaron 10 g de suelo seco (finamente molido en mortero), después se adicionaron 10 g de sulfato de sodio anhidro (relación suelo:sulfato 1:1) y se mezcló con la espátula, sobre un pedazo de papel aluminio, posteriormente la muestra preparada se pasó a un cartucho de celulosa (Figura 11).

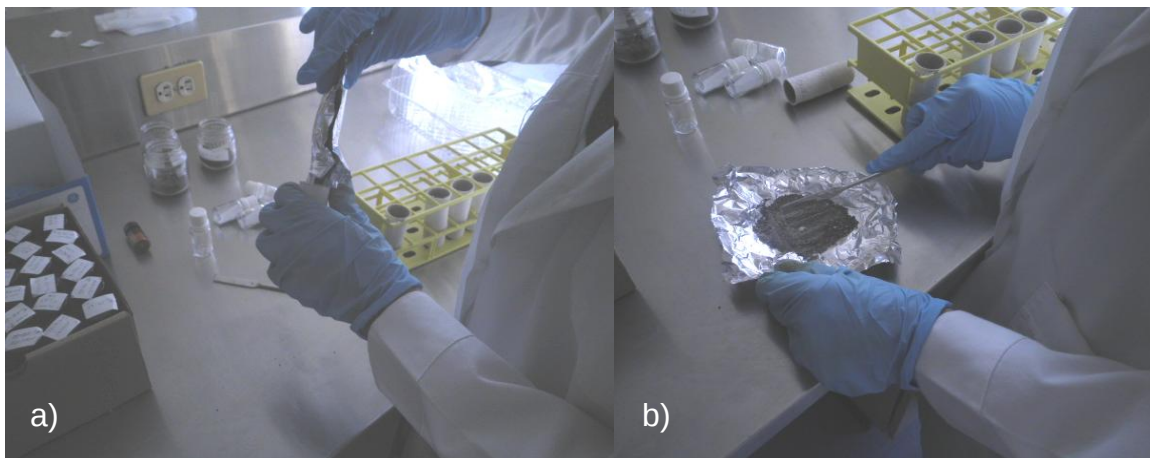


Figura 11. Adición de sulfato de sodio anhidro al suelo seco a) y vaciado al cartucho de celulosa b).

El cartucho de celulosa se colocó dentro del Soxhlet y en el matraz de bola con tres perlas de ebullición. Se agregaron al matraz 125 ml de cloruro de metileno, para después colocarlo sobre el mantillo que sirvió de base para realizar la extracción, utilizando 20 reflujos por hora, dejándolo a temperatura constante durante 6 horas (Figura 12). Durante las seis horas que duró la extracción se tuvo cuidado de evitar la pérdida del solvente por evaporación, por lo que se mantuvo la temperatura de los condensadores a 5 °C.



Figura 12. Montaje del equipo de extracción Soxhlet de 250 ml.

12.2. Determinación de humedad del suelo

El material y equipo que se utilizaron para secar el suelo y determinar la cantidad de agua que contenía en el muestreo fueron: muestras de suelo, balanza analítica, espátula, papel aluminio y estufa.

12.2.1. Procedimiento

Se pesaron 10 g de muestra de suelo sobre un papel de aluminio (10x10 cm), después se colocó la muestra dentro de la estufa a 80°C de 12 a 24 horas (hasta tener peso constante). Luego se sacó la muestra de la estufa y se colocó dentro de un desecador hasta alcanzar temperatura ambiente. Por último se pesó la muestra con todo y papel (Figura 13) y se realizaron los siguientes cálculos.

$$\% \text{ Humedad del suelo} = (\text{Peso húmedo} - \text{Peso seco}) * 100 / 10$$



Figura 13. Pesado de suelo seco en balanza analítica.

12.3. Método gravimétrico

El método gravimétrico consiste en conocer el peso del compuesto extraído del suelo, para lo que antes se requiere tener conocimiento del peso exacto del suelo (peso seco) y de los recipientes que contendrán el petróleo. Los materiales empleados fueron: matraces de bola de 250 ml, rotoevaporador, viales de 40 ml, balanza analítica, pinzas y papel aluminio.

12.3.1. Procedimiento

Se metieron a la estufa los viales de 40 ml (sin tapa) a una temperatura de 120 °C durante 4 horas, se colocaron en un desecador para enfriar y se repitió el paso hasta tener peso constante (Figura 14), y se anotó el peso del recipiente (RA).

Terminada la extracción, se pasó el solvente con el extracto contenido en el matraz de bola a un rotoevaporador y se evaporó el solvente, hasta dejar aproximadamente unos 10-15 ml, de ahí el extracto se pasó al vial (previamente pesado) y se enjuagó el matraz tres veces. El residuo del lavado se depositó dentro del mismo vial, después se evaporó el solvente en el rotoevaporador hasta sequedad (Figura 14), y se tomó el peso del vial con hidrocarburo (RB).



Figura 14. Extracción de solvente mediante evaporación.

12.3.2. Cálculos

HTP's (mg kg⁻¹ de s.s.) = (RB – RA) * (FC) / (P * FH).

Donde:

HTP's (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg kg⁻¹ de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad (1-(%humedad/100)).

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

Por otra parte se determinó la eficiencia de extracción, para esto se tomó una muestra de suelo con petróleo crudo a las concentraciones conocidas y después se extrajo el hidrocarburo con el solvente (en las mismas condiciones que todas las demás muestras). La eficiencia de extracción fue del 86%, valor con el que se ajustó el valor de los HTP's, y se conoció la cantidad real de hidrocarburo contenido en la muestra de suelo.

13. DETERMINACIÓN DEL ESTADO NUTRIMENTAL DE LAS PLANTAS

En las plantas se determinaron los tres macronutrientes más comunes (N, P y K). Después de determinar las variables descritas en los párrafos 10.2 a 10.7 (variables morfológicas), se metieron las plantas en bolsas de papel, y se secaron a temperatura de 70°C durante 48 horas. Posteriormente se molieron las muestras (en un molino eléctrico), se pesaron en balanza analítica alcanzando un peso de 0.5 g de muestra, y se pasaron a tubos de digestión, para realizar la digestión con ácido sulfúrico (H₂SO₄ + H₂O₂).

La cuantificación del nitrógeno se determinó por micro Kjeldal mediante destilación por arrastre de vapor (Bremer, 1965), el fósforo mediante el método de vanadato molibdato y el potasio por espectrofotómetro de absorción atómica.

La interpretación de los resultados del análisis nutrimental de las especies en cuestión, se realizó a través de índices de balance Kenworthy y Desviación óptima porcentual (DOP) para los tres nutrimentos. Se consultaron investigaciones previas sobre el contenido nutrimental de las especies y bajo los estándares reportados por Adebawale *et al.*(2005); Shelton y Brewbaker (2004); Kambashi *et al.* (2014); Chicagwa *et al.* (2009); García *et al.*(1996), se realizaron los cálculos correspondientes y se graficó el nivel de presencia del macroelemento en cuestión.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. TOXICIDAD

Los resultados obtenidos en las pruebas de germinación, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.625 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados mostraron que la germinación tuvo diferencias significativas con una $p \leq 0.001$ entre el factor concentración de hidrocarburo. Se observó que el testigo positivo tuvo el valor más alto de germinación al presentar diferencias significativas con todos los demás tratamientos. También se observó que conforme aumentó la concentración de hidrocarburo en suelo, la germinación tendió a disminuir. En el factor especie de planta, se observó que leucaena fue la especie con el valor más alto de germinación (44.98%), y presentó diferencia significativa con mucuna (38.10%). En la interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP) se observó el mismo comportamiento que lo explicado con anterioridad (Cuadro 6).

Del Cuadro 6 desprende que, la presencia del solvente, causó aumento en la germinación. La presencia de petróleo crudo disminuyó la germinación de las semillas. Leucaena presentó el valor más alto de germinación y tuvo diferencias significativas con respecto a mucuna.

Merkel *et al.*, (2004) encontraron que la germinación de semillas de leguminosas (*Brachiaria brizantha*, *Panicum maximum*, *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Mimosa orthocarpa*, *Mimosa carporum*, *Stylosanthes capitata*) se vio afectada por la presencia de petróleo crudo en 0, 3 y 5% (0, 30 000 y 50 000 mg kg^{-1}) pero no significativamente, la única especie que presentó diferencia significativa fue *Desmodium glabrum* en la emergencia de la semilla, al disminuir la emergencia de 89% en concentración del 300 000 mg kg^{-1} y 88%

de germinación a concentraciones de 50 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo. Para la presente investigación se observa que contrario a las especies evaluadas por Merkl *et al.*, (2004), mucuna y leucaena presentaron diferencias significativas entre el testigo negativo y concentraciones superiores al 1%. Esto se debe a que las especies estudiadas por dichos autores son de porte bajo y consistencia semileñosa (diferentes a mucuna y leucaena). Sin embargo, son similares a *D. glabrum*, que muestra similitud en la germinación.

Por otra parte Díaz (2012) observó que la germinación en la especie *Casuarina equisetifolia* presentó una germinación más alta en concentraciones mayores de hidrocarburo, mientras que las concentraciones bajas mostraron un atraso de cinco días en la germinación. Lo anterior contrasta con lo que se encontró en esta investigación, donde se manifestó que a concentraciones más altas de petróleo crudo, la germinación disminuye significativamente. Esto se debió a que la semilla presentó mayor dificultad para imbibirse al estar cubiertas total o parcialmente por el hidrocarburo.

La técnica para determinar toxicidad de hidrocarburos (EPA, 1996), especifica que para cálculos de toxicidad, se toma como estándar del total de germinación al resultado obtenido del testigo negativo (sin hidrocarburo y sin solvente), se observó que leucaena tiene una germinación del 100%, mientras que mucuna tiene el 42% de germinación. A pesar de las diferencias en germinación, el resultado expresa que la CL₅₀ (concentración letal media) de leucaena y mucuna se encuentra en concentraciones superiores a 10 000 mg kg⁻¹. (Figura 15).

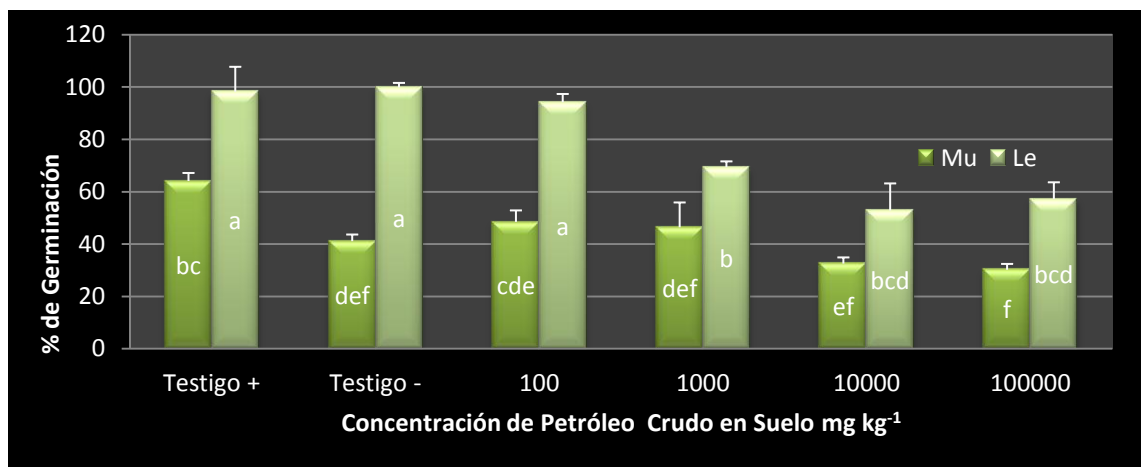


Figura 15. Germinación de semillas a concentraciones logarítmicas de petróleo crudo.

Al respecto Labud *et al.* (2007) mostraron que conforme aumenta la concentración de hidrocarburo, se incrementa la toxicidad sobre las semillas de raygras, siendo el diesel el que mostró mayor toxicidad, el petróleo crudo una toxicidad media y la gasolina la menor toxicidad. Lo que explica el comportamiento en la germinación de mucuna y leucaena.

Los resultados obtenidos revelaron que para mucuna y leucaena, el petróleo crudo que se utilizó es prácticamente atóxico, ya que la concentración a la que se presenta el 50% de la falta de germinación, está a los 10 000 mg kg⁻¹, según la clasificación de toxicidad en función de la concentración, que se presentó en el Cuadro 2.

2. VARIABLES MORFOLÓGICAS EN PLANTA

2.1. Altura de planta

Los resultados obtenidos en la variable altura de planta, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.347 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

En los efectos simples de factores, presentados en el Cuadro 6, se observó que conforme aumentó la concentración de petróleo crudo, se reduce

significativamente la altura de planta hasta un 78% a 50 000 mg kg⁻¹ con respecto al testigo. El efecto de la especie de planta presentó diferencias significativas, con aumento de más de cuatro veces en la especie mucuna con respecto a leucaena. En el tiempo de muestreo, se observó que a los 120 días aumentó 17% la altura con respecto a los 60 días.

Para los efectos de las interacciones dobles en el Cuadro 6, se muestra que la interacción especie de planta*tiempo de muestreo, el valor más alto (41.5 cm) lo obtuvo mucuna a los 120 días, siendo cinco veces más alta que leucaenaleucaena a los 60 días que presentó el valor más bajo (8.15 cm). En la interacción concentración de petróleo crudo*tiempo de muestreo se observó que conforme aumenta la concentración de hidrocarburo, disminuye la altura para las dos especies estudiadas. También se mostró que en ausencia de petróleo crudo a los 120 días, se presentó el valor más alto (59.6 cm) y el valor menos favorecido (9.4 cm) estuvo a los 35 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo a los 60 días, inferior en un 84% con respecto al valor más alto. En la interacción concentración de petróleo crudo*especie de planta, se observó que el valor más alto de altura lo presentó el tratamiento sin hidrocarburo sembrado con mucuna (73.1 cm), siendo superior casi 17 veces que el tratamiento menos desarrollado (4.35 cm) que se presentó en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ con leucaena.

Al respecto Rivera *et al.* (2005) demostraron que la planta de guaje (*Leucaena* sp.) fue menos sensible que las leguminosas zarsa y dormilona a la exposición de petróleo crudo a concentración de 150 000 mg kg⁻¹, ya que sobrevivió a su efecto y creció un poco al pasar de 8 a 13cm después de 120 días de exposición. Resultados similares fueron observados en la presente investigación, en donde se encontró que la planta sobrevivió a las concentraciones de petróleo crudo empleadas, y además aumentó poco más del 50% al pasar de 60 a 120 días.

Cuadro 6. Medias de altura (cm) de *L. leucocephala* y *M. pruriens* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).|||||

EFECTOS SIMPLES							INTERACCIONES DOBLES				
HB***	Media ^Z	PTA***	Media ^Z	TPO***	Media ^Z	IPT***	Media ^Z	IHT***	Media ^Z	IHP***	Media ^Z
0	47.82 a	MU	38.41 a	60 D	21.19 b	MU60	35.67 b	060D	40.47 b	0LE	18.35 c
10000	37.39 b	LE	9.09 b	120 D	24.89 a	MU120	41.48 a	0120D	59.58 a	0MU	73.09 a
25000	11.37 c					LE60	8.15 c	1060D	31.6 c	10LE	11.71 de
35000	10.32 c					LE120	10.14 c	10120D	44 b	10MU	66.72 b
50000	10.27 c							2560D	11.27 d	25LE	7.72 ef
								25120D	11.49 d	25MU	15.54 cd
								3560D	9.37 d	35LE	5.66 ef
								35120D	11.27 d	35MU	16.53 cd
								5060D	10.41 d	50LE	4.35 f
								50120D	10.15 d	50MU	17.04 cd

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=Mucuna, LE= Leucaena.

Ferrera *et al.* (2007) encontraron que la presencia de 50 000 mg kg⁻¹ de combustóleo en planta redujo significativamente la altura de la planta de *Phaseolus coccineus*. Resultados similares se obtuvieron para mucuna, que redujo un 40%, y para leucaena, con reducción del 84%. Condición debida a que la planta no obtiene suficiente agua y nutrimentos del suelo, lo que hace que se perjudique su desarrollo. Resultados similares aportó Díaz (2012) en *Casuarina equisetifolia* y Zavala *et al.* (2005), quienes en cultivo de pastos encontraron diferencias significativas en la altura de planta cuando el suelo presentó una concentración alta de petróleo.

Sin embargo se mostró discrepancia con los resultados obtenidos por Nie *et al.* (2011), quienes presentaron correlaciones positivas entre el crecimiento de planta y la concentración de hidrocarburo, la discrepancia, probablemente se deba a que el tiempo de evaluación fue reducido y la planta se benefició por el carbono presente en los hidrocarburos, mientras no tuvo problemas de nutrición ni drenaje.

En este trabajo se observa que la especie con mayor altura de planta fue mucuna ya que en todos los tratamientos fue superior a lo mostrado por leucaena. Contrario a lo que sucedió en la raíz, la altura de planta siguió aumentando conforme pasó el tiempo, sin embargo si se vio afectada, por tener menor incremento en el tamaño, presentó diferencias significativas en la reducción de altura a partir de la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ y además tuvo el mismo comportamiento en las dos concentraciones superiores (35 000 y 50 000 mg kg⁻¹). Leucaena también presentó diferencias significativas con respecto al testigo a la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo (Figura 16).

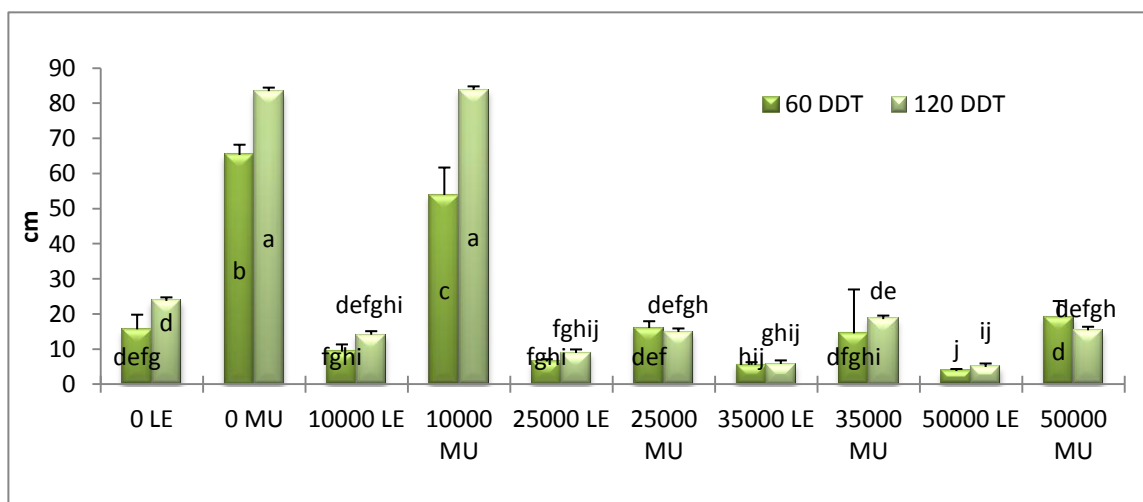


Figura 16. Altura de planta expresada (cm) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

2.2. Área foliar

Los resultados obtenidos en la variable área foliar, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.162 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

En términos generales y estadísticos, se observó que conforme aumentó la concentración de hidrocarburo en el suelo, el área foliar (AF) en planta disminuyó hasta casi un 50% en la concentración más alta comparado con el testigo. En el efecto especie de planta, se observó que mucuna produjo siete

veces más área foliar que leucaena, debido a que la primera tiene un desarrollo más rápido por ser de consistencia herbácea. En el factor tiempo de muestreo se observó que a los 60 días hubo mayor desarrollo de área foliar, lo que produjo diferencia significativa en comparación con los 120 días. Dicho comportamiento se debió a que, para el segundo tiempo de muestreo, mucuna había sufrido defoliación debido al estrés que le causó la inundación de las raíces (antes mencionado).

En la interacción especie de planta*tiempo de muestreo, mucuna a los 60 días fue la especie que presentó el valor más alto (367.09 cm^2), superior siete veces que el valor más bajo que fue con leucaena a los 60 días (33.77 cm^2). En la interacción concentración de petróleo crudo*tiempo de muestreo, se tuvo que el más alto valor (271.53 cm^2) de AF lo presentó el suelo sin hidrocarburo a los 60 días mientras que el valor más bajo (48.01 cm^2) estuvo a $50\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ a los 120 días, siendo inferior casi seis veces que el valor más alto presentado. En la interacción concentración de petróleo crudo*especie de planta, se observó que el valor más alto (341.21 cm^2) se obtuvo en suelo sin hidrocarburo y mucuna mientras que el valor más bajo (7.52 cm^2) lo tuvo leucaena en la concentración más alta (Cuadro 7).

El área foliar es un parámetro con el que se mide la cobertura en hojas que tiene la planta y de forma indirecta indica la eficiencia que tiene la planta para aprovechar la luz solar y por lo tanto realizar fotosíntesis.

Cuadro 7. Medias de área foliar (cm²) de leucaena y mucuna (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

EFECTOS SIMPLES							INTERACCIONES DOBLES				
HB***	Media ^z	PTA***	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	210.52 a	MU	276.38 a	60 D	186.99 a	MU60	367.09 a	060D	271.53 a	0LE	101.62 d
10000	203.66 a	LE	38.33 b	120 D	104.57 b	MU120	173.57 b	0120D	137.32 cd	0MU	341.21 ab
25000	101.4 b					LE60	33.77 c	1060D	223.92 ab	10LE	49.40 de
35000	110.36 b					LE120	43.69 c	10120D	180.51 bc	10MU	379.97 a
50000	129.75 b							2560D	114.24 de	25LE	27.96 e
								25120D	88.56 def	25MU	174.85 c
								3560D	145.91 cd	35LE	19.69 e
								35120D	69.74 ef	35MU	213.98 c
								5060D	191.06 bc	50LE	7.52 e
								50120D	48.01 f	50MU	292.74 b

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=Mucuna, LE= Leucaena.

Bramley *et al.* (2014) encontraron que no hubo diferencia significativa a los 60 días entre las diferentes concentraciones de hidrocarburo (0, 1000, 5000, 10 000, 20 000 y 40 000 mg kg⁻¹) en *Poa foliosa*, pero después de los 120 días el área foliar presentó decremento con respecto al testigo en concentraciones de 20 000 y 40 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo. Este comportamiento fue superior a lo que presentó la especie mucuna, que tuvo diferencias significativas a partir de 10 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo. Por su parte, leucaena mostró un comportamiento superior, ya que las diferencias significativas se mostraron hasta la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo.

Se observó que los más altos valores los presenta mucuna, mostrando diferencias significativas en todas las concentraciones de hidrocarburo estudiadas con respecto al testigo. También se notó que ésta misma especie a concentraciones de 25 000, 35 000 y 50 000 mg kg⁻¹ no tuvo diferencias estadísticas significativas. Mientras que leucaena si mostró diferencias significativas a partir de la concentración de 25 000 mg kg⁻¹. En mucuna

nuevamente se reflejó el estrés causado por la falta de drenaje en las macetas y presentó decrementos en todas las concentraciones estudiadas, mientras que leucaena solo presentó defoliación en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ (Figura 17).

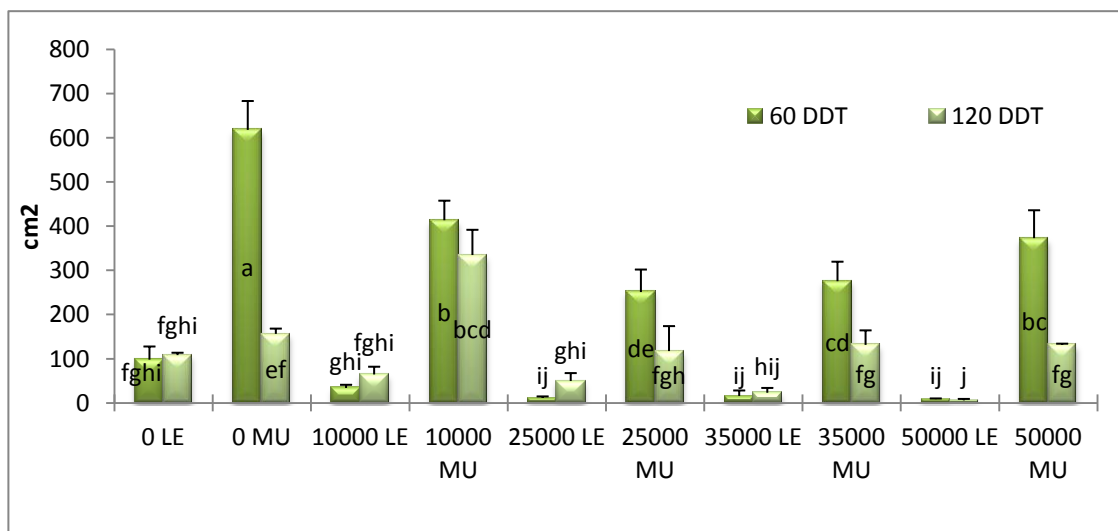


Figura 17. Área foliar (cm²) por las especies *M. pruriens* y *L. leucocephala* a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

2.3. Longitud de raíz

Los resultados obtenidos en la variable longitud de raíz, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.610 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

La longitud de raíz disminuyó significativamente conforme aumentó la concentración de hidrocarburo en suelo, mostrando reducción de casi el 60% en la concentración más alta (50 000 mg kg⁻¹) con respecto al testigo. Las diferencias significativas en la reducción de longitud de raíz se dieron a partir de 25 000 mg kg⁻¹. *Mucuna* tuvo el mayor crecimiento de raíz, y mostró diferencias significativas con respecto a *leucaena*.

En las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT) se observó que a los 60 días, mucuna presentó 42% más desarrollo en comparación con el valor mínimo que fue el de leucaena a los 60 días. La interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) mostró que a los 60 días sin petróleo crudo hubo un 70% más crecimiento comparado con el valor más bajo que fue a los 120 días a 50 000 mg kg⁻¹. En la interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP), el mayor crecimiento se dio en ausencia de hidrocarburo con leucaena, con un 69% más crecimiento de raíz comparado con el tratamiento más bajo, que fue a 50 000 mg kg⁻¹ a los 60 días después de haber establecido el experimento (Cuadro 8).

Cuadro 8. Medias de longitud de raíz de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HB***	Media ^z	PTA***	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	22.56 a	MU	19.05 a	60 D	17.005 a	MU60	21.18 a	060D	23.063 a	0LE	23.82 a
10000	21.32 a	LE	14.179 b	120 D	16.262 a	MU120	16.81 b	0120D	21.88 ab	0MU	21.61 ab
25000	16.95 b					LE60	12.83 c	1060D	20.83 ab	10LE	17.17 bc
35000	13.53 b					LE120	15.68 bc	10120D	21.8 ab	10MU	25.46 a
50000	9.15 c							2560D	17.03 bc	25LE	13.87 cd
								25120D	16.88 bc	25MU	20.025 ab
								3560D	12.94 c	35LE	11.12 de
								35120D	14.14 c	35MU	15.95 bcd
								5060D	11.17 cd	50LE	7.31 e
								50120D	6.83 d	50MU	11.24 de

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=*Mucuna*, LE=*Leucaena*.

Merkl *et al.* (2004) encontraron que la presencia de petróleo crudo en suelo provoca diferencias significativas en el crecimiento de raíz de *B. brizantha*, *P. maximun*, *C. mucunoides*, *C. brasilianum*, *M. orthocarpa*, *M. carporum* y *S. capitata*. Coincidiendo con lo encontrado en la presente investigación, que a concentraciones superiores a los 10 000 mg kg⁻¹, hubo diferencias significativas con respecto al testigo sin hidrocarburo. Esto se debe a que la presencia de

hidrocarburos en suelo, causa que los suelos se conglomeren en terrones compactados con hidrocarburo, lo que crea una fuerte resistencia a la ruptura (Pérez *et al.*, 2006), y limita el crecimiento de las raíces. También causa quemaduras en las zonas de contacto de las raíces por el aumento de temperatura que causa el hidrocarburo.

Al respecto Díaz (2012) demostró que en concentraciones de diesel de 3 000, 5000, 7 500 y 10 000 mg kg⁻¹ se redujeron 65, 63 y 78% la longitud de raíz de *C. equisetifolia* con respecto al testigo. Diferente a lo que se observó en el presente trabajo, donde la reducción de longitud de raíz con respecto al testigo fue menos marcada, ya que solo se redujo en 5.5% a 10 000 mg kg⁻¹. Esto se debe a que como se cita en la literatura, el diesel es más tóxico que el petróleo crudo, por estar compuesto por un mayor número de hidrocarburos aromáticos, condición que también puede estar relacionada con el hecho de que *C. equisetifolia* es más susceptible a los hidrocarburos que mucuna y leucaena.

Comparado con leucaena, mucuna fue la especie que tuvo los valores más altos en longitud de raíz en todas las concentraciones de hidrocarburo evaluadas. De igual manera se observó que al aumentar la concentración de hidrocarburo, el crecimiento de raíz tiende a bajar (Figura 18).

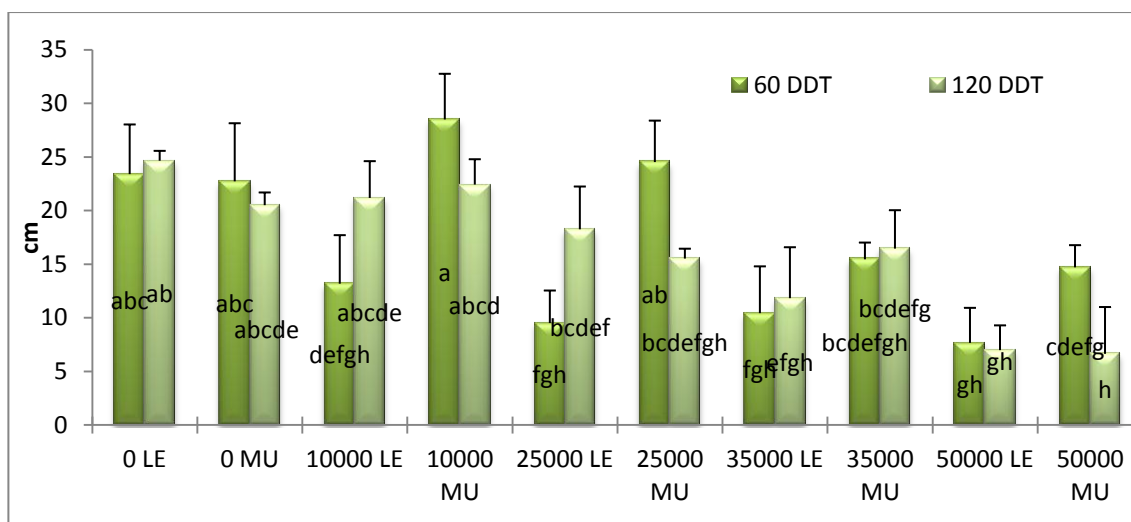


Figura 18. Longitud de raíz de las especies *M. pruriens* y *L. leucephala* a diferentes concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días después de trasplante.

La planta mucuna mostró diferencias significativas con respecto al testigo a partir de los 35 000 mg kg⁻¹, mientras que leucaena tuvo dichas diferencias en concentraciones a partir de 10 000 mg kg⁻¹, lo que mostró que mucuna fue superior en crecimiento de raíz, mostrando una reducción del 35% en la concentración más alta evaluada (50000 mg kg⁻¹) con respecto al testigo, mientras que a esa misma concentración, leucaena redujo el crecimiento de raíz en casi 72% con respecto al testigo.

En la Figura 18 se aprecia que leucaena aumentó su crecimiento de raíz conforme transcurre el tiempo (de 60 a 120 días) en cada una de las concentraciones de petróleo crudo empleadas. En contraste con mucuna que disminuyó el crecimiento de raíz conforme pasó el tiempo, debido a que durante los primeros 60 días la raíz de mucuna, creció vigorosamente, mientras que la de leucaena creció más lento. Al paso del tiempo hubo problema por el uso de macetas sin drenaje, porque el agua se acumuló en el fondo y saturó el suelo, lo que causó que las raíces de mucuna sufrieran asfixia y se pudrieran, mientras que las de leucaena al no haber explorado la zona de saturación, no presentaron este problema.

En relación a esta situación, Njoku *et al.* (2009) afirman que la contaminación por petróleo crudo en el suelo provoca entre otras cosas baja permeabilidad y baja infiltración de agua (Hutchinson *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2004). Estas condiciones pueden provocar la acumulación de agua sobre la superficie del suelo y sequía artificial en la capa subsuperficial. Esto puede relacionarse con la dificultad que tiene las raíces para absorber agua y nutrientes de los suelos contaminados con petróleo crudo. El crecimiento de las raíces de las plantas, ayuda a que se formen poros en la capa subsuperficial del suelo y que de esta manera se pueda aumentar la infiltración del agua en los suelos contaminados con petróleo crudo. También aumenta la aireación del suelo, lo que hace posible que se puedan llevar a cabo procesos bacterianos en presencia de oxígeno, y esto reduce la cantidad de petróleo crudo en el suelo.

2.4. Volumen radicular

Los resultados obtenidos en la variable volumen radicular, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.140 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Se observó que el volumen radicular disminuyó conforme aumentó la concentración de petróleo crudo, y se presentaron diferencias significativas absolutas a partir de la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ con reducción de 45% a 50 000 mg kg⁻¹ con respecto al testigo. Mucuna presentó el mayor volumen radicular. En el tiempo de muestreo, se mostró que contrario a lo que se debía presentar, el volumen radicular disminuyó en casi un 50% a los 120 con respecto a los 60 días después de haber establecido el experimento. Esto se debió a que las raíces de mucuna estuvieron expuestas a condiciones de saturación de agua.

En la interacción especie de planta*tiempo de muestreo, se observó que el valor más alto se tuvo con mucuna a los 60 días, superior en un 89% con respecto a leucaena a los 60 días (menor valor). En la interacción concentración de

petróleo crudo*tiempo de muestreo, la mayor acumulación de volumen radicular, se dio en suelo sin hidrocarburo a los 60 días, 78% superior al tratamiento con 50 000 mg kg⁻¹ a los 120 días. En la interacción concentración de petróleo crudo*planta, el valor más alto de volumen radicular se presentó a 10 000 mg kg⁻¹ con mucuna, siendo superior que leucaena a 50 000 mg kg⁻¹ en 94%. En la interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta, se mostró que el valor más bajo estuvo a 50 000 mg kg⁻¹ con leucaena, mientras que el valor más alto estuvo en 10 000 mg kg⁻¹ con mucuna (Cuadro 9).

Cuadro 9. Medias de volumen radicular de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT), interacción concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HB ^{***}	Media ^z	PTA ^{***}	Media ^z	TPO ^{***}	Media ^z	IPT ^{***}	Media ^z	IHT ^{***}	Media ^z	IHP ^{***}	Media ^z
0	6.84 a	MU	8.57 a	60 D	6.60 a	MU60	12.39 a	060D	7.97 a	0LE	3.6 c
10000	6.15 ab	LE	1.64 b	120 D	3.47 b	MU120	4.93 b	0120D	5.02 de	0MU	9.61 a
25000	5.10 b					LE60	1.38 c	1060D	7.3 ab	10LE	2.53 cd
35000	3.82 c					LE120	1.92 c	10120D	5.15 cde	10MU	10.3 a
50000	3.8 c							2560D	6.92 abc	25LE	1.024de
								25120D	3.44 ef	25MU	9.69 a
								3560D	5.07 cde	35LE	0.99 de
								35120D	2.568 f	35MU	6.73 b
								5060D	5.84 bcd	50LE	0.61 e
								50120D	1.76 f	50MU	6.99 b

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=*Mucuna*, LE=*Leucaena*.

Los resultados obtenidos son muy parecidos a los que se muestran en el apartado anterior. Se observó que mucuna tuvo el mejor comportamiento en volumen radicular, a pesar de que tuvo el problema derivado de la saturación del suelo con el agua de riego. En el Cuadro 9, se presentan valores más altos en el volumen radicular a los 60 días, debido a la influencia de mucuna sobre esta variable, sin embargo leucaena aumentó a los 120 días.

Al respecto Peng *et al.* (2009) encontraron que el volumen radicular se redujo significativamente conforme aumentó la concentración de petróleo crudo en suelo (hasta 5 000 mg kg⁻¹) evaluado en especies ornamentales (*Dianthus chinensis*, *Rudbeckia hybrida*, *Coriopsis grandiflora*, *Lavatera arborea*, *Orychophragmus violaceus* y *Portulaca oleracea*). Dichos resultados son similares a los de la presente investigación, donde se encontró que la concentración de petróleo crudo reduce significativamente la variable evaluada. Sin embargo, esta reducción fue significativa a concentraciones superiores a 10 000 mg kg⁻¹, lo que demostró que mucuna y leucaena tienen mejores atributos para adaptarse a la presencia de hidrocarburo en el suelo, superior que *D. chinensis*, *R. hybrida*, *C. grandiflora*, *L. arborea*, *O. violaceus* y *P. oleracea*. Esto se debe a que las raíces en presencia de hidrocarburo, suelen sufrir alteraciones en su desarrollo, que involucra la quemadura de las mismas debido al aumento de la temperatura del suelo en el que se desarrollan, y a la dificultad para penetrar en los terrones compactados por la presencia del petróleo (Pérez *et al.*, 2006).

Se observa en la Figura 19 que la presencia de petróleo crudo en el suelo, disminuyó el volumen radicular en las dos especies evaluadas, se observó que para leucaena no hay diferencias significativas en la reducción a los 10 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, mientras que en mucuna las diferencias se presentan a partir de 35 000 mg kg⁻¹. Lo anterior indica que mucuna tiene el mejor comportamiento, debido sobre todo a que la especie que tiene un crecimiento más rápido y agresivo que leucaena, que al ser una especie arbustiva, leñosa y perenne tiene un crecimiento más lento.

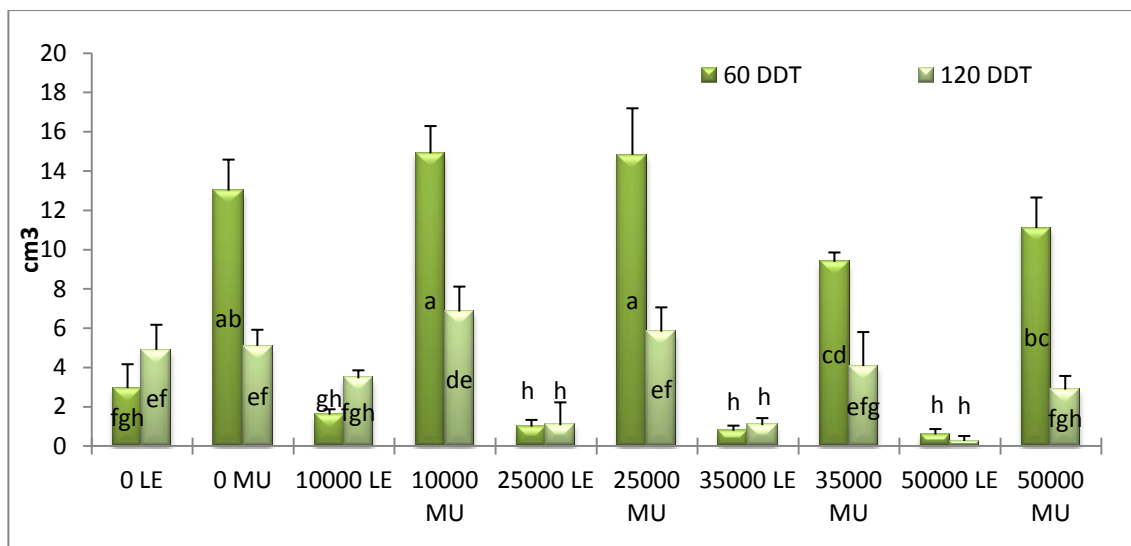


Figura 19. Volumen radicular (cm³) expresado por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

2.5. Nodulación

Los nódulos rizosféricos, son las estructuras en las cuales se encuentran las bacterias fijadoras de nitrógeno del género *Rhizobium* para poder llevar a cabo la fijación de dicho nutrimento.

En la presente investigación, se observó que a los 60 días mucuna solo presentó nódulos hasta la concentración de 10 000 mg kg⁻¹, pero no presentó a concentraciones superiores. Por su parte, leucaena presentó nódulos en todas las concentraciones de petróleo crudo evaluadas. En el segundo muestreo, se observó que la presencia de nódulos en mucuna ocurrió hasta la concentración de 35 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo, mientras leucaena presentó nuevamente nódulos en todas las concentraciones de hidrocarburo probadas (Cuadro 10).

Cuadro 10. Presencia (P) o ausencia (A) de nódulos rizosféricos en diferentes concentraciones de petróleo crudo (HIDRO) con las plantas *Mucuna* y *Leucaena* (PTA) a los tiempos de muestreo (TPO) 60 y 120 días.

HIDRO	PTA	TPO	NODULOS	HIDRO	PTA	TPO	NODULOS
0	MU	60	P	0	MU	120	P
10000	MU	60	P	10000	MU	120	P
25000	MU	60	A	25000	MU	120	P
35000	MU	60	A	35000	MU	120	A
50000	MU	60	A	50000	MU	120	A
0	LE	60	P	0	LE	120	P
10000	LE	60	P	10000	LE	120	P
25000	LE	60	P	25000	LE	120	P
35000	LE	60	P	35000	LE	120	P
50000	LE	60	P	50000	LE	120	P

Al respecto Rivera *et al.* (2005), encontraron que la nodulación fue la variable más afectada por el petróleo crudo para cuatro leguminosas tras la exposición durante 120 y 150 días después de siembra. Los índices relativos de fitotoxicidad de chipilín silvestre, dormilona y zarza fueron mayores en los tres suelos más contaminados con petróleo nuevo (50 000, 100 000 y 1500 00 mg·kg⁻¹ HTP), mientras que en el suelo con petróleo intemperizado (79 457mg·kg⁻¹ HTP), la nodulación fue completamente inhibida. Estos resultados son acordes a lo observado en la presente investigación por parte de leucaena, ya que hasta la concentración más alta de hidrocarburo evaluada (50 000 mg kg⁻¹), hubo presencia de nodulación a los 120 días de exposición al contaminante, mientras que mucuna no logró formar nódulos en concentraciones de 35 000 y 50 000 mg kg⁻¹. Esto sugiere que mucuna puede ser utilizada para indicar presencia de hidrocarburos en concentraciones superiores a los 35 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, ya que la formación de nódulos puede ser un indicador confiable utilizado en la evaluación ecotoxicológica de suelos contaminados (Rivera *et al.*, 2005).

Lo anterior refleja que leucaena es menos susceptible a la presencia de petróleo crudo a los 60 días, mientras que a los 120 días tiene el mismo

comportamiento que mucuna, probablemente debido a que la reducción del hidrocarburo en suelo al segundo muestreo permitió la formación de nódulos.

2.6. Biomasa aérea

Los resultados obtenidos en la variable biomasa aérea, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.190 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Se observó una tendencia a disminuir la biomasa aérea conforme se aumentó la concentración de petróleo crudo (Cuadro11). Se encontró un decremento del 60% a 35 000 mg kg⁻¹ con respecto al testigo, aunque no existió diferencia estadística significativa con la de 50 000 mg kg⁻¹. También se observó que mucuna produjo (1.26 g) más de cuatro veces lo que produjo leucaena (0.29 g). El tiempo de muestreo en el que se produjo la mayor cantidad de biomasa fue a los 120 días fue 2.3 veces superior a lo que se produjo a los 60 días.

En la interacción especie de planta*tiempo de muestreo, se observó que el mayor valor (1.76 g) lo presentó mucuna a los 120 días y el valor más bajo (0.145) lo mostró leucaena a los 60 días. En la interacción concentración de petróleo crudo*tiempo de muestreo, el valor más alto (2.10 g) fue en ausencia de petróleo crudo a los 120 días de muestreo, mientras que los valores más bajos (0.3 y 0.36 g) se presentaron en las concentraciones de 35 000 y 50 000 mg kg⁻¹ a los 60 días, lo que mostró disminución del 86% con respecto al testigo a los 120 días. En la interacción concentración de petróleo crudo*especie de planta, el valor más alto de biomasa aérea (1.71 g) se dio con mucuna a 10 000 mg kg⁻¹, mientras que la menor acumulación de biomasa aérea (0.14 g) se dio en la concentración de 35 000 mg kg⁻¹ con leucaena que mostró una disminución del 92% con respecto al valor más alto registrado.

Cuadro 11. Medias de biomasa aérea (g) de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

HB ^{***}	EFECTOS SIMPLES					INTERACCIONES DOBLES					
	Media ^z	PTA ^{***}	Media ^z	TPO ^{***}	Media ^z	IPT ^{***}	Media ^z	IHT ^{***}	Media ^z	IHP ^{***}	Media ^z
0	1.21 a	MU	1.26 a	60 D	0.465 b	MU60	0.821 b	060D	0.651 c	0LE	0.748 d
10000	1.03 b	LE	0.29 b	120 D	1.07 a	MU120	1.76 a	0120D	2.10 a	0MU	1.60 a
25000	0.57 c					LE60	0.145 d	1060D	0.616 c	10LE	0.442 e
35000	0.48 d					LE120	0.454 c	10120D	1.40 b	10MU	1.71 a
50000	0.51 cd							2560D	0.403 d	25LE	0.171 f
								25120D	0.73 c	25MU	1.09 b
								3560D	0.300 d	35LE	0.14 f
								35120D	0.713 c	35MU	0.93 c
								5060D	0.365 d	50LE	0.687 f
								50120D	0.654 c	50MU	0.95 c

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

Zavala *et al.* (2005) observaron que a concentraciones inferiores a los 15 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo en suelo se nota un efecto positivo en la adaptación de los pastos Alemán y Egipto: ambas especies mostraron adaptación a los suelos con moderada concentración de petróleo crudo incrementando la cantidad de biomasa de 3.74 a 5.86 g en pasto Egipto (sin hidrocarburo y con concentración moderada respectivamente) y de 0.83 a 2.33 g en pasto Alemán., Este comportamiento es parecido al observado en las especies mucuna y leucaena, ya que ambas especies no presentan diferencias significativas en la concentración de 10 000 mg kg⁻¹ con respecto a tratamiento sin hidrocarburo. El comportamiento anterior muestra que las especies tienen un buen desempeño para adaptarse a concentraciones de petróleo crudo moderadas, situándolas al mismo nivel que las gramíneas. Resultado superior a lo que reportaron Meng *et al.* (2011), quienes encontraron al trébol blanco (leguminosa) por debajo de ray gras y apio, que por cuestiones adaptativas, se conoce que raygras presenta mayores aptitudes ante la presencia de hidrocarburo en suelo.

Al respecto, Sanchez *et al.* (2004) encontraron que la mayor producción de biomasa vegetal ocurrió en el testigo, lo que mostró que la presencia de hidrocarburo disminuía la cantidad de biomasa formada durante el periodo del experimento, comportamiento similar a lo encontrado en la presente investigación a concentraciones menores a 25 000 mg kg⁻¹.

Se notó que mucuna fue la especie que concentró mayor cantidad de biomasa aérea en todas las concentraciones de petróleo crudo y en los dos tiempos de muestreo, presentando diferencias significativas desde los 10 000 mg kg⁻¹. De igual manera, leucaena mostró el mismo comportamiento, pero fue inferior a mucuna (Figura 20).

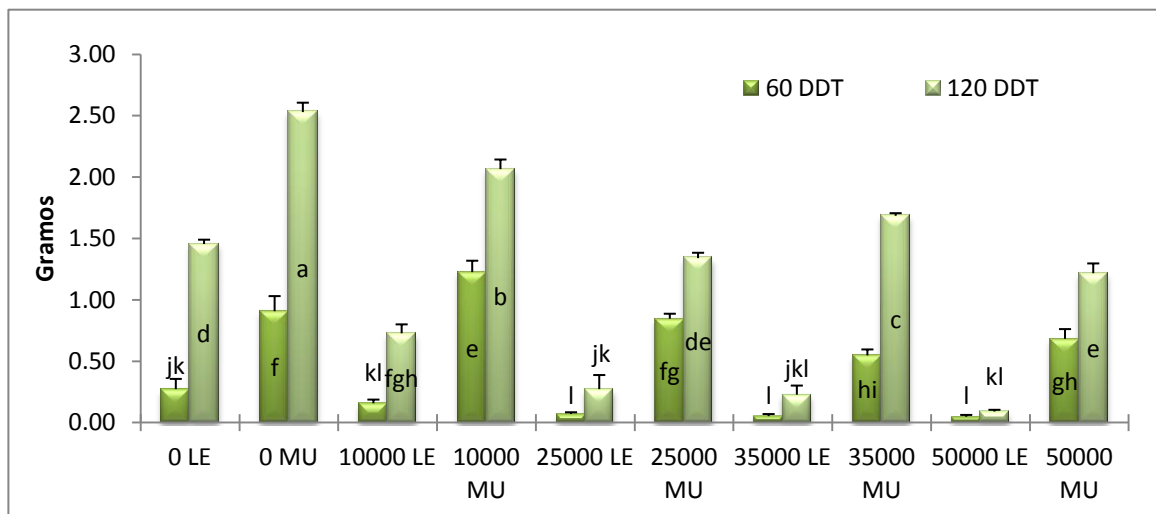


Figura 20. Biomasa seca de parte aérea (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

2.7. Biomasa de raíz

Los resultados obtenidos en la variable biomasa de raíz, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.184 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados mostraron que al aumentar la concentración de petróleo crudo en suelo, disminuyó la biomasa de raíz. A 50 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, el

peso seco de la raíz se redujo 73% con respecto al testigo. De igual manera los resultados mostraron diferencias significativas entre la especie de planta utilizada: mucuna tuvo la mayor acumulación de biomasa de raíz, superior 3.5 veces a leucaena. El tiempo al que se presentó el valor más alto de biomasa de raíz fue a los 60 días (0.85 g), mostrando diferencias significativas con los 120 días (0.55 g).

En la interacción especie de planta*tiempo de muestreo se observó que el valor más alto lo tuvo mucuna a los 60 días (1.47 g), mientras que el más bajo lo tuvo leucaena a los 60 días (0.23 g), valor casi seis veces inferior con respecto al más alto. En la interacción concentración de petróleo crudo*tiempo de muestreo, el valor más alto lo tuvo el tratamiento en ausencia de hidrocarburo a los 60 días (1.56 g), casi siete veces superior al tratamiento con menor acumulación de biomasa de raíz que se presentó en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo a los 120 días (0.23 g). La interacción concentración de petróleo crudo*planta mostró el valor más alto en ausencia de hidrocarburo en suelo con mucuna, (1.67 g), mientras que el valor más bajo fue a 50 000 mg kg⁻¹ con de leucaena (0.07 g) con reducción en la biomasa de raíz de casi 24 veces con respecto al valor más alto (Cuadro 12).

Al respecto Zavala *et al.* (2005) encontraron que a concentraciones inferiores a los 15 000 mg kg⁻¹ de petróleo en suelo, hubo efecto positivo en la adaptación de los pastos Alemán y Egipto, incrementando la cantidad de biomasa de 0.83 a 2.23 g en pasto Egipto (sin hidrocarburo y a 15 000 mg kg⁻¹ respectivamente) y de 30.13 a 5.86 g en pasto Alemán. Estos resultados difieren a los de la presente investigación, ya que a partir de la concentración de hidrocarburo más baja (10 000 mg kg⁻¹) se observaron diferencias significativas en las dos especies evaluadas. Lo anterior puede atribuirse a que las especies de leguminosas generalmente tienen mayor sensibilidad a la presencia de hidrocarburo en suelo (Rivera *et al.*, 2005).

Cuadro 12. Medias de biomasa de raíz (g) de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HB***	Media ^z	PTA***	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	1.34 a	MU	1.08 a	60 D	0.849 a	MU60	1.472 a	060D	1.564 a	0LE	0.898 c
10000	0.882 b	LE	0.31 b	120 D	0.549 b	MU120	0.710 b	0120D	1.042 b	0MU	1.6715 a
25000	0.487 c					LE60	0.259 c	1060D	0.926 b	10LE	0.468 d
35000	0.491 c					LE120	0.373 c	10120D	0.838 bc	10MU	1.296 b
50000	0.368 c							2560D	0.551 de	25LE	0.169 e
								25120D	0.422 def	25MU	0.805 c
								3560D	0.643 cd	35LE	0.108 e
								35120D	0.339 ef	35MU	0.874 c
								5060D	0.524 de	50LE	0.07 e
								50120D	0.231 f	50MU	0.709 c

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=*Mucuna*, LE=*Leucaena*.

Se observa en la Figura 21 que conforme aumenta el tiempo de cultivo, incrementa la biomasa de raíz en todas las concentraciones de hidrocarburo estudiadas en *leucaena*, mientras que para *mucuna* se presentó el caso contrario, ya que conforme se pasó de los 60 a los 120 días, se redujo la cantidad de biomasa de raíz. Esto se debió a que la raíz de la planta de *mucuna* estuvo expuesta a condiciones de saturación en suelo, lo que provocó hipoxia de raíz y su posterior muerte.

Con respecto al tiempo de exposición de la planta al hidrocarburo Huang *et al.* (2003) reportaron que de los 90 a 120 días es cuando se recomienda fitorremediación, ya que es cuando las raíces de *Festuca arundinacia* acumula la suficiente biomasa en la raíz para poderla llevar a cabo. Los resultados obtenidos sobre las especies estudiadas en la presente investigación mostraron que para *leucaena* el aumento en la biomasa de raíz no fue significativo al pasar de 60 a 120 días, lo que sugiere que la fitorremediación se recomienda hasta los 60 días, sin poder sugerir lo mismo de *mucuna*, ya que el

comportamiento estuvo afectado por condiciones ambientales adversas al desarrollo de raíz.

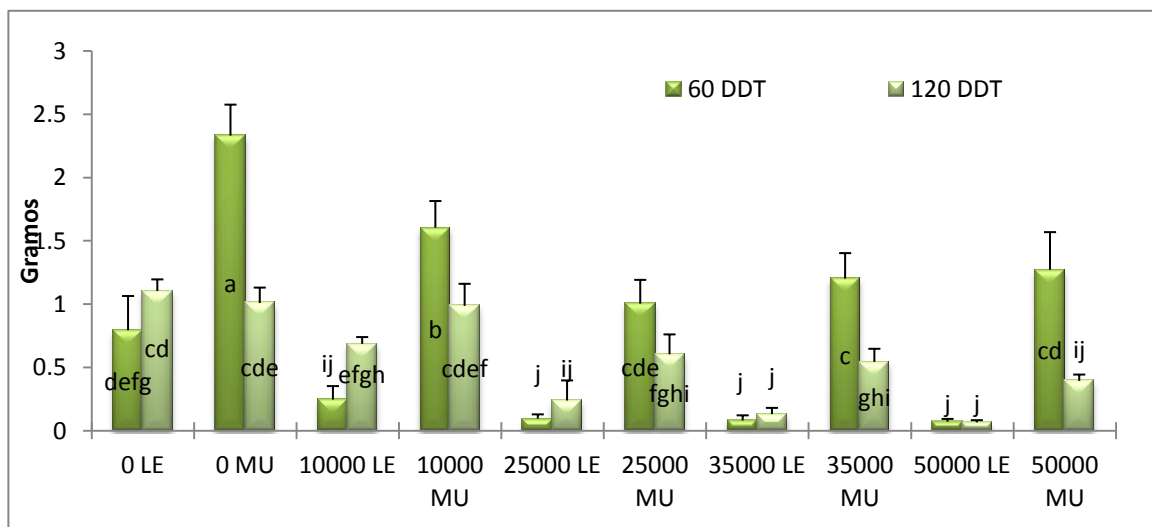


Figura 21. Biomasa de raíz (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

2.8. Biomasa total

Los resultados obtenidos en la variable biomasa total, presentan homogeneidad de varianza, y valor de 0.113 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los datos obtenidos muestran que al aumentar la concentración de petróleo crudo en el suelo, disminuye la biomasa total de las especies, con esto se muestra un decremento del 66% en la concentración más alta con respecto al testigo sin hidrocarburo. Para el factor planta, se observó que mucuna obtuvo un valor superior (2.35 g) casi cuatro veces que leucaena (0.595). En el tiempo de muestreo, se observó que la mejor biomasa total fue para mucuna a los 120 días (1.66 g) y mostró diferencias significativas con la biomasa total a los 60 días (1.34 g).

En la interacción especie de planta*tiempo de muestreo el valor superior lo expresó mucuna a los 120 días (2.42 g), seis veces superior que el menor valor

con la especie *leucaena* (0.39 g) a los 60 días. En la interacción concentración de petróleo crudo*tiempo de muestreo se observó que el valor más alto estuvo en ausencia de petróleo crudo a los 120 días (3.25 g), mientras que el valor más bajo fue en 50 000 mg kg⁻¹ a los 120 días (0.765 g) con *leucaena*. En la interacción concentración de petróleo crudo*especie de planta el valor más alto (3.45 g) estuvo en ausencia de hidrocarburo para *mucuna*, y fue 26 veces superior con respecto al valor más bajo (0.13 g), mostrado a 50 000 mg kg⁻¹ a los 60 días de establecido el experimento (Cuadro 13).

Cuadro 13. Medias de biomasa total de *Leucaena* y *Mucuna* (PTA) a diferentes concentraciones de petróleo crudo (HB), tiempo de muestreo (TPO), y las interacciones especie de planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción concentración de hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) y concentración de hidrocarburo*especie de planta (IHP).

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HB ^{***}	Media ^z	PTA ^{***}	Media ^z	TPO ^{***}	Media ^z	IPT ^{***}	Media ^z	IHT ^{***}	Media ^z	IHP ^{***}	Media ^z
0	2.64 a	MU	2.35 a	60 D	1.34 b	MU60	2.30 a	060D	2.19 b	0LE	1.56 b
10000	1.96 b	LE	0.595 b	120 D	1.66 a	MU120	2.41 a	0120D	3.25 a	0MU	3.45 a
25000	1.13 c					LE60	0.39 c	1060D	1.57 c	10LE	0.93 c
35000	0.987 c					LE120	0.829 b	10120D	2.36 b	10MU	2.99 a
50000	0.901 c							2560D	0.973 de	25LE	0.371 d
								25120D	1.292 cd	25MU	1.89 b
								3560D	0.94 de	35LE	0.22 d
								35120D	1.03 de	35MU	1.75 b
								5060D	1.04 de	50LE	0.131 d
								50120D	0.765 e	50MU	1.67 b

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. MU=*Mucuna*, LE=*Leucaena*.

Al respecto Zavala *et al.* (2005) encontraron que a concentraciones inferiores a los 15 000 mg kg⁻¹ de petróleo en suelo se nota un efecto positivo en la adaptación de los pastos Alemán y Egipto, mostrando adaptación a los suelos con moderada concentración de hidrocarburo. Mientras que se incrementó la cantidad de biomasa en pasto Humidícola de 1.34 g (sin hidrocarburo) a 2.38 g en concentración moderada de hidrocarburo (15 000 mg kg⁻¹), mientras que en pasto Alemán fue de 4.76 g a 7.93 g, y en pasto Egipto de 1.43 g a 4.38 g. Los

resultados anteriores fueron similares a la presente investigación; en la Figura 22 se observa que a 10 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, no presentaron diferencias significativas en ninguna de las dos especies estudiadas, por lo que se puede decir que a concentraciones bajas de hidrocarburo en suelo éstas dos especies se adaptan a la presencia de hidrocarburo en cuanto a la cantidad de biomasa total formada.

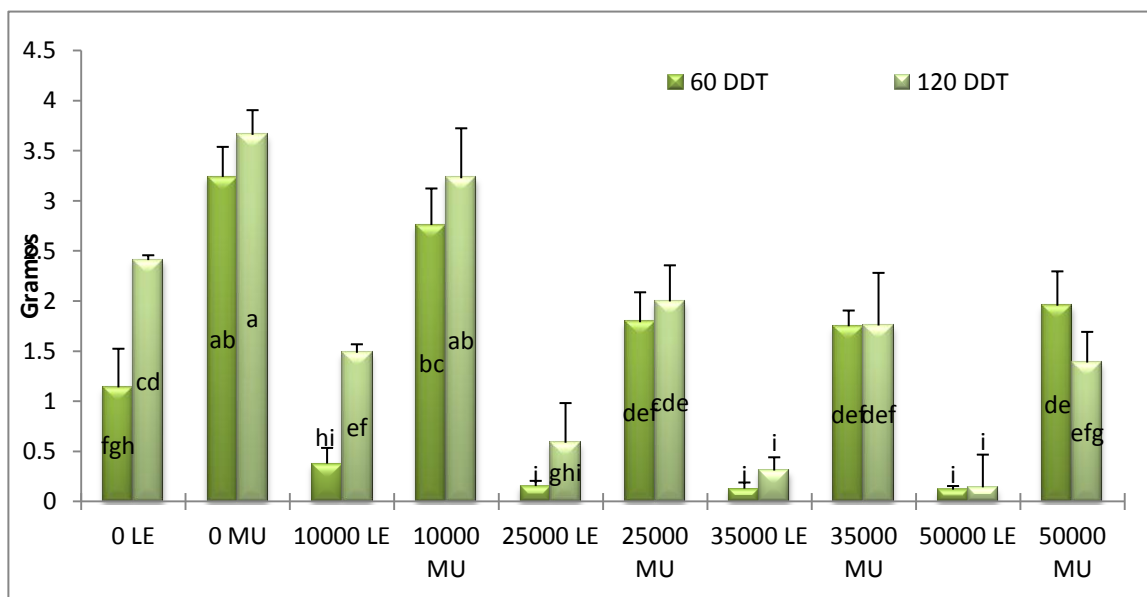


Figura 22. Biomasa total (g) por las especies mucuna y leucaena a distintas concentraciones de petróleo crudo a los 60 y 120 días.

Sánchez *et al.* (2004) mostraron que la mayor cantidad de materia seca en pasto Alemán (*Echinochloa polystachya*) se presentó en el tratamiento testigo, mientras que se redujo en 51% en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ y 53% en concentración de 10 000 mg kg⁻¹. Para el caso de mucuna se observa que la reducción de materia seca fue de 62% en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ con respecto al testigo, mientras que para leucaena fue de 53%, lo que nos hace ver que esta última se comporta de forma muy similar a lo que tiene el pasto Alemán en biomasa total acumulada.

Peng *et al.* (2009) encontraron que *Mirabilis jalapa*, no mostró reducción significativa en la biomasa con respecto al testigo a concentraciones de 5 000

mg kg⁻¹ de hidrocarburo, mientras que las especies *Dianthus chinesnsis*, *Rudbeckia hibrida*, *Coreopsis grandifolia*, *Lavatera arborea*, *Orychophiagmus violácea* y *Portulaca grandiflora* presentaron diferencias significativas cuando la concentración de hidrocarburo fue superior a 5 000 mg kg⁻¹. Este resultado fue diferente a lo que se obtuvo en la presente investigación, ya que en la presente se observan reducciones significativas a partir de la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, lo que indica que las especies mucuna y leucaena presentan aptitudes de adaptación a la presencia de petróleo crudo superior a lo que expresaron las especies evaluadas por Peng *et al.* (2009).

Merkl *et al.* (2004) encontraron que la presencia de hidrocarburo en suelo causaron una reducción significativa en la biomasa total de las leguminosas *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Mimosa orthocarpa*, *M. camporum*, *Estylosanthes capitata* y *Desmonium glabrum*. *Calopogonium mucunoides* presentó la producción más alta de biomasa total, con una reducción de solo el 19% en una concentración de 30 000 kg⁻¹ (2.9 g) y de 27% en una concentración de 50 000 mg kg⁻¹ (2.7 g), con respecto al testigo (3.8 g), a concentraciones de hidrocarburo de 30 000 y 50 000 mg kg⁻¹ respectivamente. Resultados similares a estos fueron reportados en la presente investigación, ya que como se muestra en la Figura 22, la biomasa total presenta reducciones significativas conforme aumenta la concentración de petróleo crudo en el suelo.

Díaz (2012), mostró que la biomasa total de *Casuarina equisetifolia* se redujo 72% en concentración de diesel de 1 000, 76% en 1 500, 71% en 5 000, 77% en 7 500 y 83% en 10 000 mg kg⁻¹, información que mostró que las especies estudiadas en presencia de petróleo crudo son superiores que *C. equisetifolia*, ya que a concentraciones de 10 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo, se observó una reducción de 12% para mucuna y de 38% para leucaena. Esto muy probablemente se deba a que el diesel por tener mayor cantidad de

hidrocarburos aromáticos es más tóxico que el petróleo crudo (Hemalatha and Veeramanikandan, 2011).

3. SUELO

3.1. Caracterización del suelo agroforestal empleado en la investigación.

El suelo empleado tuvo una textura arcillosa con estructura en bloques, su pH (7.58) está clasificado como medianamente alcalino, poco salino (conductividad eléctrica de 2.71 dS m^{-1}), medio en materia orgánica (3.20 %), muy bajo en nitrógeno inorgánico (8.75 mg kg^{-1}), medio en fósforo (7.87 mg kg^{-1}), alto contenido de potasio ($294.25 \text{ mg kg}^{-1}$), y con alta fertilidad por la CIC reportada ($25.73 \text{ cmol(+) kg}^{-1}$). Según la NOM-021-RECNAT-2000.

Con respecto a las características presentadas del suelo, la que tiene la mayor influencia sobre el comportamiento de los hidrocarburos en suelo es la arcilla (63%), que se encuentra en altas cantidades en el suelo estudiado. Ortíz *et al.* (2003) mencionan que el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta cuanto más pequeñas son las partículas, debido a que aportan un área superficial mayor para la adsorción de los productos químicos. Cuestión que hace suponer que el suelo empleado tiene una alta tendencia a retener los hidrocarburos.

3.2. Potencial de hidrógeno (pH)

Los resultados obtenidos para la variable pH, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.325 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados estadísticos obtenidos para la variable pH del suelo, muestran que en el factor hidrocarburo, el tratamiento con más alto valor (7.95) fue a $25\,000 \text{ mg kg}^{-1}$, mientras que el tratamiento que no se adicionó hidrocarburo, tuvo

el valor más bajo mostrado (7.83) de pH. En el factor planta se observó que el tratamiento sin planta fue el que presentó el valor más bajo de pH (7.84), mientras que en los tratamientos con presencia de planta aumentó hasta 7.93 para la especie leucaena. Con respecto al factor tiempo la variable aumenta de 7.86 (a los 60 días) a 7.94 (a los 120 días).

En la interacción planta*tiempo de muestreo se observó el valor más alto de pH (7.97) fue con leucaena a los 120 días y el menor valor (7.77) fue en ausencia de especie vegetal a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, se observó que el valor más alto de pH fue a 25 000 mg kg⁻¹ a los 120 días (8.02) y el menor valor se presentó a la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ a los 60 días (7.85). Por último la interacción doble de los factores hidrocarburo*planta el valor más alto estuvo en la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ con leucaena, y el valor más bajo se observó en la concentración de 10 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo con leucaena (Cuadro 14).

Cuadro 14. Efectos de petróleo crudo mg kg⁻¹ de suelo (HB), especie vegetal (PTA), tiempo de muestreo (TPO), interacción planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) e interacción hidrocarburo*planta (IHP) para la variable pH.

EFECTOS SIMPLES							INTERACCIONES DOBLES					
HB ^{***}	Media ^z	PTA ^{***}	Media ^z	TPO ^{***}	Media ^z	IPT ^{***}	Media ^z	IHT ^{***}	Media ^z	IHP ^{***}	Media ^z	
0	7.83 c	S/P	7.84 b	60 D	7.86 b	S/P60	7.78 c	060D	7.79 c	0LE	7.98 ab	
10000	7.90 b	MU	7.92 a	120 D	7.94 a	S/P120	7.91 b	0120D	7.87 c	0MU	7.96 abc	
25000	7.95 a	LE	7.94 a			MU60	7.90 b	1060D	7.88 c	0S/P	7.58 e	
35000	7.94 a					MU120	7.94 ab	10120D	7.91 bc	10LE	7.87 d	
50000	7.89 b					LE60	7.91 b	2560D	7.88 c	10MU	7.93 bcd	
						LE120	7.97 a	25120D	8.02 a	10S/P	7.89 cd	
								3560D	7.92 bc	25LE	8.03 a	
								35120D	7.96 ab	25MU	7.93 bcd	
								50120D	7.91 bc	35LE	7.95 bcd	
										35MU	7.94 bcd	
										35S/P	7.93 bcd	
										50LE	7.88 cd	
										50MU	7.86 d	
										50S/P	7.92 bcd	

*, **, ***=p≤0.05,0.01,0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

De acuerdo a los resultados presentados en el Cuadro 14, se sabe que la existencia o introducción de hidrocarburos en el suelo genera cambios significativos en el pH del suelo. Los suelos con hidrocarburos, tienden a la acidez, lo que se explica por la presencia de azufre en los hidrocarburos incorporados al suelo. Sin embargo, en la presente investigación se encontró la condición contraria, ya que el pH tendió a aumentar conforme aumentaba la concentración de hidrocarburo.

Es importante señalar que el suelo que se utilizó en el presente trabajo, tuvo un pH inicial de 7.58, valor menor a todos los tratamientos en los que se evaluó dicha variable al final del experimento, es decir, que el suelo inicialmente tenía un pH medianamente alcalino (NOM-021-RECNAT, 2000), no ácido, como se supone en los suelos que presentan hidrocarburo.

En el Cuadro 14, se observa que el valor final para ésta variable fue de 7.83 en el suelo al que no se le incorporó petróleo crudo. Así que el incremento al valor del pH se debe al agua utilizada para el riego de las plantas, ya que incorporó sales al suelo y esto hizo que el pH aumentara conforme pasaba el tiempo. Lo anterior generó diferencias significativa entre el primer y segundo muestreo (60 y 120 días), debido a que el tiempo de exposición al agua de riego fue mayor conforme se pasó de uno a otro tiempo de muestreo. También se observó que la presencia de planta en suelo contaminado causa un cambio significativo en la disminución del pH.

Resultados similares a los presentados en esta investigación, fueron reportados por Njoku *et al.* (2009), quienes encontraron que la presencia de petróleo crudo en suelo hace que se incremente el pH de los suelos presentando aumento de 5.0 a 5.97 en tratamiento sin hidrocarburo y 75,000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo respectivamente, y que la presencia de *Glicine max* en suelo con petróleo crudo lo hizo más alcalino. Es importante resaltar que la especie *G. max* es una leguminosa, y por lo tanto comparte similitudes con las especies en cuestión,

siendo similar a la fisiología de la especie mucuna, por ser de crecimiento anual y consistencia herbácea. Por otra parte, y contrario a lo registrado en la presente investigación, Ortínez *et al.*, 2003, mencionan que la presencia de hidrocarburos en suelo causa disminución del pH debido a la acumulación del carbono orgánico, y a la acumulación de ácidos grasos orgánicos.

En la triple interacción, la Figura 23 se muestra a) el comportamiento del factor especie vegetal a los 60 días, y en el inciso b) el comportamiento del factor especie vegetal a los 120 días.

Trujillo *et al.* (2012) mostraron que en el suelo testigo el pH es neutro y en el restaurado (de suelo contaminado con petróleo crudo) es medianamente alcalino. Comportamiento que se observó en la presente investigación, dónde el pH tendió a aumentar conforme se trató al suelo con presencia de planta.

Aunque los cambios en la variable utilizada son pequeños (por tratarse de una escala logarítmica), se presentan diferencias significativas entre los 30 tratamientos evaluados, que el pH menor lo presenta el tratamiento al que no se le adicionó hidrocarburo, en los dos tiempos de muestreo. En los tratamientos en que se adicionó hidrocarburo el pH aumentó con respecto al valor del testigo (7.58), presentando su valor máximo a la concentración de 25 000 mg kg⁻¹ con leucaena en los dos tiempos de muestreo.

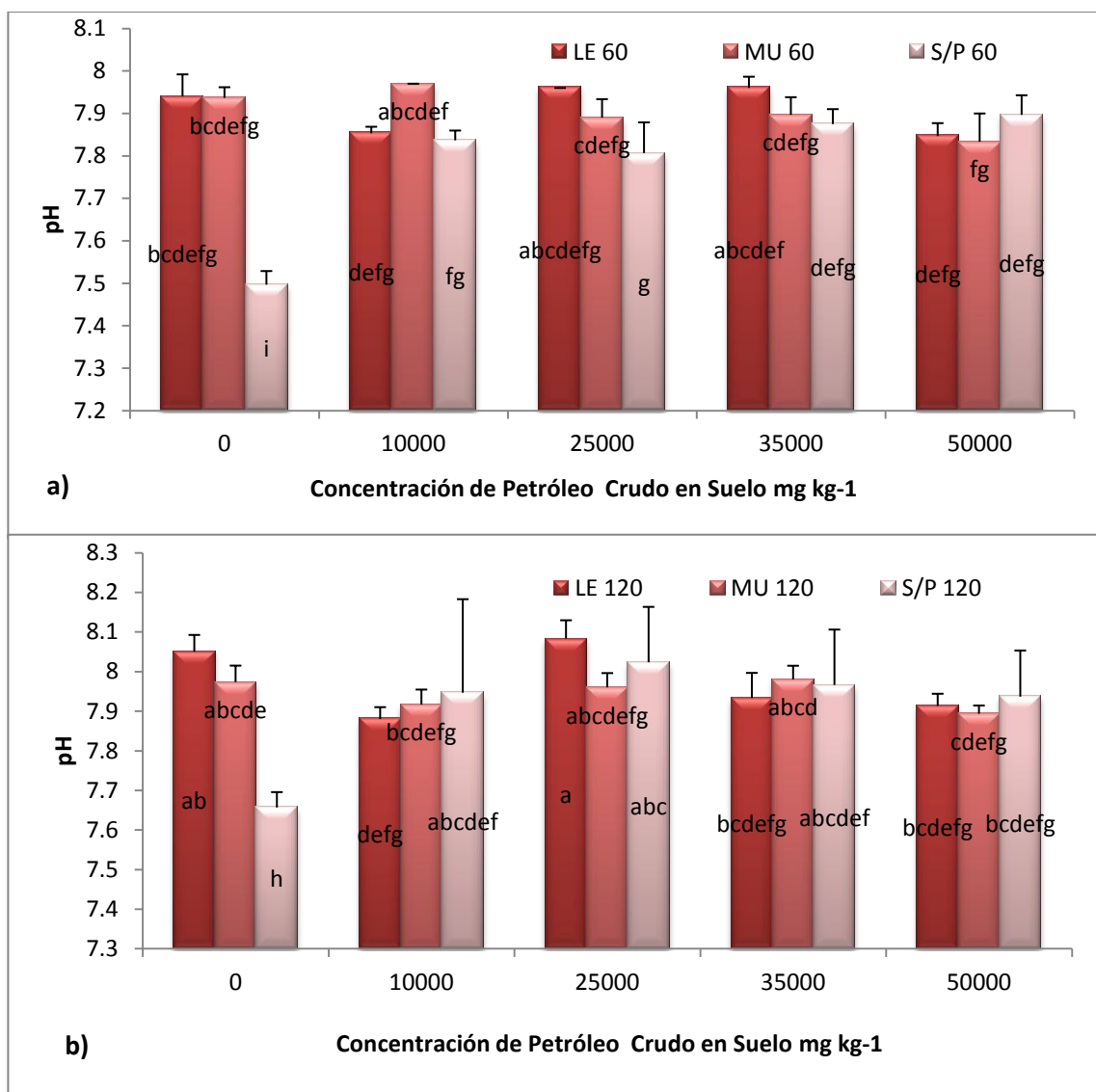


Figura 23. . Comportamiento del pH a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

3.3. Conductividad eléctrica (CE)

Los resultados obtenidos para conductividad eléctrica, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.256 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados obtenidos revelaron que conforme aumentó la concentración de petróleo crudo en suelo, la CE disminuyó hasta un 11% con respecto al testigo

sin hidrocarburo. La presencia de planta disminuyó significativamente la variable en cuestión, en un 11.5% para mucuna y 11% en leucaena. No hubo variación en el tiempo al pasar de 60 a 120 días.

En la interacción planta*tiempo de muestreo, se observó que el valor más alto estuvo en ausencia de planta a los 60 días, siendo 21% superior al valor más bajo, que se presentó a los 60 días con leucaena. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo el valor más alto se presentó en ausencia de petróleo crudo a los 60 días, mientras que el más bajo fue a concentración de 35 000 mg kg⁻¹ con leucaena. En la interacción hidrocarburo*planta, se observó que el valor superior fue en ausencia de hidrocarburo y planta, mientras que el menor valor estuvo en ausencia de hidrocarburo con leucaena (Cuadro 15).

Cuadro 15. Efectos de concentración de petróleo crudo mg kg⁻¹ de suelo (HIDRO), especie vegetal (PTA), tiempo de muestreo (TPO), interacción planta*tiempo de muestreo (IPT), interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo (IHT) e interacción hidrocarburo*planta (IHP) sobre la variable conductividad eléctrica (dS m⁻¹)

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO ***	Media ^z	PTA ***	Media ^z	TPO ^{NS}	Media ^z	IPT ***	Media ^z	IHT ***	Media ^z	IHP ***	Media ^z
0	2.67 a	S/P	2.62 a	60 D	2.42 a	S/P60	2.76 a	060D	2.70 a	0LE	2.11 e
10000	2.44 ab	MU	2.32 b	120 D	2.44 a	S/P120	2.42 b	0120D	2.63 ab	0MU	2.30 bcd
25000	2.32 b	LE	2.34 b			MU60	2.31bc	1060D	2.45 abc	0S/P	3.50 a
35000	2.33 b					MU120	2.32 bc	10120D	2.43 abc	10LE	2.72 b
50000	2.38 b					LE60	2.18 c	2560D	2.30 bc	10MU	2.21 cd
						LE120	2.52 ab	25120D	2.35 abc	10S/P	2.39 bcd
								3560D	2.22 c	25LE	2.22 bcd
								35120D	2.45 abc	25MU	2.49 bcd
								5060D	2.42 abc	25S/P	2.26 bcd
								50120D	2.34 abc	35LE	2.17 cd
										35MU	2.20 cd
										35S/P	2.62 cb
										50LE	2.46 bcd
										50MU	2.367 bcd
										50S/P	2.31 bcd

*, **, *** y NS=p≤0.05, 0.01, 0.001 y no significativo, respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=Mucuna, LE= Leucaena.

La conductividad eléctrica es una propiedad de las soluciones que se encuentra relacionada con el tipo y valencia de los iones presentes, sus concentraciones total y relativa, su movilidad, la temperatura del líquido, y su contenido de sólidos disueltos. Por lo que al observar que la CE disminuye en la solución del suelo conforme aumenta la concentración de hidrocarburo, lo que sugiere que la presencia de hidrocarburo en suelos hace que las sales se adhieran a las moléculas de hidrocarburo, y por tanto se vuelvan insolubles en la solución de suelo. Sin embargo, en la Figura 24 se observa que el comportamiento de la CE es irregular, disminuyendo hasta concentraciones de 25 000 mg kg⁻¹, y aumentando conforme se incrementa la concentración de petróleo crudo a los 60 días. A los 120 días se observó que en todas las concentraciones de hidrocarburo aumentó la CE con respecto al testigo, lo que hace suponer que la cantidad de sales se incrementó en la solución del suelo.

Al respecto Martínez y López (2001), encontraron que en suelos arcillosos el comportamiento de CE fue irregular, sin embargo se encontró una ligera tendencia a aumentar conforme incrementa la concentración de hidrocarburo en suelo. Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación a los 120 días de establecido el experimento. Esto se puede atribuir a que el suelo al estar sujeto a riego constante y no tener más medio para la pérdida de agua que la evapotranspiración, se fueron quedando las sales en el suelo de las macetas, lo que contribuyó a que aumentara la salinidad y por lo tanto la CE en el suelo.

Inicialmente el suelo tuvo una CE de 2.71 dS m⁻¹, lo que evidencia que la mayoría de los tratamientos evaluados estuvieron por debajo del testigo inicial, a excepción del tratamiento sin hidrocarburo y sin planta, en el cual se observó que estuvo muy por encima del valor reportado inicialmente. Esto confirma que el agua utilizada para el riego fue el factor que causó los cambios reportados en la variable respuesta, ya que los riegos se aplicaron a todos los tratamientos y en diferente cantidad según el requerimiento de la planta, por lo que estar en

tratamientos sin planta, las sales no fueron adsorbidas por ningún medio, lo que disparó la concentración de sales en suelo.

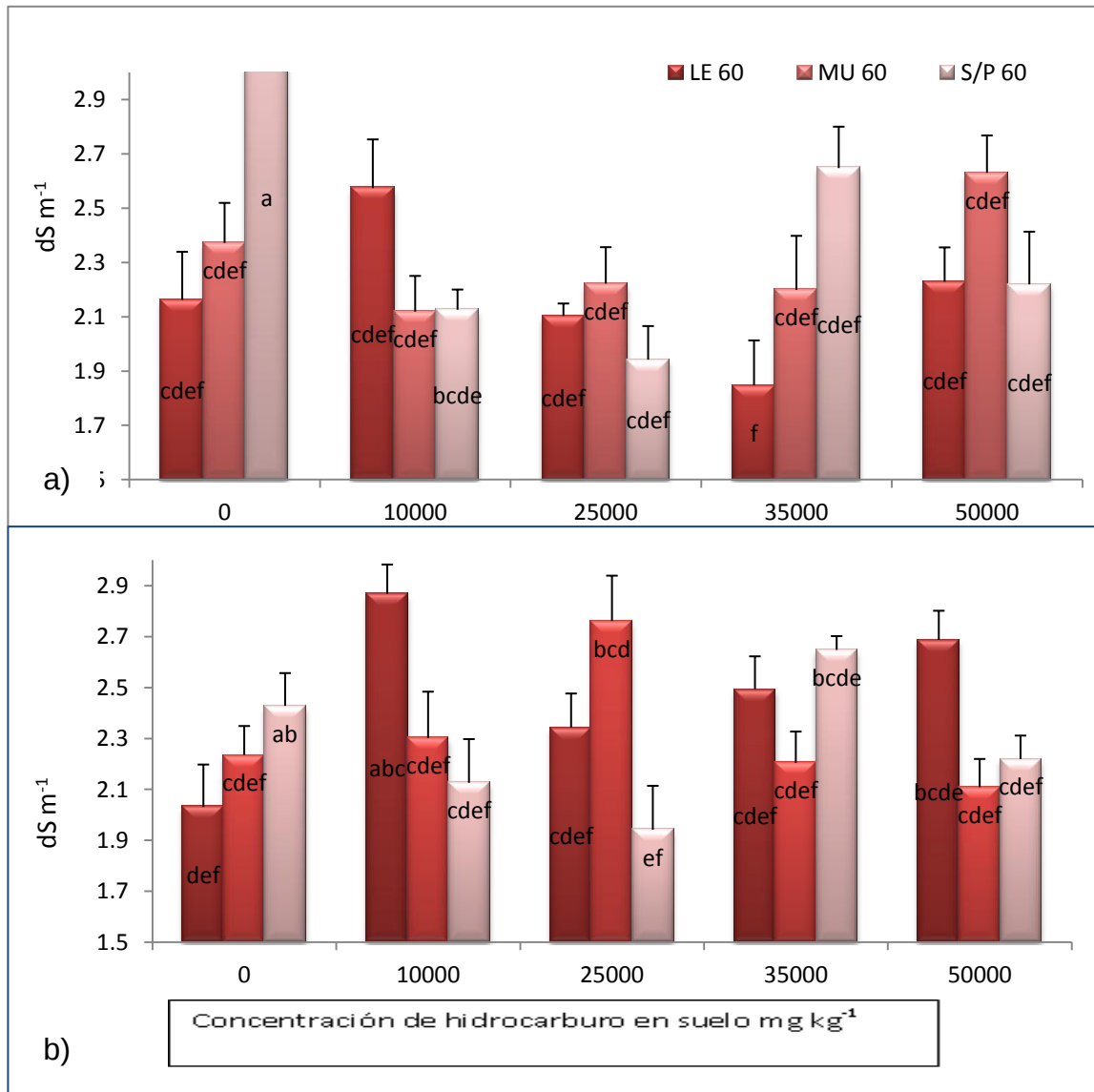


Figura 24. Comportamiento de la conductividad eléctrica a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

Trujillo *et al.* (2012), mostraron que la CE en el suelo restaurado se incrementó hasta tres veces posiblemente por la influencia del petróleo y de las sustancias

aplicadas en la restauración, pero no origina efectos dañinos en la planta. Esto concuerda en parte con la presente investigación, donde se observa este comportamiento en las concentraciones más altas de hidrocarburo estudiadas, probablemente debido a que a esas altas concentraciones, el hidrocarburo tuvo influencia en la aportación de sales al suelo.

3.4. Materia orgánica (MO)

Los resultados obtenidos para materia orgánica, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.141 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Se observaron diferencias significativas absolutas en el contenido de materia orgánica en el suelo, conforme se incrementó la concentración de hidrocarburo, el valor más alto se presentó a 50 000 mg kg⁻¹, siendo tres veces superior a lo que se reporta en ausencia de hidrocarburo. El factor planta, mostró que leucaena tuvo comportamiento superior y diferencias significativas con respecto a mucuna y sin planta. En el tiempo de muestreo, se observó que hubo mayor cantidad de materia orgánica (MO) aumentó 17% a los 120 días con respecto a los 60 días.

En el Cuadro 16, se observó que el valor más alto de MO (6.84%) fue con leucaena a los 120 días, en la interacción planta*tiempo de muestreo, mostrando ser superior en 20% que lo que se obtuvo mucuna a los 60 días (5.75%) que presentó el valor más bajo. En interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, el valor más alto estuvo a los 50 000 mg kg⁻¹ (9.37%) a los 120 días, siendo tres veces superior al valor más bajo (2.87%) que dio en ausencia de hidrocarburo a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*planta se observó que el valor más alto de MO lo presentó a los 50 000 mg kg⁻¹ en ausencia de planta (9.31%), siendo tres veces superior al valor más bajo (2.91%) se dio en ausencia de hidrocarburo con leucaena.

Cuadro 16. Comportamiento de porcentaje de materia orgánica en HIDRO=mg kg⁻¹ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO ***	Media ^z	PTA*	Media ^z	TPO**	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	3.00 e	S/P	6.32 b	60 D	5.86 b	S/P60	5.79 cd	060D	2.87 g	0LE	2.91 g
10000	5.12 d	MU	6.23 b	120 D	6.87 a	S/P120	6.84 b	0120D	3.17 g	0MU	3.06 g
25000	6.84 c	LE	6.59 a			MU60	5.75 d	1060D	4.71 f	0S/P	3.05 g
35000	8.11 b					MU120	6.65 b	10120D	5.52 e	10LE	5.22 f
50000	9.00 a					LE60	6.02 c	2560D	6.40 d	10MU	5.21 f
						LE120	7.15 a	25120D	7.29 c	10S/P	4.91 f
								3560D	7.55 c	25LE	7.14 d
								35120D	8.61 b	25MU	6.93 de
								5060D	8.54 b	25S/P	6.46 e
								50120D	9.37 a	35LE	8.61 b
										35MU	7.84 c
										35S/P	7.85 c
										50LE	8.82 ab
										50MU	8.82 ab
										50S/P	9.31 a

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=Mucuna, LE= Leucaena.

Se observó que la cantidad de MO en suelo tuvo diferencias significativas al aumentar la concentración de hidrocarburo. Sin embargo, no se presentan diferencias significativas entre el factor planta (sin planta, leucaena, mucuna) dentro de cada concentración de hidrocarburo, notándose un ligero aumento en presencia de planta. El mismo comportamiento se registró tanto a los 60 como a los 120 días (Figura 25).

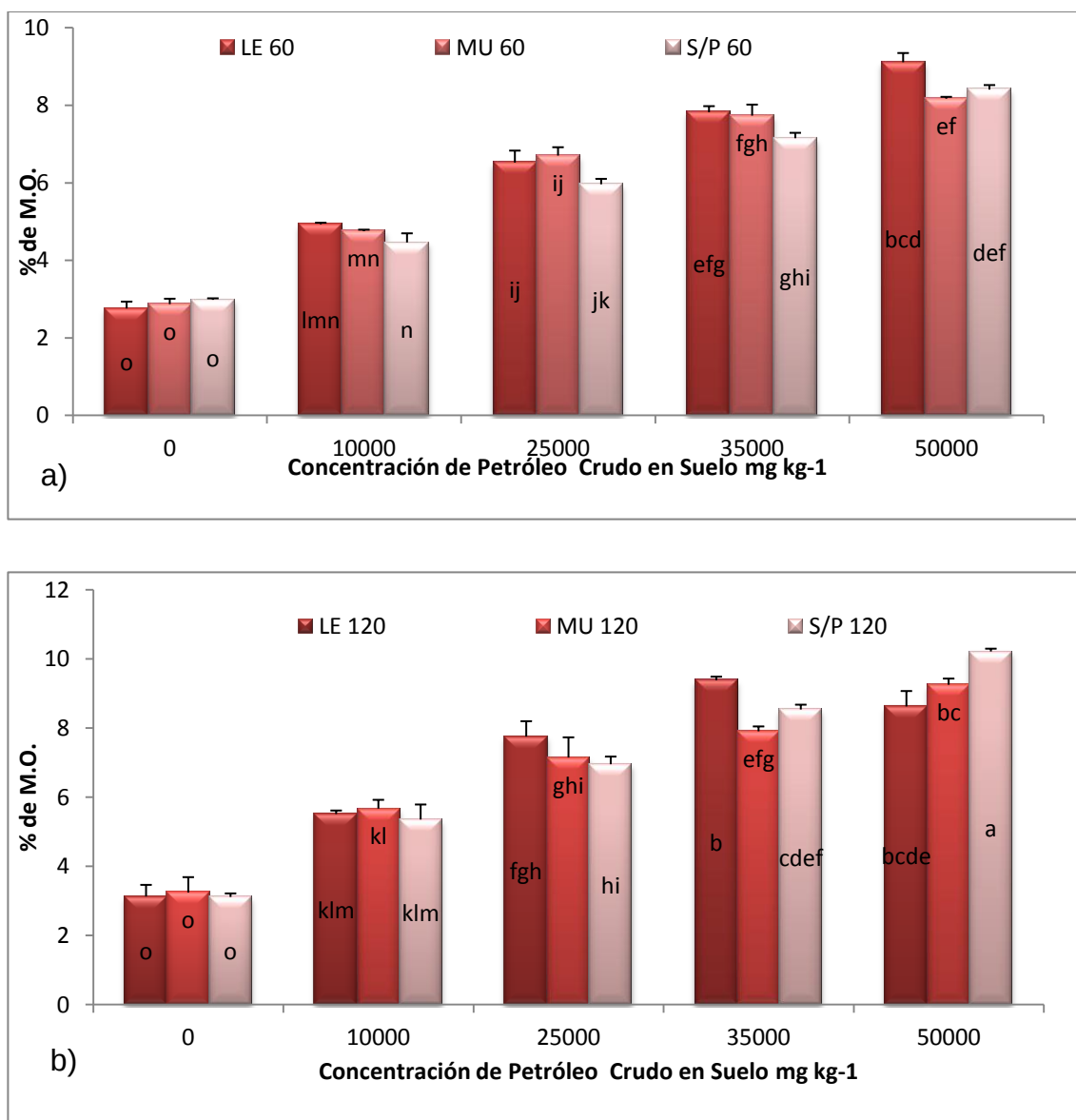


Figura 25. Comportamiento del porcentaje de materia orgánica a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

Diversas investigaciones muestran resultados similares a los obtenidos en este trabajo, en dónde se incrementa la cantidad de MO conforme se aumenta la cantidad de hidrocarburo en suelo (Martínez y López, 2001; Zavala *et al.*, 2005; Pons, 2010). Ortínez *et al.* (2003), mencionan que la presencia de hidrocarburos en suelo provoca aumento del carbono orgánico, ya que el 75% del petróleo crudo es oxidable. Por otra parte, este comportamiento es en gran

medida atribuible al hecho de que la técnica de cuantificación de materia orgánica (Walkley-Black), mide el carbono orgánico en suelo, por lo que el hidrocarburo al estar constituido en su mayoría por carbono orgánico, influye cuantitativamente sobre la cantidad de MO que nos reporta la técnica, coincidiendo con Martínez y López (2001).

Adams *et al.* (2002), encontraron que a mayor cantidad de MO, es mayor la tasa de respiración de microorganismos, lo que es importante para la fitorremediación, ya que son los microorganismos los que favorecen la degradación de los hidrocarburos, al alimentarse de la energía que les proporcionan los carbonos presentes.

Njoku *et al.* (2009) demostraron que durante las primeras etapas de crecimiento de *Glicine max*, se redujo la cantidad de MO en suelo. Después de 63 días notaron un incremento, porque la especie empezó a tirar las hojas al suelo y esto contribuyó a que la MO aumentara, y/o a la liberación del carbono orgánico del petróleo crudo hacia el suelo. Resultados similares se encontraron en la presente investigación, en la cual no por el factor tiempo, pero si en comparación con testigo sin planta se presentó un ligero incremento de materia orgánica, pero no fue debido a la incorporación de hojas sobre el suelo (porque fueron retiradas), sino por la presencia de raíces que no se alcanzaron a extraer para ser cuantificadas.

3.5. Nitrógeno

Los resultados obtenidos para el macroelemento nitrógeno, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.120 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados muestran que la cantidad de nitrógeno inorgánico, tiende a disminuir conforme aumenta la concentración de petróleo crudo en suelo, con un decremento del 39% en la concentración más alta con respecto al testigo. En

el factor planta, se encontró que solo existe diferencia significativa entre el testigo sin planta y leucaena, se encontró que la presencia de planta en el suelo contaminado causa la disminución del nitrógeno inorgánico. También se observó que la cantidad de nitrógeno, aumentó conforme se pasó de 60 a 120 días (Cuadro 17).

Cuadro 17. Comportamiento de nitrógeno inorgánico (mg kg^{-1}) en HIDRO= mg kg^{-1} de petróleo crudo en suelo, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo e IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

HIDRO**	EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
	Media ^Z	PTA ^{NS}	Media ^Z	TPO ^{***}	Media ^Z	IPT ^{***}	Media ^Z	IHT ^{***}	Media ^Z	IHP ^{***}	Media ^Z	
0	9.51 a	S/P	7.55 a	60 D	6.15 b	S/P60	7.163 ab	060D	10.19 a	0LE	8.05 abc	
10000	7.33 b	MU	7.09 ab	120 D	7.96 a	S/P120	7.93 a	0120D	8.75 ab	0MU	9.33 ab	
25000	6.38 b	LE	6.47 b			MU60	6.02 bc	1060D	6.88 bc	0S/P	10.90 a	
35000	6.28 b					MU120	8.17 a	10120D	7.78 ab	10LE	6.53bc	
50000	5.85 b					LE60	5.27 c	2560D	4.59 cd	10MU	7.29 bc	
						LE120	7.75 a	25120D	8.167 ab	10S/P	8.17 abc	
								3560D	4.39 d	25LE	5.83 c	
								35120D	8.17 ab	25MU	6.88 bc	
								5060D	4.71 cd	25S/P	6.42 bc	
								50120D	7.00 bc	35LE	6.07 c	
										35MU	6.36 bc	
										35S/P	6.42 bc	
										50LE	6.13 bc	
										50MU	5.6 c	
										50S/P	5.83 c	

*, **, ***= $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

En la interacción planta*tiempo de muestreo, se observó que el valor más alto (7.93 mg kg^{-1}) lo presentó mucuna a los 120 días, el valor más bajo (5.27 mg kg^{-1}) fue con leucaena a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo el valor más alto (10.2 mg kg^{-1}) estuvo en ausencia de hidrocarburo a los 60 días, siendo superior en 57% al valor con menor nitrógeno (4.39 mg kg^{-1}), que se dio a $35\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*planta el valor más alto (10.90 mg kg^{-1}) se presentó en ausencia de hidrocarburo y

planta, mientras que el valor más bajo (5.6 mg kg^{-1}) se presentó en la concentración más alta ($50\,000 \text{ mg kg}^{-1}$) con mucuna (Cuadro 17).

Se encontró que conforme aumentó la concentración de hidrocarburo, se disminuye la cantidad de nitrógeno en todas las concentraciones evaluadas a los 60 días. También se observó que la concentración de nitrógeno en suelo, no tuvo diferencias significativas entre presencia y ausencia de planta; pero la ausencia de planta, en todos los casos mantuvo mayor concentración de nitrógeno en suelo, lo que sugiere que las plantas aunque son leguminosas fijadoras de nitrógeno, no cumplieron esa función, observándose que las plantas extrajeron el nitrógeno disponible en el suelo (Figura 26).

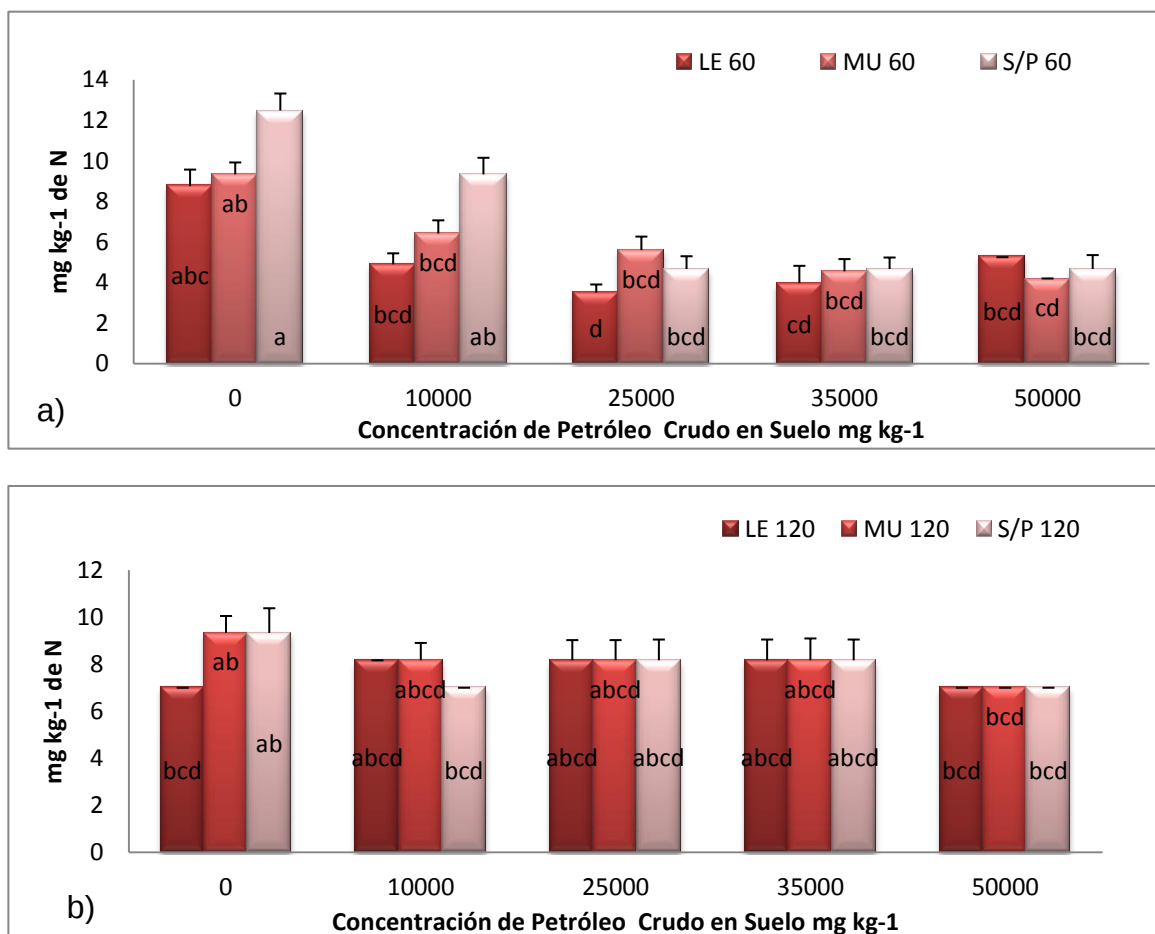


Figura 26. Comportamiento del contenido de nitrógeno inorgánico (mg kg^{-1}) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

Por otro lado, a los 120 días se observó que no hubo diferencias entre la cantidad de nitrógeno inorgánico en el suelo expuesto a diferentes concentraciones de petróleo crudo, se vio que tanto en presencia como en ausencia de planta, no se presentaron diferencias significativas a las diferentes concentraciones de hidrocarburo.

Al respecto de los resultados obtenidos a los 120 días de experimento, Ferrera *et al.* (2007) encontraron que la simbiosis que realizan las leguminosas con fijadores de nitrógeno del género *Rhizobium*, las libera de la necesidad de absorber nitrógeno, por lo que son más competitivas en suelos con baja fertilidad. Esta característica es importante para el proceso de fitorremediación, ya que con la contaminación del suelo con hidrocarburos se aumenta la relación C/N, afectando la disponibilidad de nitrógeno.

Sanclemente (2009) encontró que la presencia de *Mucuna pruriens* en suelo de tipo Typic haplustalfs no presentó diferencias significativas en la cantidad de nitrógeno inorgánico en suelo, después de 220 días con la presencia de la planta (170% de incremento con respecto al testigo y no fue estadísticamente significativo). Este resultado es similar a lo presentado en ésta investigación, en donde bajo condiciones de ausencia de hidrocarburo, la especie no fijó nitrógeno y mostró que a los 60 días estuvo por debajo del testigo sin planta; a los 120 días se comportó de igual forma que el tratamiento sin planta. Esto se debió probablemente a las condiciones en las que se llevó a cabo la investigación, que aunque se manejó bajo invernadero y las temperaturas eran altas, los cambios de temperatura entre el día y la noche, son más marcados que en climas tropicales. Por otra parte, subsistió el problema que la raíz además de estar expuesta a condiciones de saturación por agua, los recipientes utilizados como macetas por ser de vidrio y color ámbar, incrementó la temperatura del suelo y sometió a la especie a mayor estrés, lo que provocó que los nódulos se desarrollaran escasamente.

Zavala *et al.* (2005) observaron que a concentraciones que van de los 7 000 a 15 000 mg kg⁻¹ no existen diferencias significativas en la variación de nitrógeno, presentando correlación positiva con la concentración de hidrocarburo. Comportamiento contrario a lo que se observa en la presente investigación en 10 000 mg kg⁻¹, en la cual no hay diferencias absolutas significativas; de igual forma, se registró que la cantidad de nitrógeno tendió a disminuir conforme aumentó la concentración de petróleo crudo en suelo.

Nie *et al.* (2011) encontraron que existe una correlación positiva entre la concentración de hidrocarburo y la cantidad de nitrógeno inorgánico en suelo, cuestión que se pudo deber a que la planta tenía mayor capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de presencia de hidrocarburo o que el hidrocarburo utilizado aportaba nitrógeno al suelo.

Xiao *et al.* (2015) encontraron que la presencia de hidrocarburo en suelo, puede afectar la absorción de nitrógeno por *Medicago sativa*. Similar a ésta investigación, que en presencia de hidrocarburo se disminuyó la cantidad de nitrógeno inorgánico en suelo tanto a los 60 como a los 120 días. Sin embargo, a los 120 días empezó a ver que la concentración de nitrógeno en suelo empezó a aumentar en todas las concentraciones evaluadas, lo que sugiere que mucuna y leucaena tienen mayor capacidad de fijar nitrógeno que *M. sativa*.

3.6. Fósforo

Los resultados obtenidos, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.180 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

El Cuadro 19 muestra que el fósforo tendió a disminuir conforme se aumenta la concentración de hidrocarburo en suelo. El valor más bajo (4.23 mg kg⁻¹), estuvo a la concentración de 10 000 mg kg⁻¹, estando un 32% más bajo que el tratamiento sin hidrocarburo. En el factor tiempo se observó que conforme éste

aumenta, se incrementa la cantidad de fósforo en el suelo, correspondiendo dicho aumento a un 200% al pasar de 60 a 120 días.

En la interacción planta*tiempo de muestreo el valor más bajo se presentó en ausencia de planta a los 60 días (3.35 mg kg^{-1}), mientras que el valor más alto (8.52 mg kg^{-1}) se presentó en ausencia de planta a los 120 días. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo el valor más alto (9.78 mg kg^{-1}) fue en ausencia de hidrocarburo a los 120 días, mientras que los valores más bajos estuvieron a los 25 000, 35 000 y 50 000 mg kg^{-1} . En la interacción hidrocarburo*planta se observó que el valor más alto (7.39 mg kg^{-1}) estuvo en ausencia de hidrocarburo y presencia de leucaena, mientras que el valor más bajo (3.35 mg kg^{-1}) se presentó en concentración de 25 000 mg kg^{-1} de hidrocarburo en ausencia de planta (Cuadro 19).

Cuadro 18. . Comportamiento de fósforo soluble en HIDRO= mg kg^{-1} de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción planta*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO***	Media ^z	PTA ^{NS}	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	7.14 a	S/P	5.85 a	60 D	3.59 b	S/P60	3.35 b	060D	5.08 a	0LE	7.39 ab
10000	4.23 b	MU	5.08 a	120 D	7.66 a	S/P120	8.52 a	0120D	9.78 ab	0MU	6.83 ab
25000	4.49 b	LE	5.32 a			MU60	3.650 b	1060D	3.60 de	0S/P	7.19 ab
35000	4.88 b					MU120	6.87 a	10120D	5.08 cde	10LE	4.83 bc
50000	6.40 a					LE60	3.77 b	2560D	3.08 e	10MU	3.40 c
						LE120	7.42 a	25120D	6.07 cd	10S/P	4.42 bc
								3560D	3.00 e	25LE	5.26 abc
								35120D	7.30 bc	25MU	4.67 bc
								5060D	3.19 e	25S/P	3.35 c
								50120D	10.00 a	35LE	4.67 bc
										35MU	4.48 bc
										35S/P	5.40 abc
										50LE	4.46 bc
										50MU	5.93 abc
										50S/P	8.46 a

*, **, ***= $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

El comportamiento de fósforo a los 60 días tendió a disminuir en presencia de hidrocarburo en suelo (Figura 27), sin presentar diferencias significativas entre tratamientos. A los 120 días se observó un comportamiento similar hasta la concentración de 35 000 mg kg⁻¹. En general, la cantidad de fósforo en suelo aumentó conforme se pasa de los 60 a los 120 días. Esto puede deberse a que al degradarse los hidrocarburos, quedan mejores condiciones para que el fósforo se solubilice en la solución del suelo (Trujillo *et al.*, 2012).

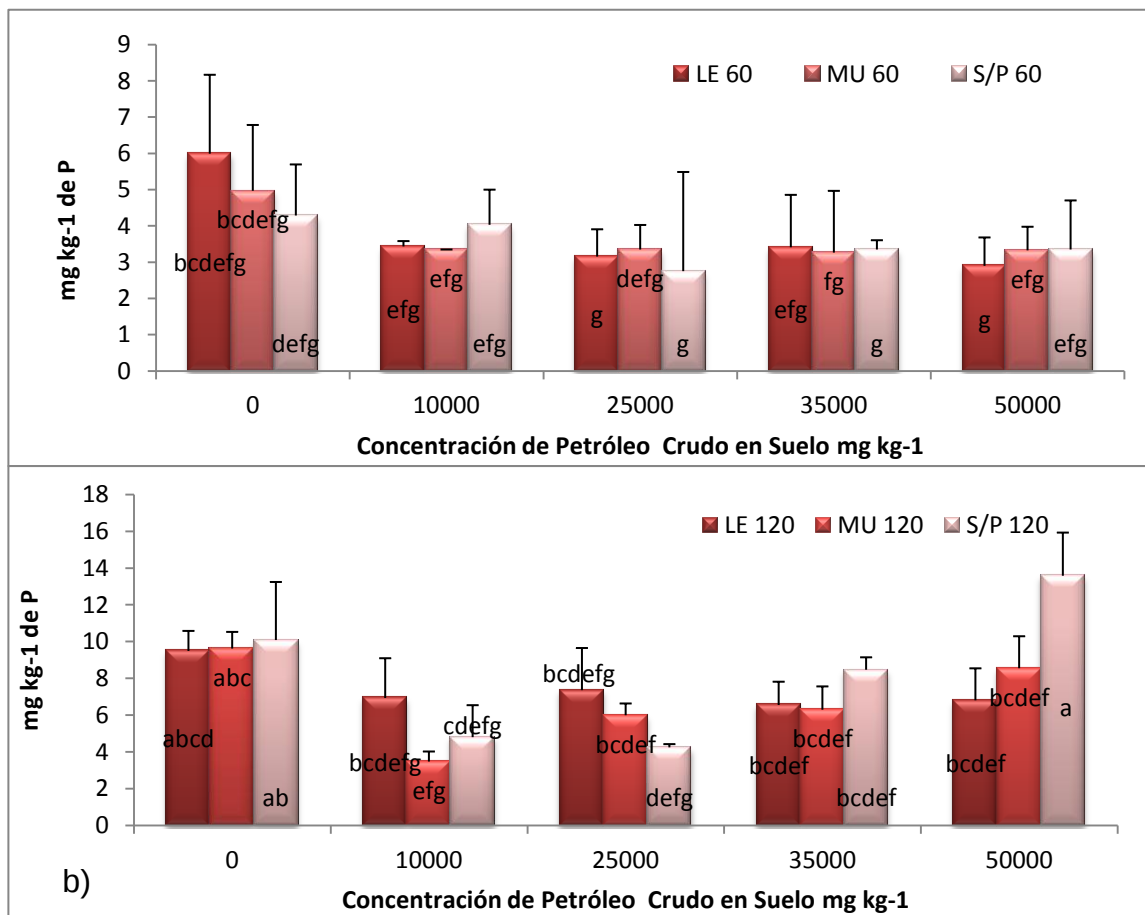


Figura 27. Comportamiento del contenido de nitrógeno fósforo soluble (mg kg⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

Ortínez *et al.* (2003) indican que la presencia de hidrocarburo en suelo causa el incremento del fósforo disponible, comportamiento contrario a lo observado en la presente investigación. Por su parte, Zavala *et al.* (2005) mostraron que a concentraciones que van de los 7 000 a 15 000 mg kg⁻¹ no se encuentran diferencias significativas en la concentración de fósforo. Esto coincide con la presente investigación al pasar de 0 a 10 000 mg kg⁻¹ y no se encontraron diferencias absolutas.

Xiao *et al.* (2015) observaron que a los 60 días, el fósforo baja significativamente en *Medicago sativa* y testigo sin planta, mientras que *Fire phoenix* y *Callistephus chinensis* aumentaron la cantidad de fósforo en el suelo. En tanto que a los 120 días, todas las especies de planta mostraron incremento en la cantidad de fósforo en suelo excepto el testigo sin planta. Una tendencia similar se dio en la presente investigación, donde mucuna y leucaena incrementaron la cantidad fósforo en suelo, pero el incremento no fue estadísticamente significativo, lo que sugiere que necesitan más tiempo para alcanzar lo reportado por Xiao y colaboradores en 2015.

Liang *et al.* (2012) encontraron que en suelos a 1 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, la cantidad de fósforo en suelo disminuyó en 19% con respecto al testigo, mientras que en la presente investigación la disminución fue en 23% para leucaena a los 120 días, mientras que para mucuna fue del 64%.

3.7. Potasio

Los resultados obtenidos para potasio, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.524 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

No se encontró comportamiento definido conforme aumentó la concentración de petróleo crudo en suelo, aunque se pudo observar que en presencia de hidrocarburo, la cantidad de potasio en suelo disminuyó. En el factor planta existe una diferencia significativa sin planta y con presencia de planta, pero no

se observa ninguna diferencia entre las dos especies en cuestión. A los 120 días aumenta significativamente en un 12% la cantidad de potasio en suelo con respecto al primer muestreo.

En la interacción planta*tiempo de muestreo el valor más alto (411.8 mg kg^{-1}) se presenta en condiciones de ausencia de planta a los 120 días, superior en un 140% con respecto al valor más bajo (284.3 mg kg^{-1}), para mucuna a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo se observó el valor más alto (461.1 mg kg^{-1}) en ausencia de hidrocarburo a los 120 días, siendo superior en un 160% al valor más bajo (285.7 mg kg^{-1}), que fue conseguido a los $25\,000 \text{ mg kg}^{-1}$, a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*planta el valor más alto (377.8 mg kg^{-1}) a $10\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ en ausencia de planta, mientras que el valor más bajo (312.6 mg kg^{-1}) estuvo en la concentración de $25\,000 \text{ mg kg}^{-1}$ de petróleo crudo con mucuna, sin registrarse una tendencia clara (Cuadro 20).

Cuadro 19. Comportamiento de potasio intercambiable en HIDRO=mg kg⁻¹ de petróleo crudo en suelo, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO***	Media ^z	PTA**	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	369 a	S/P	355.4 a	60 D	297.6 a	S/P60	302.7 cd	060D	287 de	0LE	357.36 abc
10000	358.2 ab	MU	341.8 b	120 D	398.2 b	S/P120	411.8 a	0120D	461.1 a	0MU	370.02 ab
25000	328.44 c	LE	339.2 b			MU60	284.3 d	1060D	293.4 de	0S/P	377.56 a
35000	341.6 bc					MU120	399.3 ab	10120D	431.1 a	10LE	355.59 abc
50000	331 c					LE60	305.8 c	2560D	285.7 e	10MU	344.44 abcd
						LE120	381 b	25120D	376.5 b	10S/P	377.8 a
								3560D	305.2 de	25LE	320.4 cd
								35120D	382.7 b	25MU	312.6 d
								5060D	316.6 cd	25S/P	351 abcd
								50120D	346.3 c	35LE	343.2 abcd
										35MU	347.4 abcd
										35S/P	334.6 bcd
										50LE	320.2 cd
										50MU	334.6 bcd
										50S/P	339.5 abcd

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

La Figura 28 muestra que el potasio en suelo no presentó diferencias significativas entre presencia o ausencia de planta en cada una de las concentraciones de hidrocarburo evaluadas. Tampoco se encontraron diferencias significativas entre las distintas concentraciones de hidrocarburo contra el testigo sin planta. En el segundo muestreo se observó que en todas las concentraciones de hidrocarburo hubo un ligero incremento con respecto al muestreo realizado a los 60 días, y disminuyó conforme aumenta la concentración de hidrocarburo.

Zavala *et al.* (2005) observó que a concentraciones de 7 000 a 15 000 mg kg⁻¹ no se encuentran diferencias absolutas en la variación de los valores de potasio, pero hay diferencias significativas con correlación positiva conforme aumenta la concentración de hidrocarburo. Esto fue diferente a lo encontrado

en la presente investigación, ya que la cantidad de K en suelo no cambió significativamente conforme aumentó la concentración de petróleo crudo, debido a que el hidrocarburo no proporcionó K y la planta utilizó muy baja cantidad del disponible en la solución del suelo.

Trujillo *et al.* (2012) encontraron que en presencia de petróleo crudo, el K se redujo 4.5 veces respecto al suelo testigo, mientras que en la presente investigación a los 60 días la reducción en promedio fue menor al 10%, lo que no causó diferencias significativas, y a los 120 días el potasio intercambiable se redujo 1.5 veces con respecto al testigo.

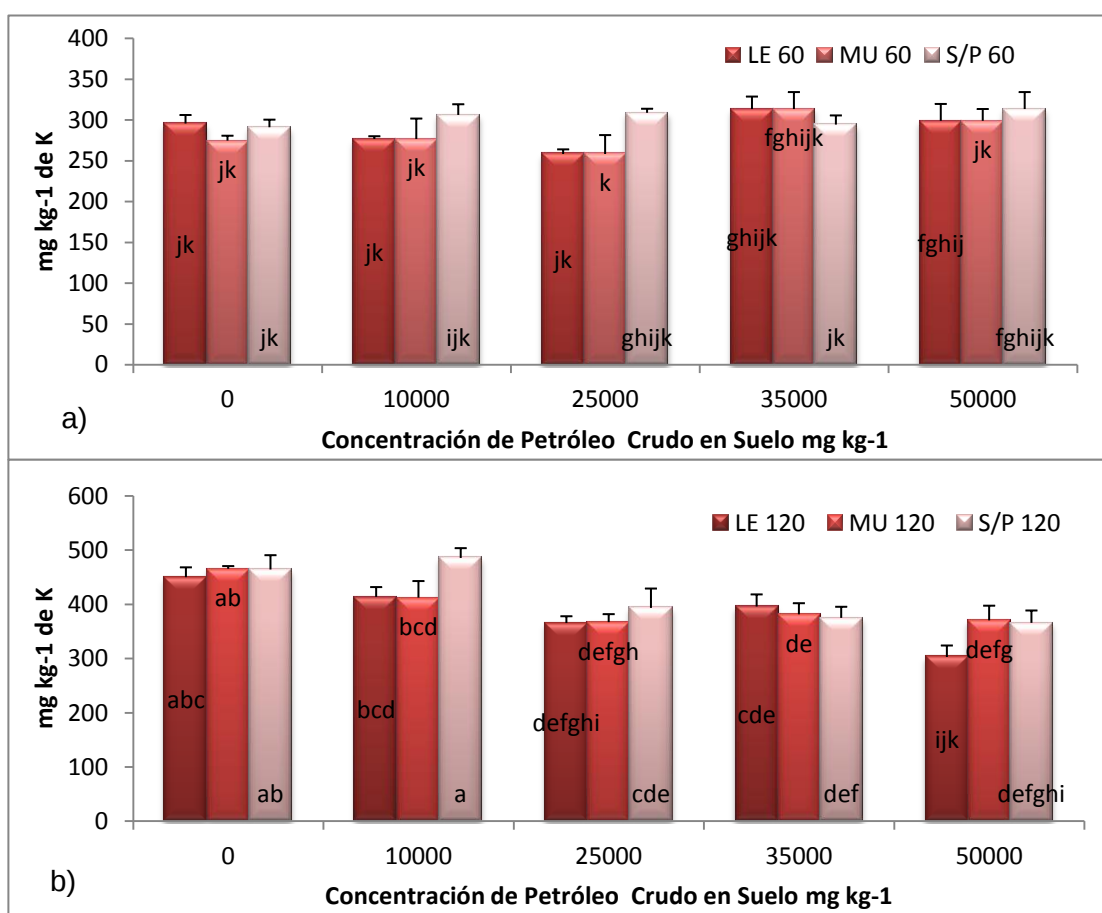


Figura 28. Comportamiento del potasio intercambiable (mg kg⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

3.8. Capacidad de intercambio catiónico

Los resultados obtenidos para CIC, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.404 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Se observó que conforme aumentó la concentración de hidrocarburo en suelo disminuyó la CIC, teniendo un decremento del 13% en la concentración más alta de hidrocarburo ($50\,000\text{ mg kg}^{-1}$) con respecto al testigo sin hidrocarburo. La presencia de planta en suelo causó que la CIC bajara de forma significativa, pero no se encontraron diferencias entre las especies de plantas evaluadas. A los 120 días la CIC aumentó casi dos veces con respecto al primer muestreo.

En la interacción planta*tiempo de muestreo, se observó que el valor más alto (39.8 cmol kg^{-1}) fue en ausencia de planta a los 120 días, mientras que el menor valor (19.7 cmol kg^{-1}) estuvo en presencia de leucaena a los 60 días. La interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo mostró que el valor más alto (41.4 cmol kg^{-1}) de CIC, se presentó a $50\,000\text{ mg kg}^{-1}$ a los 120 días, superando por tres veces al valor más bajo ($13.34\text{ cmol kg}^{-1}$), que se dio en la misma concentración a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*planta el valor más alto (34.7 cmol kg^{-1}) se dio en ausencia de hidrocarburo con mucuna, mientras que valor más bajo (28.4 cmol kg^{-1}), se dio a $35\,000\text{ mg kg}^{-1}$ con la misma especie (Cuadro 21).

Cuadro 20. Comportamiento de capacidad de intercambio catiónico (cmol kg^{-1}) en $\text{HIDRO}=\text{mg kg}^{-1}$ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO***	Media ^z	PTA***	Media ^z	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
0	32.25 a	S/P	30.524 a	60 D	20.08 b	S/P60	20.585 c	060D	25.72 c	0LE	29.7 de
10000	30.70 b	MU	29.239 b	120 D	38.98 a	S/P120	39.8 a	0120D	38.76 b	0MU	34.7 a
25000	29.73 b	LE	28.831 b			MU60	20.043 c	1060D	22.9 d	0S/P	32.33 bc
35000	26.87 d					MU120	38.435 b	10120D	38.51 b	10LE	30.82 cd
50000	28.19 c					LE60	19.66 c	2560D	21.84 d	10MU	30.98 bcd
						LE120	38.65 ab	25120D	37.62 b	10S/P	30.32 cde
								3560D	16.51 e	25LE	29.31 de
								35120D	38.52 b	25MU	29.56 de
								5060D	13.34 f	25S/P	30.32 cde
								50120D	41.4 a	35LE	28.4 ef
										35MU	24.9 g
										35S/P	26.98 fg
										50LE	26.06 g
										50MU	26.23 fg
										50S/P	33.1 ab

*, **, ***= $p \leq 0.05, 0.01, 0.001$ respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

En la Figura 29, se puede observar que a los 60 días la CIC disminuyó conforme aumenta la concentración de petróleo crudo. Dicha disminución correspondió a un 22% a los 50 000 mg kg^{-1} con respecto al testigo sin hidrocarburo. La presencia de planta tuvo comportamiento irregular dentro de cada una de las concentraciones de hidrocarburo. Sin embargo, los cambios que se dieron en la CIC no fueron significativos con respecto al tratamiento sin planta dentro de cada concentración de hidrocarburo. A los 120 días, se observó un aumento significativo en todos los tratamientos con respecto al primer muestreo. También se registró que en presencia de hidrocarburo hubo diferencia significativa con respecto a la ausencia del mismo, pero no hubo diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de hidrocarburo evaluadas. Similarmente, las diferencias encontradas por presencia o ausencia

de planta dentro de las diferentes concentraciones de hidrocarburo tuvieron un comportamiento irregular sin diferencias estadísticas significativas a los 60 días.

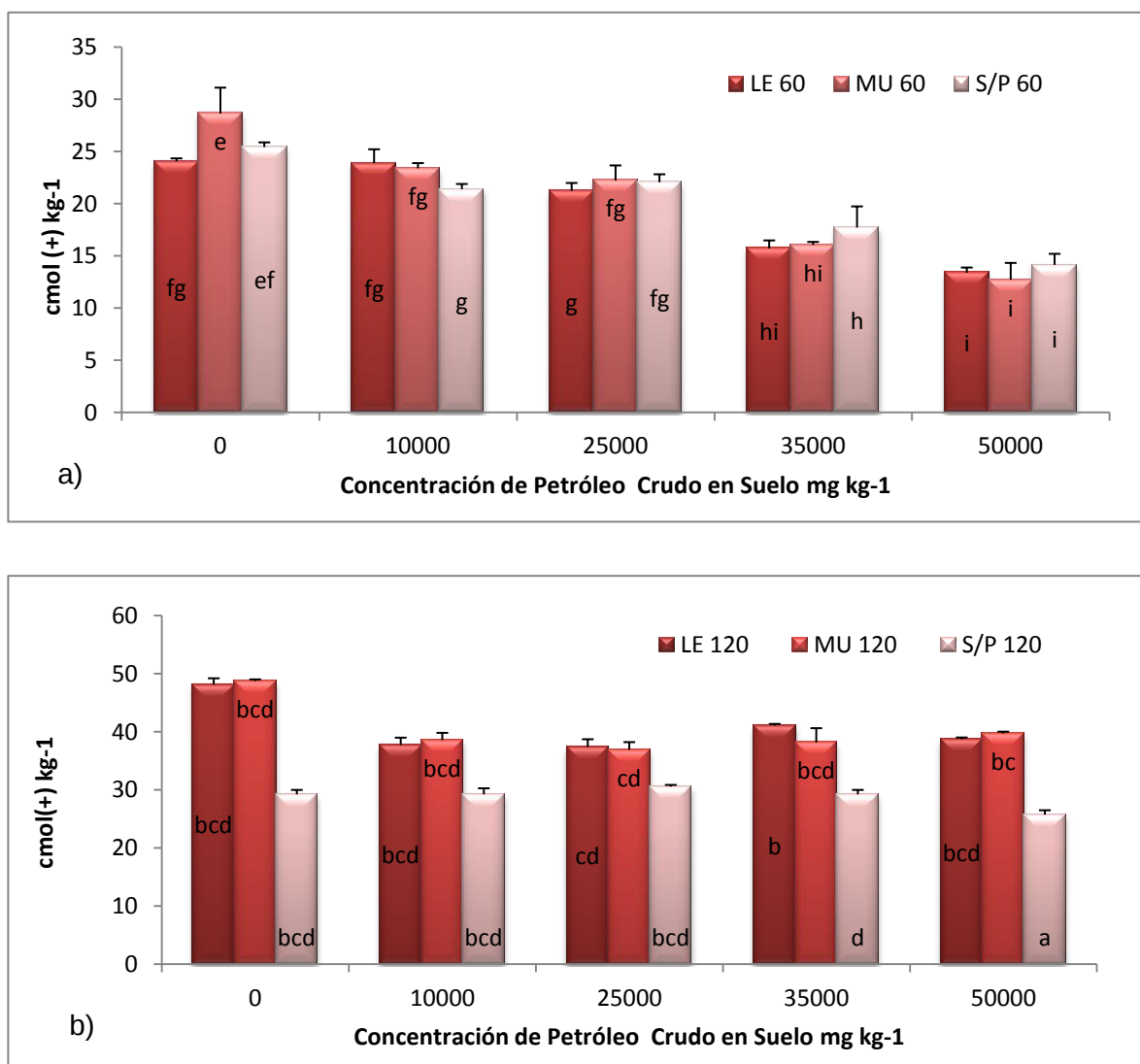


Figura 29. Comportamiento la capacidad de intercambio catiónico (cmol(+) kg⁻¹) a diferentes concentraciones de hidrocarburo y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta a los 60 (a) y 120 (b) días.

Trujillo *et al.* (2012) encontraron que los contenidos de las bases intercambiables disminuyeron en el suelo restaurado, comportamiento que se dio en las concentraciones de petróleo crudo más altas a los 60 días, sin presentar diferencias significativas, y atribuyeron éste fenómeno a que al

disminuir la cantidad de hidrocarburo, se abre espacio para que suceda el intercambio de cationes.

Por otra parte Zavala *et al.* (2005) reportaron que a concentraciones que van de los 7 000 a 15 000 mg kg⁻¹ no hubo diferencias absolutas en la variación de la CIC en suelos arenosos. También encontraron diferencias significativas con correlación positiva en CIC conforme aumenta la concentración de hidrocarburo en suelo. Estos resultados no fueron similares a lo encontrado en la presente investigación, probablemente debido a que el tipo de hidrocarburo empleado es más pesado y tiene mayor polaridad, lo que provocó que se adhiriera con mayor fuerza a las partículas de arcilla, caso contrario a lo ocurrido en las arenas donde la CIC disminuyó.

Xiao *et al.* (2015) mostraron que la CIC se incrementó de los 60 a los 120 días en 3.16 cmol kg⁻¹, mientras que en ausencia de planta el incremento fue de 0.54 cmol kg⁻¹ a los 60 días a 0.75 cmol kg⁻¹ a los 120 días. En la presente investigación hubo resultados similares; sin embargo el aumento fue de más de 18.38 cmol kg⁻¹ para mucuna y 19 cmol kg⁻¹ para leucaena al pasar de 60 a 120 días, lo que indica que la planta y/o el suelo fueron más eficientes en dejar espacios disponibles para el intercambio de cationes. Mientras que en ausencia de planta, el cambio fue de 19.21 cmol kg⁻¹, lo que confirma que el suelo tiene una mayor capacidad de intercambio catiónico comparado con lo presentado por Xiao y colaboradores en 2015. Nuestros resultados también concuerdan con Gutiérrez y Zavala (2002), quienes mostraron que las características mineralógicas, el drenaje deficiente y las condiciones oxido-reducción en las arcillas permiten definir correctamente el proceso de fijación de los hidrocarburos al suelo, por presentarse más superficies activas que inactivas y escaso movimiento de las partículas.

Por otra parte, Martínez y López (2001), encontraron una variación irregular en ésta variable, ya que la CIC aumenta y disminuye independientemente de la

variación en la concentración del hidrocarburo en suelo, resultado prácticamente idéntico al que se obtuvo en ésta investigación, que puede estar relacionado con el efecto de adsorción que tienen las arcillas (en su superficie) por los hidrocarburos, provocando interferencia en los sitios de intercambio de cationes.

Pons *et al.* (2010), encontraron que la CIC está altamente relacionada con la concentración de hidrocarburo en suelo, asumiendo que a mayores sedes de intercambio en el suelo, se favorece la adsorción de los hidrocarburos, ya que los compuestos solubles en metanol (diclorometano para la presente investigación) son polares. Sin embargo, el comportamiento de la CIC fue contrario para la presente investigación, ya que a los 60 días se observó que la presencia de hidrocarburo disminuyó la CIC, comportamiento que puede estar relacionado con la interrupción que causan los hidrocarburos entre las interacciones electrostáticas de los nutrientes catiónicos (K^+ , Ca^{++} , NH_4^+) con las partículas del suelo cargadas positivamente (arcillas).

4. ANÁLISIS DE TEJIDO VEGETAL

En mucuna, se observó que el N sufrió disminuyó en el tejido vegetal conforme se aumentó la concentración de petróleo crudo en el suelo, reduciendo el valor 52% a 50 000 mg kg⁻¹ con respecto al testigo. El P mostró un comportamiento irregular, tendiendo a aumentar conforme aumentó la concentración de hidrocarburo en suelo hasta la concentración media (25 000 mg kg⁻¹) y después bajó en las concentraciones altas (35 000 y 50 000 mg kg⁻¹). Por último el K aumentó al estar presente el hidrocarburo en el suelo, pero dicho aumento no tuvo un comportamiento uniforme (Cuadro 22).

En el tejido de leucaena, el N disminuyó hasta la concentración de 35 000 mg kg⁻¹, sin embargo repuntó en la concentración más alta de hidrocarburo, lo que lo situó por encima del testigo. Mientras que el P y K no tuvieron diferencias

marcadas en su comportamiento a través de las concentraciones del petróleo crudo en suelo (Cuadro 22).

Cuadro 21. Contenido nutrimental en porcentaje de N, P, K, de las especies *Mucuna* y *L. leucocephala* a diferente concentración de petróleo crudo (HB).

HB	ESPECIE	N %	% P	%K
0	MU	5.08	0.28	1.88
0	LE	6.48	0.298	4.82
10000	MU	4.73	0.36	3.58
10000	LE	6.48	0.384	4.72
25000	MU	3.68	0.41	4.5
25000	LE	4.73	0.298	5.02
35000	MU	2.98	0.33	4.38
35000	LE	4.73	0.356	4.96
50000	MU	2.8	0.31	3.04
50000	LE	7.56	0.30	4.50

MU= *Mucuna*, LE= *Leucaena*, N= Nitrógeno, P= Fósforo y K= Potasio

Al respecto Chicagwa *et al.* (2009) encontraron que mucuna tuvo concentraciones de 2.8% para N, 0.21% para P y 1.97% para K, resultados inferiores para N y P y superior para K en el testigo sin hidrocarburo en el presente trabajo. Mientras que García *et al.* (1996) encontraron que leucaena tiene una concentración de 3.52% para N, 0.26 para P y 1.45% para K, resultados inferiores en los tres elementos a lo presentado por el testigo en la presente investigación. Los resultados obtenidos en la presente investigación, pueden atribuirse a que las plantas, al encontrarse bajo constante estrés (sobre todo hídrico), y presentar un crecimiento menor al que tiene en condiciones normales de clima y altura, tendieron a acumular nutrimentos en sus tejidos en una cantidad más alta a lo que acumularía en condiciones normales de desarrollo.

En presencia de hidrocarburo, Díaz (2012) reportó que la cantidad de nitrógeno en el tejido vegetal de *Casuarina equisetifolia* no presentó diferencias significativas entre el testigo y la planta que se desarrolló a 5 000 mg kg⁻¹ de

diesel en suelo, condición que concuerda con lo que expresado por mucuna y leucaena a 10 000 mg kg⁻¹ en el presente trabajo, ya que los valores de N para mucuna y leucaena, disminuyeron pero no significativamente con respecto al testigo.

En la Figura 30 se muestra el balance de nutrimentos para la especie mucuna. El N se mueve del rango arriba de lo normal (en testigo sin hidrocarburo) a debajo de lo normal en 50 000 mg kg⁻¹. El P tuvo una ligera tendencia a aumentar conforme se incrementó la concentración de hidrocarburo; sin embargo, esta tendencia no tiene influencia sobre el rango de competencia, ya que lo sitúa en lo normal para todas las concentraciones de hidrocarburo estudiadas. El potasio aumentó conforme se incrementó la concentración de petróleo crudo en el suelo, moviéndose en rangos que van de debajo de lo normal en testigo, a normal en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹.

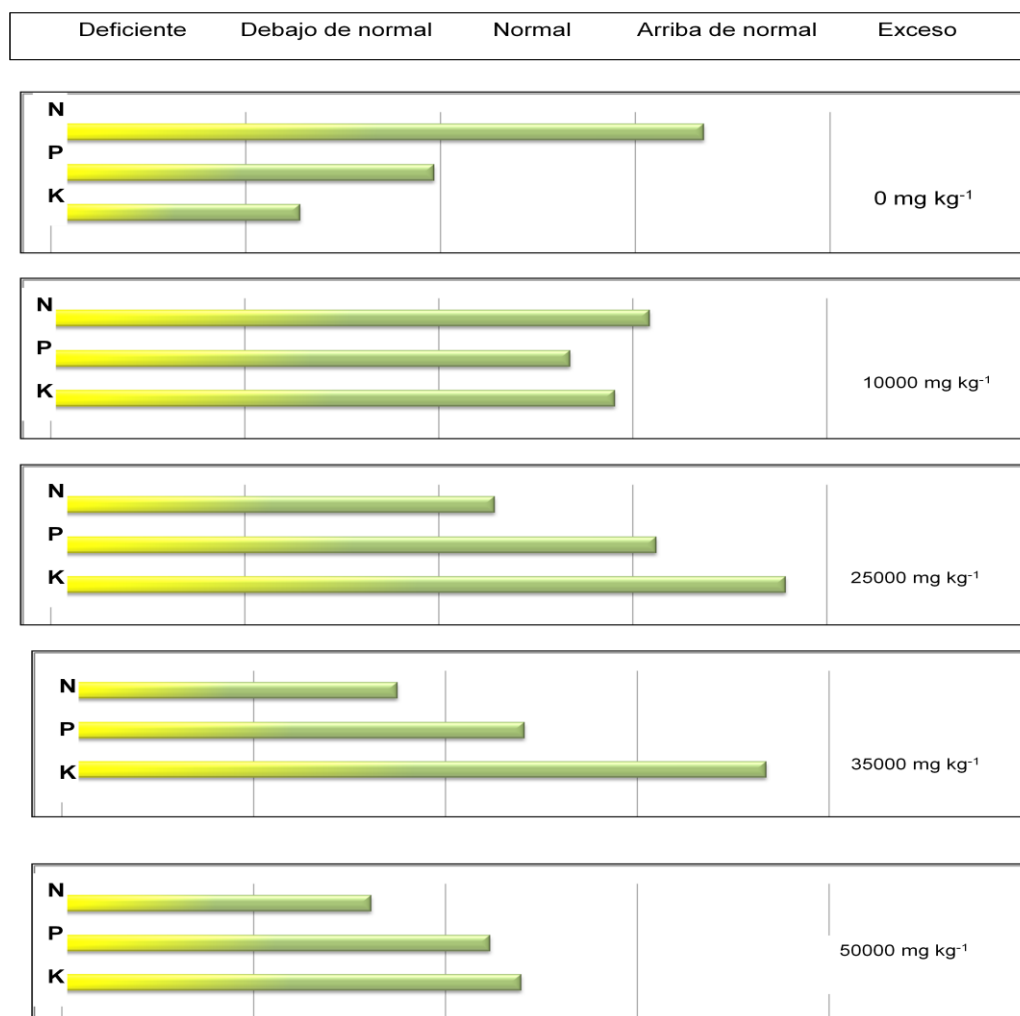


Figura 30. Análisis vegetal de la especie *Mucuna pruriens* en las cinco concentraciones de petróleo crudo evaluadas.

En la figura 31, se muestra el comportamiento de los macronutrientes N, P, K en el tejido vegetal de leucaena. El N tuvo un comportamiento irregular en presencia de distintas dosis de petróleo crudo en suelo, ya que inicialmente disminuyó al aumentar la concentración de hidrocarburo, pero en la concentración de 50 000 mg kg⁻¹, se observó un repunte que lo sitúa en el mismo rango del testigo (exceso). Por su parte, el P no presentó grandes diferencias conforme se aumentó la concentración de hidrocarburo en suelo, manteniéndose en el rango de lo normal, y presenta un repunte en la concentración de 10 000 mg kg⁻¹. El K no presentó diferencias entre

concentraciones de hidrocarburo, ya que en todos los tratamientos se mantuvo en el rango de exceso.

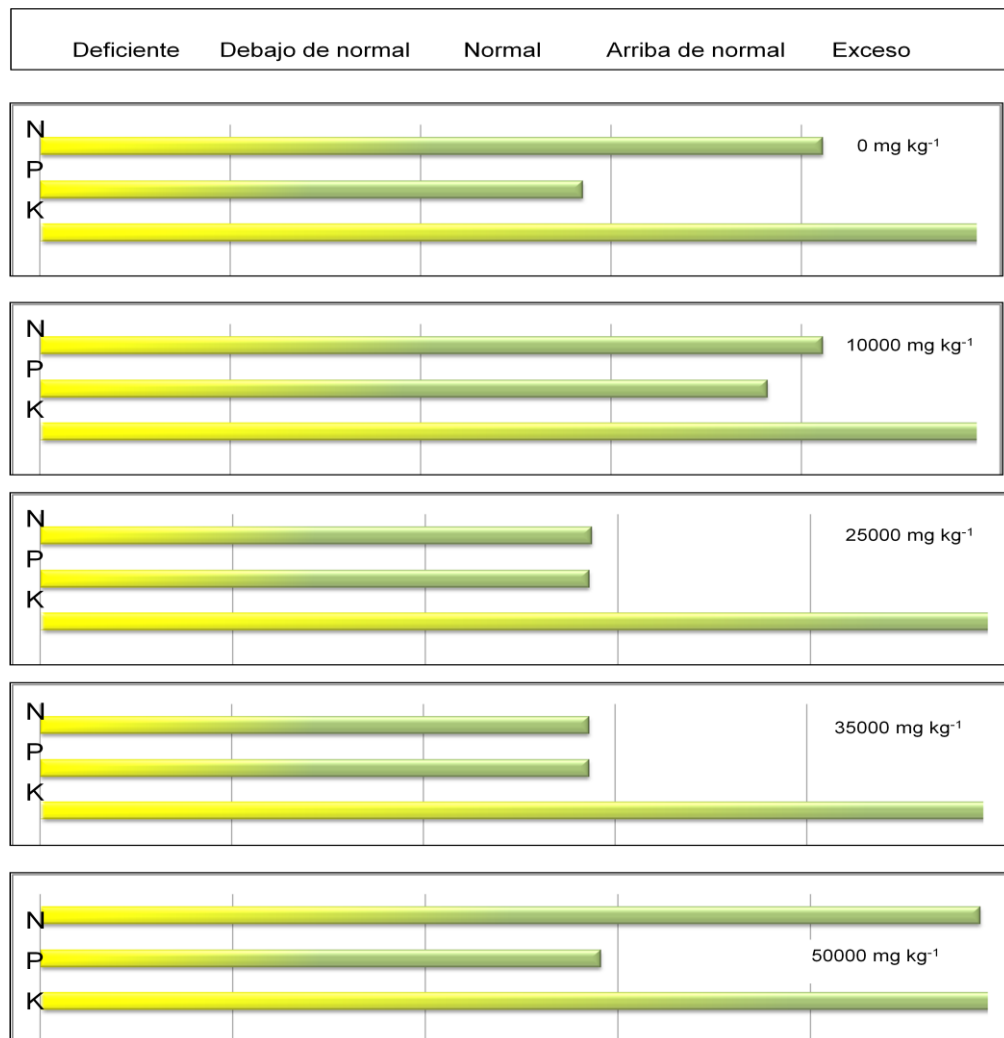


Figura 31. Análisis vegetal de la especie *Leucaena leucocephala* en las cinco concentraciones de petróleo crudo evaluadas.

5. REMOCIÓN DE HIDROCARBUROS

Los resultados obtenidos para el porcentaje de remoción de hidrocarburos, presentan homogeneidad de varianza, y con un valor de 0.801 en la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk.

Los resultados revelan que el grado de contaminación en suelo influye sobre la cantidad de petróleo crudo removido, ya que la mayor remoción ocurrió en la concentración más baja del hidrocarburo ($10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$), teniendo un valor superior a 33% con respecto al porcentaje de remoción más bajo reportado. La presencia de planta en suelo, tuvo diferencias significativas en la remoción de hidrocarburo comparado con el tratamiento sin planta. El tiempo de muestreo presentó diferencias estadísticas significativas, observándose que en general a los 120 días se aumentó en un 67% la remoción con respecto a lo ocurrido a los 60 días.

En la interacción planta*tiempo de muestreo, se observó que la más alta remoción se dio en el tratamiento con leucaena a los 120 días, siendo superior en 55% al tratamiento más bajo que fue en ausencia de planta en el primer muestreo. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo se encontró que la mayor reducción de los hidrocarburos, ocurrió en la concentración de $10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ a los 60 días. Dicho valor fue superior en 61% con respecto al valor más bajo que se dio cuando la concentración de hidrocarburo fue de $35\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ a los 60 días. En la interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, el porcentaje más alto se presentó cuando la concentración de hidrocarburo fue de $10\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ con leucaena, 56% superior comparado con el valor más bajo que se presentó a $35\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ en ausencia de planta (Cuadro 23).

Cuadro 22. Porcentaje de remoción de petróleo crudo en HIDRO=mg kg⁻¹ de petróleo crudo en suelo, PTA=Planta, TPO= Tiempo de muestreo, IPT=Interacción plata*tiempo de muestreo, IHT=Interacción hidrocarburo*tiempo de muestreo, IHP=Interacción hidrocarburo*planta.

EFECTOS SIMPLES						INTERACCIONES DOBLES					
HIDRO***	Media ^z	PTA***	Media	TPO***	Media ^z	IPT***	Media ^z	IHT***	Media ^z	IHP***	Media ^z
10000	31.84 a	S/P	18.77 b	60 D	20.23 b	MU60	25.79 b	1060D	31.59 a	10S/P	22.02 cd
25000	24.81 b	MU	29.74 a	120 D	30.02 a	MU120	32.95 a	10120D	32.08 a	10LE	38.56 a
35000	21.26 c	LE	28.24 a			LE60	20.20 c	2560D	20.61 b	10MU	35.78 a
50000	23.41 bc					LE120	35.27 a	25120D	29.02 a	25S/P	18.42 d
						S/P60	15.72 d	3560D	12.51 c	25LE	27.36 bc
						S/P120	21.83 c	35120D	28.54 a	25MU	28.66 b
								5060D	14.98 c	35S/P	17.10 d
								50120D	30.43 a	35LE	21.39 cd
										35MU	26.63 bc
										50S/P	17.56 d
										50LE	26.76 bc
										50MU	26.75 bc

*, **, ***=p≤0.05, 0.01, 0.001 respectivamente. Z=medias sin una letra en común son estadísticamente diferentes. S/P=Sin Planta, MU=*Mucuna*, LE= *Leucaena*.

En la Figura 32 se observó que a los 60 días el porcentaje de HTP's removidos, está influenciado por la cantidad de petróleo crudo en suelo, ya que conforme aumenta la concentración disminuye el porcentaje de remoción. El porcentaje de petróleo removido del suelo en promedio es de 31.6% para la concentración de 10 000 mg kg⁻¹, 20.6% para 25 000 mg kg⁻¹, 12.9% para 35 000 mg kg⁻¹ y 15.22% para 50 000 mg kg⁻¹, sin presentar diferencias significativas en las últimas dos concentraciones. A los 120 días, se observó que la cantidad de HTP's removidos es muy similar en todas las concentraciones evaluadas, sin presentar diferencias significativas entre ellas. En promedio, el porcentaje de reducción fue de: 32% para 10 000 mg kg⁻¹, 29% para 25 000 mg kg⁻¹ 28.5% para 35 000 mg kg⁻¹ y 30.4 % para 50 000 mg kg⁻¹. También se pudo observar que al pasar de los 60 a los 120 días la remoción de HTP's para mucuna aumentó en 18% a 10 000 mg kg⁻¹, 28.5% a 25 000 mg kg⁻¹, 45% a 35 000 mg kg⁻¹, y 48.8% a 50 000 mg kg⁻¹. Para leucaena la reducción fue de 25.3, 32.3,

61.8 y 51%, mientras que la reducción para el tratamiento sin planta fue de 10, 24.5, 45 y 51.3% a las mismas concentraciones.

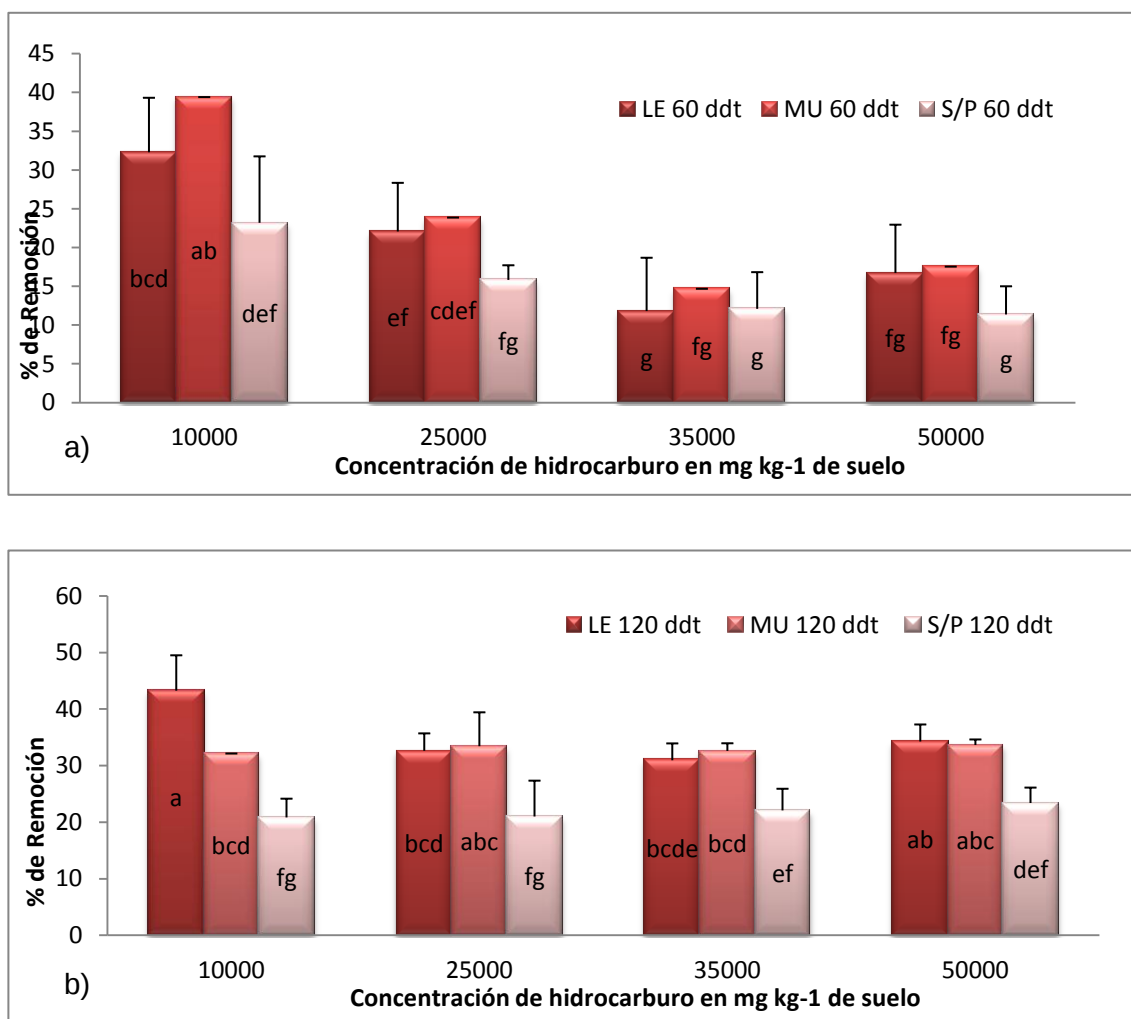


Figura 32. Porcentaje de remoción de petróleo crudo a las distintas concentraciones de hidrocarburo evaluadas y bajo el efecto de presencia o ausencia de planta (*Mucuna pruriens* y *Leucaena leucocephala*) a los 60 (a) y 120 (b) días.

La reducción de hidrocarburos a los 60 días fue superior para la especie mucuna con respecto a el testigo sin planta en 16.21% para la concentración de 10 000 mg kg⁻¹, 8.04% para 25 000 mg kg⁻¹, 3% para 35 000 mg kg⁻¹, y 6.2 % para 50 000 mg kg⁻¹ (Figura 32). En leucaena la reducción con respecto al testigo fue de 9.1, 6.25, 0.2 y 5.35 % a las mismas concentraciones. A los 120 días el comportamiento con respecto al tratamiento sin planta presentó para

mucuna una reducción de 11.3% en 10 000 mg kg⁻¹, 12.43% en 25 000 mg kg⁻¹, 10.51% en 35 000 mg kg⁻¹, y 10.25 % en 50 000 mg kg⁻¹; mientras que para leucaena la reducción de los HTP's con respecto al testigo sin planta fue de 22.4, 11.6, 8.9 y 10.9% en las mismas concentraciones.

Xiao *et al.* (2015) encontraron que *Medicago sativa* es una especie que logró remover hasta un 43% de los hidrocarburos aromáticos policíclicos en suelo a los 60 días y un 87% a los 120 días. La diferencia se debe a que en la presente investigación, se cuantificaron los hidrocarburos totales, y no solo a los aromáticos, o bien puede ser a causa del tipo de suelo en el que se desarrollaron las especies. Ortínez *et al.* (2003) mencionan que el componente más importante del suelo en relación con la persistencia de sustancias tóxicas es la arcilla. La persistencia aumenta cuanto más pequeñas son las partículas, debido a que aportan un área superficial mayor para la adsorción de los productos químicos. Y la presente investigación está hecha en un suelo con cantidad de arcilla (63%).

Afzal *et al.* (2013) publicaron que el suelo plantado con raygras presentó 14% más degradación que el suelo que no tuvo planta, valor similar a lo que se reporta en esta investigación.

Bramley *et al.* (2014) mostraron que a los 60 días, la concentración de hidrocarburo en suelo se redujo en 35% a 1 000 mg kg⁻¹, 39% en 5 000 mg kg⁻¹ y 41% en 10 000 mg kg⁻¹ con la influencia de *Poa foliosa*, mientras que a los 120 días la remoción fue de 41, 45 y 48% a las mismas concentraciones. Los resultados en la presente investigación, mostraron que a 10 000 mg kg⁻¹, mucuna redujo 39.4 % y leucaena redujo 33.3 %, remoción menor a lo que redujo *P. foliosa*. Esto probablemente se debe a que *P. foliosa* es una gramínea, y está clasificada como más competente para remover hidrocarburos del suelo (Hernández y Mager, 2003; San Gabriel *et al.*, 2006; Petenello y Feldman, 2012). Sin embargo las especies empleadas en la presente

investigación mostraron un excelente comportamiento comparado con otras especies de su familia.

Peng *et al.* (2009), encontraron que *Mirabilis jalapa* redujo de 41.6 a 63.2% del hidrocarburo en suelo a diferentes concentraciones estudiadas, mientras que en el testigo sin planta, la reducción fue de 19.1 a 39.9% a los 60 y 120 días que duró el experimento. En la presente investigación la disminución en el tratamiento sin planta fue de 15.6% a los 60 días y 21.8 % a los 120 días.

Meng *et al.* (2011) observaron que el porcentaje de remediación con cultivo de raygras fue de 45%, mientras que en el testigo se redujo 30% a concentraciones inferiores a los 20 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo. En la presente investigación a 10 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburo, se encontró que mucuna redujo 32%, leucaena el 43% del hidrocarburo en suelo, y 20% en el testigo. Los resultados presentados fueron muy parecidos, lo que prueba que las especies en estudio son altamente competentes, ya que tienen casi la misma capacidad para remover hidrocarburos que lo que presentó raygras, que es una de las especies más estudiadas y usadas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

En un estudio similar al presente, Maldonado *et al.* (2010) encontraron que después de 158 días de permanecer el suelo sin planta, se degradó el 16% del petróleo crudo presente en suelo, mientras que con fitorremediación con pasto Egipto, el 37% y con leucaena el 20%. En la presente investigación se encontró que leucaena redujo 43% a los 120 días. Por otra parte, Morales (2007), encontró que *Oriza sativa* degradó solo un 13% a concentración de petróleo crudo de 30 000 mg kg⁻¹. Encontrando diferencias sin significancia a distintas concentraciones de hidrocarburo en suelos con presencia y ausencia de planta.

Parrish *et al.* (2005) encontraron que se redujeron significativamente los hidrocarburos recalcitrantes en suelos con presencia de planta en comparación a sin planta en un experimento evaluado hasta los doce meses. Esto se puede

observar también en la presente investigación, en dónde a los 120 días se redujeron los hidrocarburos más recalcitrantes, que no se lograron remover a los 60 días. Nuestras observaciones son el resultado del efecto simple de la fitorremediación, pero si se quisiera aumentar la cantidad de HTP's removidos, se puede remover el suelo antes de sembrar las especies en cuestión (land farming), fertilizar (bioestimulación), y/o incluso inocular las semillas o los suelos con bacterias identificadas como degradadoras de hidrocarburos (bioaumentación). Al respecto Huang *et al.* (2005), encontraron que el uso combinado de varios procesos de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos es más eficiente que utilizar una sola técnica, ya que al usar land farming más fitorremediación, se redujo de un 80 a 90% del hidrocarburo, mientras que con la sola fitorremediación, la reducción fue del 40%.

Zavala *et al.* (2005) mencionan que se redujeron en un 48% los HTP's después de cultivar por 3.5 meses a los pastos Humidicola (*Brachiaria humidicola*), Alemán (*Echinochloa polystachya*) y Egipto (*Brachiaria mutica*), a concentraciones de hidrocarburo de 7 500 a 15 000 mg kg⁻¹. Los resultados son superiores a los que se encontraron en la presente investigación, donde mucuna redujo 44% de los hidrocarburos en concentración de 10 000 mg kg⁻¹ y leucaena 33% a la misma concentración de petróleo crudo a los 120 días de establecido el experimento.

CONCLUSIONES

Las pruebas de germinación clasifican al petróleo crudo utilizado en la investigación como: prácticamente atóxico para mucuna y leucaena. La especie que mostró los valores más altos en altura de planta, área foliar, biomasa aérea, biomasa total, biomasa de raíz, longitud de raíz y volumen radicular fue mucuna. La especie que presentó nódulos rizosféricos a concentraciones más altas de hidrocarburo fue leucaena.

La presencia de planta en suelo, aumentó el pH y CE. La MO en suelo, aumentó con la especie leucaena. El N y P no presentaron diferencias absolutas con la presencia de las plantas en suelo. El K y CIC disminuyeron con la presencia de ambas especies.

La capacidad de mucuna y Leucena para remover los hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) en suelo disminuye conforme se aumenta la concentración de petróleo crudo. En promedio a los 60 días después de trasplante, mucuna degrada 26% de los HTP's en suelo y leucaena 20%, mientras que a los 120 días mucuna remueve 33% y leucaena 35% de los HTP's en suelo.

Mucuna y leucaena toleran la presencia de petróleo crudo en suelo, ya que se desarrollan en todas las concentraciones bajo estudio. El crecimiento vegetativo de las especies, se vio afectado negativamente por la presencia de petróleo crudo en suelo y no tuvo relación con la reducción de hidrocarburos en el suelo. La reducción de los HTP's por parte de las especies fue baja con respecto a lo que se dio por el solo efecto de los factores físicos y biológicos en suelo. La química del suelo estuvo relacionada con la de la planta, y se vio afectada por la presencia de petróleo crudo en suelo.

LITERATURA CITADA

- Adams S., R.H., V.I. Domínguez R. and N. Vinalay C. 2002. Evaluation of microbial respiration and ecotoxicity in contaminated soils representative of the petroleum-producing region of southeastern México. *Terra Latinoamerica*. 20:253-265.
- Adebowale Y.A., A. Adeyemi and A.A. Oshodi. 2005. Variability in the physicochemical, nutritional and antinutritional attributes of six *Mucuna* species. *Food Chemistry*. 89:37-48.
- Afzai M., S. Kan, S. Iqbal, M. Sajjad M. and K.M. Kan. 2013. Inoculation method affects colonization and activity of *Burkholderia phytofiemans* PsJN during phytoremediation of diesel-contaminated soil. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 85:331-336
- Alkorta, I. and C. Garbisu. 2011. Review paper phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*. 79:273-276.
- Andrade M.,L., E. Covelo F., F. Vega A. and P. Marcet. 2004. Effect of the Prestige Oil spill on salt marsh soils on the coast of Galicia (Northwestern Spain). *Journ. Environ. Qual.* 33: 2103 – 2110.
- Avila O., J.L. 1998. El Suelo como Elemento Ambiental. Perspectiva Territorial y Urbanística. Universidad de Deusto. Bilbao, España. 319 p.
- Banks M.K., R.S. Govindaraju, A.P. Schwab and P. Kulakow. 2000. Part 1: Field Demonstration. In: *Phytoremediation Of Hydrocarbon- Contaminated Soil*, pp 3-88. (Fiorenza, S., Oubre, C.L. and Ward, C.H. Eds). Baton Rouge, LA, Lewis Publishers
- Benavides L.de M., J., G. Quintero, A.L. Guevara V., D.C. Jaimes C., S.M. Gutiérrez R. y J. Miranda G. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con derivados del petróleo. *Nova Publicación Científica*. 4(5):82-90.
- Bramley A., J., J. Wasley, C.K. King and S. Powell. 2014. Phytoremediation of hydrocarbon contaminants in subantarctic soils: An effective management option. *Journal Environmental Management*. 142:60-69.
- Bruner B., J. Beaver and L. Flores. 2011. *Mucuna*. Hoja informativa. Proyecto de Agricultura orgánica. Departamento de Cultivos y Ciencias Agroambientales. Estación Experimental Agrícola de Lajas. Puerto Rico. 5 p.

- Carpena R.O. y M.P. Bernal. 2007. Claves de la fitorremediación: fitotecnologías para la recuperación de suelos. *Ecosistemas*. 16(2):1-3. Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/articulo.asp?id=490>
- Castillo R., F., M.D. Roldán R., R. Blasco P., M.J. Huertas R., F.J. Caballero D., C. Moreno V. y M. Martínez L.R. 2005. *Biotecnología Ambiental*. Editorial Tebar, S.L. Madrid. Pp. 401-446
- Cerutti A.A. 2001 La refinación del petróleo. Instituto Argentino del Petróleo y del Gas. Argentina. Tomo I. pp. 1-127
- Chikagwa S.K., A.T. Adesogan, L.E. Sollenberg, L.K. Badinga, N.J. Szabo and R.C. Littell. 2009. Nutritional Characterization of *Mucuna pruriens* 1. Effect of maturity on the nutritional quality of botanical fractions and the whole plant. *Animal Feed Science and Technology*. 148:34-50.
- Contreras A., P.A. 2005. Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto. Tesis de Licenciatura. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile. 75 p.
- Cuevas D., M.C., J.L. Rosaldo S y J. López L. 2012. Métodos Ectotoxicológicos para la Evaluación de Suelos Contaminados con Hidrocarburos. Capítulo 3. Instituto Nacional de Ecología. Pp. 87-105.
- Cunningham S., D., A.T. Anderson, Schwab A.P. and F.C. Hsu. 1996. Phytoremediation of oil contaminated with organic pollutant. *Adv. Agron.* 56:55-114.
- Díaz M., M.E. 2012. *Casuarina equisetifolia* en la fitorremediación de suelo contaminado con diesel y la aplicación de bioestimulación y bioaumentación. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 123 p.
- Dietz Annette C. and Schnoor Jerald L. 2001. Advances in phytoremediation. *Environmental Health Perspectives*. 109:163-168.
- Escalante E., E., M.E. Gallegos M., E. Favela T. and M. Gutierrez R. 2004. Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere* 59: 405-413.
- Fernández L., L.C., N.G. Rojas A., T.G. Roldán G., M.E. Ramírez I., H.G. Zegarra M., R. Uribe H., R.J. Reyes A., D. Flores H. y J.M. Arce O. 2006.

Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. SEMARNAT, INE, IMP. México.184 p.

- Ferrera C., R., A. Alarcón M., L. Mendoza, W. Sangabriel, D. Trejo A., S. Cruz S., C. López O. y J. Delgadillo M. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo utilizando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia* 41: 817-826.
- Ferrera C., R., A.N. Rojas, M. Poggi V., A. Alarcón y R. Cañizares V. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 48:179-187.
- Foster J. 1995. Soil nitrogen. En Alef, K. and Nannipieri, P. (Eds.). *Methods in applied soil microbiology and biochemistry*. Academic Press. 169 pp.
- Fraume R., N.J. 2007. *Diccionario ambiental*. Ecoe Ediciones. Bogotá. 445 p.
- Frick, C. M., R. E. Farrell y J. J. Germida. 1999. Assessment of Phytoremediation as an in situ Technique for Cleaning Oil-Contaminated Sites. *Petroleum Technology Alliance of Canada*. Vancouver, British Columbia. 82 p.
- Gallegos M., M. G., A.G. Gomez S., L.G. Gonzalez C., M.A. Montes de Oca G., M. A., Y. Trujillo L., J.A. Zermeno E. and M. Gutierrez R. 2000. Diagnostics and resulting approaches to restore petroleum-contaminated soil in a Mexican tropical swamp. *Water Sci. Technol.* 42:377-384
- García A., E. 1985. *Nomenclatura de Hidrocarburos Policíclicos Fusionados*. Universidad de Murcia. Secretariado de publicaciones e intercambio científico. Madrid. Pp. 24-63.
- García G.W., T.U. Ferguson, F.A. NEckles and K.A.E. Archibald. 1996. The nutritive value and forage productivity of *Leucaena leucocephala*. *Animal Feed Science and Technology*. 60: 29-41.
- Gerhardt, K.E., X. Huang, B.R. Glick, and B.M. 2009. Greenberg. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176:20-30.
- Gonzáles P., M. 2009. *Biorremediación y Tratamiento de Efluentes*. El Cid editor. Argentina. 23 p.

- Gutierrez C. Ma.del Carmen y J. Zavala C. 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. Terra Latinoamérica. Universidaad Autónoma Chapingo. 20(02):101-111.
- Hemalatha S. and P. Veeramanikandan. 2011.Characterization of aromatic hydrocarbon degrading bacteria from petroleum contaminated sites.
- Hernández A., E. 2002. La rizosfera de plantas gramíneas y leguminosas en la fitorremediación de suelos contaminados por petróleo. Tesis de doctorado. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo Edo. México. 267 p.
- Hernández H., R.E. 2011. Percepción y caracterización del uso de leucaena (*Leucaena leucocephala*) establecida como banco de proteína como estrategia de intensificación. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma de Chiapas. Facultad de Ciencias Agrícolas. Chiapas, México. 98 p.
- Hernández V., I., y Mager D. 2003. Uso de *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. Bioagro. 15:149-155.
- Hou, F.S. M.W. Milke., D.W. Leung y D.L. Macpherson. 2001. Variations in phytoremediation performance with diesel-contaminated soil. Environmental Technology 22:215-222
- Huang X.D., Y. El-Alawi, D.M. Penrose, B.R. Glick and B.M. Greenberg. 2003. A multi-process phytoremediation system for removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from contaminated soils. Environmental Pollution. 130(1):465-473.
- Huang X.D., Y. El-Alawi, J. Gurska, B.R. Glick and B.M. Greenberg. 2005. A multi-process phytoremediation system for decontamination of persistent total hydrocarbons (TPHs) from soils. Microchemical journal. 81:139-147.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks y A.P. Schwab 2001. Phytoremediation of aged petroleum sludge: effect of inorganic fertilizer. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
- INEGI. 2007. Dirección de Estadísticas del Medio Ambiente con base en: condición de suelo por entidad federativa.
- Kambashi B., P. Picron, C. Boudry, A. Théwis, H. Kiatoko and J. Bindelle. 2014. Nutritive value of tropical forage plants fed to pigs in the Western provinces of the Democratic Republic of the Congo. Animal Feed Science and Technology. 191:47-56

- Labud V., C. García and T. Hernández. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial proprieties of sandy and a clay soil. *Chemosphere*. 63(10):1863-1871
- Liang Y., X. Zhang, J. Wang an G. Li. 2012. Espatial variations of hydrocarbon contamination and soil properties in oil exploring fields across China. *Journal of Hazardous Materials*. 241:371-378.
- Maldonado C., E., MC Rivera C., F. Izquierdo R. y DJ Palma L. 2010. Efecto de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia Trópico Humedo*. 26(2):121-136.
- Martínez M. V. E., López S. F.; 2000.- Efecto de Hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de Suelo Arcilloso. Instituto Mexicano del Petróleo, Laboratorio de Remediación de Suelos. Distrito Federal. México.
- Martínez M., V.E. y F. López S. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra Latinoamérica*. Universidad Autónoma Chapingo. 19:9-17.
- Mc Cain William D. 1999. *Properties of Petroleum Fluids*. Pennwell Corp. K. Novel. USA. Segunda edición. Capitulo 1. pp 1-43.
- McGrath, S. P, Lombi, E., Zhao, F. J., y Dunham, S. J. 2001. Phytoremediation of heavy metal-contaminated soils: natural hyperaccumulation versus chemically enhanced phytoextraction. *Journal of Environmental Quality* 30 (6): 1919-1926.
- Meng, L., M. Quiao and H.P. Arp. 2011. Phytoremediation efficiency of a PAH-contaminated industrial soil using ryegrass, white clover, and celery as mono- and mixed cultures. *Journal Soils Sediments* 11:482-490.
- Merkl, A., Schultze-Kraft R. and Infante C. 2004. Phytoremediation in the tropics-the effect of the crude oil on the growth of tropical plants. *Bioremediation Journal*. 8(3-4):177.184.
- Morales G., G. 2007. La fitorremediación de suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de la planta de arroz (*Oriza sativa*). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Cardenas, Tabasco. 84 p.
- Newbery J. y J. Thierry. 2007. El petróleo. Colección Los Raros. Biblioteca Nacional. Buenos Aires. Pp. 9-111.

- Nie M., Y. Wang, J. Yu, M. Xiao, L. Jiang, J. Yang, C. Fang, J. Chen and B. Li. 2011. Understanding plant-microbe for phytoremediation of petroleum-polluted soil. Plos One. 6(3):1-9.
- Njoku K., L., O. Akinola M. and B. Oboh O. 2009. Phytoremediation of crude oil contaminated soil: the effect of Growth of *Glycine max* on the physico-chemistry and crude oil contents of soil. Nature and science 7 (10): 79-87
- NORMA Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. DOF. 31 de diciembre de 2002.
- NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. 2012. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Segunda edición. DOF. Martes 10 de septiembre de 2013.
- Olson, P.E., A. Castro, M. Joern, N. M. DuTeau, E. Pilon-Smits, and K.F. Reardon. 2008. Effects of agronomic practices on phytoremediation of an aged PAH-Contaminated soil. Journal Environmental Quality. 37:1439–1446
- Ortínez B., O., I. Eze L. y A. Gavilán G. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. Gaceta Ecológica. Instituto Nacional de Ecología. Distrito Federal, México. Num. 06. pp. 83-92.
- Ortiz H., G., R. Trejo C., R.D. Valdez C., J.G. Arreola A., H.G. Flores y B. López A. 2009. Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando quelite (*Amaranthus hybridus* L.) y micorrizas. Revista Chapingo Serie Horticultura. 15:161-168.
- Parrish Z.D., M.K. Banks and A.P. Schwab. 2005. Assessment of contaminant lability during phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon impactec soil. Enviromental Pollution. 137(2):187-197.
- Pascual-S Izquiero Raquel y Vengas Yuste Sara. 2008. La materia orgánica del suelo, papel de los microorganismos. 11 p.
- Peng S., Q. Zhou, Z. Cai and Z. Zhang. (2009). Phytoremediation of petroleum contaminated soils by *Mirabilis jalapa* in a grenhouse plot experiment. Journal of azardous Materials. 168:1490-1496.
- Pérez G., C., R. Iturbide A. y R.M. Flores S. 2006. Cambio en las propiedades físicas de un suelo contaminado con hidrocarburos debido a la aplicación

de una tecnología de remediación. AIDIS de Ingeniería y Ciencias Ambientales: Investigación, desarrollo y práctica. UNAM. 1:1-10.

Petenello M.C. y S.R. Feldman. 2012. Evaluación de tolerancia a suelos contaminados con aceite diesel en especies vegetales con potencial biorremediador. Acta biológica colombiana. 17(3):589-598.

Pons J., M. 2010. Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos agrícolas de la cuenca baja del río Tonolá. Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Montecillos, Texcoco, Edo. De México. 80 p.

Ramírez G., A., G. Bautista Z. y R. Iturbide A. 2006. Rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos mediante la aplicación de lodos. Aidis. 1:1-10.

Rivera C., M del C., A. Trujillo N., M.A. Miranda De la C. y E. Maldonado C. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. Interciencia 30(6):326-331.

San Gabriel W., R. Ferrera C., A.D. Trejo, R. Mendoza L., S. Cruz S., C. López O., J. Delgadillo M. y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. Revista internacional de contaminación Ambiental. 22:63-73

Sánchez G., P., V. Volke H., L. Fernández L., R. Rodríguez V., M. del C. Rivera C. y R. Ferrera C. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa Polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. Agrociencia. 38:1-12.

Sanclemente R., O.E. 2009. Efecto del cultivo de cobertura: *Mucuna pruriens*, en algunas propiedades físicas, químicas y biológicas de un suelo Typic Haplustalfs, cultivado con maíz (*Zea mays L.*) en zona de ladera del municipio de Palmira, Valle. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Departamento de Ciencias Agrícolas. Palmira, Colombia. 79 p.

Saval B., S. 1995. Acciones para la Remediación de Suelos en México. Segundo Minisimposio Internacional sobre Contaminantes del Agua y Suelo. Instituto de Ingeniería. UNAM.

SEMARNAT. 2000. Norma Oficial Mexicana. NOM-021-SEMARNAT-2000. Especificaciones de Fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos. Estudios, muestreo y Análisis. Fomento y Normatividad Ambiental de la

Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Segunda edición. 85 p.

SEMARNAT. 2012. Dirección General de Restauración de Sitios Contaminados (DGGIMAR). México. Disponible en: http://www.atl.org.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=790:sistema-nacional-de-informacion-ambiental-y-de-recursos-naturales-sniarn&catid=128:sistema-de-informacion&Itemid=588. Fecha de consulta: Mayo de 2013.

SEMARNAT. 2013. Dirección General de Gestión Integral de Materiales y Actividades riesgosas. México. Disponible en: <http://www.semarnat.gob.mx/temas/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/sitioscontaminados/informacion/Informacion.pdf>. Fecha de consulta: Junio, 2013.

Shelton H.M. and J.L. Brewbaker. 2004. *Leucaena leucocephala*. The most widely forage tree legume. Animal Feed Science and Technology. 141:27-36.

Silos R., J.M. 2008. Manual de Lucha contra la Contaminación por Hidrocarburos. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz. España. pp. 27-35, 306.

Skerman P.J., Cameron, D.G. and F. Riveros. 1991. Tropical Legumes. Roma, FAO. 707 p.

Solanas A.M. 2009. La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona. Barcelona. 9:1-8.

Suresh B. and G.A. Ravishankar. 2004. Phytoremediation. A novel and promising approach for environmental clean-up. Critical Reviews in Biotechnology. 24(2-3): 97-124.

Trujillo N., A., M.C. Rivera C., L.C. Lagunes E., D.J. Palma L., S. Soto S. y G. Ramírez V. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. Rev. In. Contam. Ambie. 28(4):361-374.

US EPA 712-C-96-154. (OPPTS 850.4200). 1996. Seed germination / root elongation toxicity test. Ecological effects test guidelines. Washington DC. 312 p.

Witters, N., R. Mendelsohn, S. Van Pasel, S. Van Slycken, N. Weyens, E. Schreurs, E. Meers, F. Tack, B. Vanheusden and J. Vangronsveld. 2012.

Phytoremediation, a sustainable remediation technology? II: Economic assessment of CO₂ abatement through the use of phytoremediation crops for renewable energy production. *Biomass and bioenergy* 39: 470-477

Xiao N., R. Liu, C. Jin and Y. Dai. 2015. Efficiency of five ornamental plant species in the phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-contaminated soil. *Ecological Engineering*. 75:384-391.

Zárate P., S. 1994. Revisión del género *Leucaena* en México. *Anales Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Ser. Bot.* 65(2):83-162.

Zavala C., J., F. Gavi R., R. Howard A.S., R. Ferrera C., D.J. Palma L., H. Vaquera H. y J.M. Domínguez E. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *TERRA Latinoamericana*. 23(3):293-302.