

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA Y BIOINGENIERÍA

**“Biorremediación de suelos agrícolas contaminados con
plaguicidas e hidrocarburos”**

TESIS

Que presenta

ALEJANDRO ISLAS GARCÍA

Para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE BIOTECNOLOGÍA

Directora de la Tesis: **Refugio Rodríguez Vázquez**

México, D.F.

Diciembre, 2015

AGRADECIMIENTOS

En este espacio y con las siguientes palabras quisiera agradecer a las personas que dieron parte de su tiempo para contribuir con el desarrollo y conclusión de mi proyecto doctoral.

A mi directora de tesis y al comité tutorial por compartir sus comentarios, conocimientos y consejos durante estos años como doctorante.

Al grupo de personas que forman y formaron parte del Laboratorio de Compuestos Xenobióticos del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV, por su apoyo al inicio de mi etapa de doctorado, por su paciencia durante todos estos años y por sus oportunos consejos.

A mis compañeros y ex compañeros de laboratorio por su compañía durante este largo camino y por hacer más amena mi estancia.

A la Comisión Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización del presente trabajo de doctorado.

Al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, por su apoyo para la asistencia a un congreso internacional y apoyo para obtención de grado.

Al personal administrativo del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería por su apoyo, atención y orientación durante mi posgrado.

DEDICATORIA

A mi Familia...

A mis Padres...

A mis Amigos...

Al Tiempo...

A la Ciencia...

Contenido	Página
RESUMEN	i
ABSTRACT.....	ii
INTRODUCCIÓN	1
Plaguicidas en México	1
Persistencia de los plaguicidas.....	2
Degradación y metabolismo de plaguicidas	2
Hidrocarburos en México	3
Persistencia de los hidrocarburos.....	4
Degradación y metabolismo de hidrocarburos	4
Biorremediación de suelos.....	5
Material Orgánico	6
Nutrientes.....	7
Biofertilizantes.....	8
Análisis toxicológicos del suelo	8
Pruebas de fitotoxicidad.....	9
JUSTIFICACION	11
HIPÓTESIS	12
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJETIVOS PARTICULARES	12
Área de estudio	13
Muestro de suelo.....	15
Determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos	15
Método analítico para determinar la concentración de hidrocarburos.....	15
Método analítico para determinar la concentración de plaguicidas.....	16
Método analítico para determinar el CO ₂	17
Condiciones para realizar el estudio de remediación en microcosmos	17
Estudio de remediación en microcosmos.....	17
Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos hidrocarburoclastas y plaguicidaclastas	18
Análisis toxicológicos del suelo contaminado.....	19
Evaluación de toxicidad aguda con <i>Lactuca sativa</i> L.....	19
Evaluación de toxicidad y citotoxicidad con <i>Allium cepa</i> L.	19
Análisis estadístico	20
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
Caracterización inicial del suelo agrícola y su potencial de degradación por biorremediación	21
Diseño experimental para determinar la remoción de los contaminantes orgánicos y el efecto de las variables utilizadas para la biorremediación	22
Producción de CO ₂ a los 20 días de tratamiento	24
Coeficiente Respiratorio a los 20 días de tratamiento	25
Producción de CO ₂ a los 40 días de tratamiento	25
Coeficiente Respiratorio a los 40 días de tratamiento	26
Remoción de HFM e HFP a los 20 días	28
Remoción de HFM e HFP a los 40 días	29
Remoción de Plaguicidas OCs a los 20 días.....	32
Remoción de Plaguicidas OCs a los 40 días.....	33
Efecto de las variables en el diseño experimental Plackett-Burman	37

Optimización de la degradación de hidrocarburos y plaguicida OCs mediante un diseño factorial 2 ² con puntos centrales	41
Producción de CO ₂ a los 20 días de tratamiento.....	42
Producción de CO ₂ a los 40 días de tratamiento.....	42
Remoción de HFM e HFP a los 20 días	43
Remoción de HFM e HFP a los 40 días	44
Remoción de Plaguicidas OCs a los 20 días.....	46
Remoción de Plaguicidas OCs a los 40 días.....	48
Efecto de las variables en el diseño experimental factorial 2 ² con puntos centrales	51
Metabolitos secundarios y mecanismos que afectan la remoción de OCs	54
Comparación de valores máximos de remoción de hidrocarburos y plaguicidas OCs con respecto a otros estudios	56
Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos hidrocarburoclastas y plaguicidaclastas	59
Identificación de la bacteria y levadura	60
Identificación de hongos filamentosos	60
Diseño experimental para la degradación de hidrocarburos y plaguicida organoclorado (endosulfán) por bioaumentación con bacteria y levadura	62
Producción de CO ₂	63
Remoción de HFM	64
Remoción de HFP	66
Remoción de endosulfán.....	67
Diseño experimental para la degradación de hidrocarburos y plaguicida organoclorado (endosulfán) por bioaumentación con hongos filamentosos.....	70
Producción de CO ₂	71
Remoción de HFM	72
Remoción de HFP.....	73
Remoción de endosulfán.....	75
Ensayos de toxicidad de contaminantes orgánicos en suelo.....	78
Evaluación de toxicidad aguda con Lactuca sativa L.....	79
Evaluación de la toxicidad con Allium cepa L.....	80
Evaluación de citotoxicidad con Allium cepa L.....	83
CONCLUSIONES	88
LITERATURA CITADA	90

Índice de Figuras

Página

Figura 1. Ubicación de los poliductos en el Estado de Puebla (PEMEX, 2011a).....	14
Figura 2. Producción de CO ₂ , Concentración de O ₂ y Coeficiente Respiratorio (CR) durante 40 días en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman.	27
Figura 3. Producción total de CO ₂ en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman.....	28
Figura 4. Remoción de HFM en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman.....	30
Figura 5. Remoción de HFP en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett Burman.....	31
Figura 6. Remoción de Plaguicidas (OCs) en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman.....	36
Figura 7. Producción total de CO ₂ en los diferentes tratamientos de suelo. Diseño Factorial para optimización.	43
Figura 8. Remoción de HFM en los diferentes tratamientos. Diseño Factorial para optimización.	45
Figura 9. Remoción de HFP en los diferentes tratamientos. Diseño Factorial para optimización..	45
Figura 10. Remoción de Plaguicidas OCs en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño Factorial para optimización.	50
Figura 11. Fotografía de la bacteria, levadura y hongos aislados de los medios con plaguicidas y/o hidrocarburos de muestras de suelos de Tepeaca, Puebla.....	59
Figura 12. Producción total acumulada de CO ₂ en los diferentes tratamientos con <i>B. pumilus</i> y <i>M. guilliermondii</i>	64
Figura 13. Remoción de HFM en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con <i>B. pumilus</i> y <i>M. guilliermondii</i>	65
Figura 14. Remoción de HFP en diferentes tiempos y diferentes tratamientos <i>B. pumilus</i> y <i>M. guilliermondii</i>	67
Figura 15. Remoción de endosulfán total en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con <i>B. pumilus</i> y <i>M. guilliermondii</i>	68
Figura 16. Producción total acumulada de CO ₂ en los diferentes tratamientos con hongos filamentosos. NE= No Estéril, E= Estéril.	72
Figura 17. Remoción de HFM en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos.	74
Figura 18. Remoción de HFP en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos.	75
Figura 19. Remoción de endosulfán total en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos.	77

Figura 20. Fotografía del crecimiento radicular de cebolla <i>Allium cepa</i> L. expuestas a las diferentes muestras de suelos, controles y suelo de Tepeaca, Puebla	82
Figura 21. Fases mitóticas en ápices radiculares de cebolla <i>Allium cepa</i> L. expuestas a las diferentes muestras de suelos, controles y suelo de Tepeaca, Puebla	85
Figura 22. Aberraciones mitóticas en ápices radiculares de cebolla <i>Allium cepa</i> L. expuestas a fenantreno, DDT y muestra de suelo de Tepeaca, Puebla	87

Índice de Tablas

Página

Tabla 1. Cultivos principales producidos en Tepeaca, Puebla	14
Tabla 2. Plaguicidas utilizados en cultivos de Tepeaca, Puebla	15
Tabla 3. Variables naturales y codificadas del diseño Plackett-Burman para determinar su efecto en la remoción de HFM, HFP y OCs, en el suelo agrícola de Tepeaca, Puebla.	23
Tabla 4. Efecto de las variables en la remoción de HFM, HFP y OCs en el suelo agrícola, obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman	38
Tabla 5. Modelos para la remoción de hidrocarburos y plaguicidas para las diferentes variables del diseño Plackett-Burman.	40
Tabla 6. Variables fijas establecidas para diseño factorial 2^2	41
Tabla 7. Matriz experimental para obtener el modelo del primer orden con las variables ξ_1 =Humedad (%CC) y ξ_2 =(NH ₄) ₂ SO ₄ (C:N).....	42
Tabla 8. Efecto de las variables Humedad y (NH ₄) ₂ SO ₄ en la remoción de HFM, HFP y OCs en el suelo agrícola, obtenidos del diseño factorial 2^2 con puntos centrales	53
Tabla 9. Modelos para la remoción de hidrocarburos y plaguicidas para las variables Humedad y (NH ₄) ₂ SO ₄ del diseño factorial 2^2 con puntos centrales.....	53
Tabla 10. Remoción máxima en estudios de degradación de hidrocarburos en suelo	57
Tabla 11. Remoción máxima en estudios de degradación de plaguicidas OCs en suelo ..	57
Tabla 12. Matriz experimental para la biorremediación del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla mediante bacteria y levadura.	63
Tabla 13. Matriz experimental para la micorremediación del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla mediante hongos filamentosos.	70
Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de las muestras del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla y controles negativos de las pruebas de toxicidad.....	78
Tabla 15. Valores promedio de la evaluación de fitotoxicidad con <i>Lactuca sativa</i> L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles	80
Tabla 16. Valores promedio de la evaluación de fitotoxicidad con <i>Allium cepa</i> L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles	81
Tabla 17. Porcentaje de células en cada fase mitótica en ápices de <i>Allium cepa</i> L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles	84

RESUMEN

Los suelos agrícolas contaminados por plaguicidas son un riesgo ambiental por acumulación y persistencia de dichos contaminantes. Además, los ductos de hidrocarburos debajo de los suelos agrícolas constituyen una fuente importante de contaminación. El uso de tecnologías como la Biorremediación por Cultivo Sólido con Adición de Granos de Café, permitirá determinar su potencial de aplicación para restaurar suelos agrícolas impactados con ambos tipos de contaminantes. El área investigada está ubicada en el municipio de Tepeaca en el Estado de Puebla. Es una parcela de suelo contaminada con plaguicidas e hidrocarburos. Los principales cultivos en este municipio fueron; alfalfa verde, maíz, col (repollo) y coliflor, por lo que los plaguicidas se han utilizado ampliamente en éstos productos agrícolas. La presencia de hidrocarburos se debe a un derrame de petróleo ocurrido en octubre de 2010, provocado por la ruptura de un oleoducto que se encuentra por debajo de las zonas de cultivo.

El objetivo principal de la investigación fue determinar la degradación de plaguicidas e hidrocarburos durante un proceso de biorremediación a través de un sistema de tratamiento combinado de cultivo sólido-bioestimulación. Este proyecto se realizó en tres etapas: Etapa I, se efectuó la caracterización fisicoquímica y biológica del suelo contaminado, la cuantificación y caracterización de hidrocarburos y plaguicidas en el sitio; Etapa II, se realizaron las pruebas de tratabilidad a nivel microcosmos para determinar la degradación de los contaminantes, aislamiento e identificación de microorganismos tolerantes a los contaminantes orgánicos del suelo; Etapa III, optimización y evaluación de la eficiencia del proceso de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación y pruebas de la toxicidad en el suelo por plaguicidas e hidrocarburos, biorremediación por los microorganismos aislados del suelo contaminado.

El proceso de Cultivo Sólido se aplicó en microcosmos mediante un diseño experimental Plackett-Burman, en el cual se determinó el efecto de 11 condiciones de cultivo: nutrientes, agua, material orgánico y biofertilizantes en la remoción de Hidrocarburos Fracción Media (HFM) e Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) y plaguicidas organoclorados (OCs), para posteriormente optimizar el proceso mediante un diseño factorial. La concentración inicial de HFM (26,500 ppm), HFP (19,600 ppm) y plaguicidas organoclorados (5 ppm) disminuyó al aplicar los tratamientos y no se observó un efecto inhibitorio en la remoción de ambos contaminantes. La tecnología de Cultivo Sólido utilizando granos de café, biofertilizantes y otras variables seleccionadas, favoreció la biodegradación de plaguicidas e hidrocarburos. Estos resultados indican el potencial de esta tecnología verde como alternativa para la biorremediación de suelos a nivel de campo.

En las pruebas de fitotoxicidad se observó que las muestras con mayor contaminación de hidrocarburos y OCs presentaron un mayor efecto en la germinación, crecimiento radicular e índice de germinación para la semilla de lechuga, en comparación con las otras muestras que presentaban una menor concentración de contaminantes. De igual forma, en las pruebas de citotoxicidad las muestras con mayor contaminación evitaron la división celular y crecimiento de las raíces de cebolla, además se observaron aberraciones mitóticas en las células apicales de las raíces de cebolla expuestas a suelo contaminado.

ABSTRACT

Agricultural pesticide contaminated soils are an environmental and health risk due to the accumulation and persistence of those pollutants. In addition, oil pipelines under agricultural soils are a major source of pollution. The use of technologies such as, Bioremediation by Solid Culture with Addition of Coffee Beans will determine its potential application for the restoration of agricultural soils impacted with both types of pollutants. The investigated area is located in the municipality of Tepeaca in the State of Puebla. It is a plot of soil contaminated with pesticides and hydrocarbons. The main crops in this municipality were; green alfalfa, corn, cabbage (cabbage) and cauliflower, so that pesticides have been widely used in these agricultural products. The presence of hydrocarbons is due to an oil spill occurred in October 2010, caused by the rupture of a pipeline that is under crop areas.

The main objective of the investigation was to determine the degradation of pesticides and hydrocarbons, for the bioremediation process through a combined system of solid-biostimulation treatment of soil. This project was implemented in three phases: Phase I, the physicochemical and biological characterization of contaminated soil was made, quantification and characterization of hydrocarbons and pesticides on the site; Stage II, treatability tests were performed at microcosm level, to determine the degradation of pollutants, isolation and identification of tolerant microorganisms organic soil contaminants; Stage III, optimization and evaluation of the efficiency of bioremediation process by biostimulation-cultivation in solid culture, evidence of toxicity in the soil by pesticides and hydrocarbons, bioremediation by microorganisms isolated from contaminated soil.

The solid culture process was applied in microcosm through a Plackett-Burman experimental design, where the effect of 11 culture conditions was determined: nutrients, water, organic material and biofertilizers in removing Middle Hydrocarbons Fraction (MHF) and Heavy Hydrocarbons Fraction (HHF) and organochlorine pesticides (OCs), to further optimize the process using a factorial design. The initial concentration of HFM (26,500 ppm), HFP (19,600 ppm) and organochlorine pesticides (5 ppm) decreased to apply the different treatments and no inhibitory effect on the removal of both pollutants was observed. Solid culture technology using coffee beans, bio-fertilizers and other selected variables favored the biodegradation of pesticides and hydrocarbons. These results indicate the potential of this green technology as an alternative to the bioremediation of soils at field level.

In the phytotoxicity tests it shows that the samples with higher concentrations of hydrocarbons and OCs had a greater effect on the germination, root growth and germination rate for lettuce seed, compared with other samples that had a lower concentration of contaminants. Similarly, in tests of cytotoxicity was observed that samples with higher contamination prevented cell division and growth of onion roots also were observed mitotic aberrations in the apical cells of the onion roots exposed to contaminated soil.

INTRODUCCIÓN

Plaguicidas en México

En México la aplicación de plaguicidas sintéticos inició en los años cincuenta, particularmente en 1959 comenzaron a producirse los plaguicidas organoclorados (OCs), DDT [1,1,1-tricloro-2,2-bis(4-clorofenil) etano] y HCB (González-Farías, 2003). Para los años sesenta se importaban cerca de 125 tipos de plaguicidas que se distribuyeron a varias regiones de México (Restrepo, 1988). El uso de plaguicidas ha aumentado casi exponencialmente, en el periodo de 1959 a 1969 se utilizaban cerca de 9,000 toneladas/año y para 1995 se estima que se usaron cerca de 115,000 toneladas/año (González-Farías, 2003). Los plaguicidas de mayor uso son los insecticidas, con alrededor del 37%, seguido de los fungicidas con 27%, los herbicidas con 26% y otros con diversas actividades con un 3%. La mayoría de los plaguicidas se utilizan en actividades de agricultura y campañas de sanidad, y en menor proporción en actividades industriales, jardinería y uso doméstico (González-Farías, 2003).

En 1988, con la participación de instituciones gubernamentales diversas, se creó en México la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICOPLAFEST), que actualmente se encarga de controlar la importación, producción, formulación, comercialización y transportación de las sustancias mencionadas, así como definir su uso. De acuerdo al Catálogo Oficial de Plaguicidas 2004, publicado por la CICOPLAFEST (2004), en México están permitido el uso de 306 plaguicidas, de éstos 11 son de uso restringido (aldicarb, γ -HCH (lindano), DDT, metoxicloro, mevinfos y paraquat, entre otros) y 20 plaguicidas están totalmente prohibidos (por ejemplo; aldrín, cianofos, cloranil, dialifor, dieldrín y endrín). El DDT, por su alto riesgo para la salud humana, su elevada persistencia y sus propiedades de bioacumulación, podrá ser utilizado exclusivamente por la Secretaria de Salud (SSA) en campañas sanitarias. En general, los plaguicidas OCs están prohibidos o restringidos para el uso agrícola, excepto el dienoclor, cuyo uso está permitido por la CICOPLAFEST (2004) para los cultivos de flores ornamentales como azalea, clavel, crisantemo, gardenia, gladiola y rosal, y el endosulfán, cuyo uso estaba permitido por la CICOPLAFEST (2004) para los cultivos de caña de azúcar, tabaco, tomate de cáscara, trigo, sandía, entre otros, hasta el 2014.

Persistencia de los plaguicidas

La persistencia de una molécula de plaguicida en el ambiente está determinada por su estructura química y las características físicas, químicas y biológicas del medio en el cual esté localizada (Barbash, 2005). La persistencia de los plaguicidas varía en función del medio, ésta se incrementa en el orden siguiente: **atmósfera < aguas superficiales < suelos < sedimentos acuáticos**. Esto debido a diversas circunstancias como: a) Las reacciones químicas en el agua, que son generalmente más lentas que en el aire; b) Los plaguicidas en sedimentos acuáticos y suelo se exponen a menos luz solar que en la atmósfera y el agua superficial; y c) Los plaguicidas adsorbidos a los sedimentos acuáticos y a los suelos, que son a menudo menos accesibles para la biotransformación comparados con la fase acuosa (Barbash, 2005).

Degradación y metabolismo de plaguicidas

La transformación y degradación estructural de los plaguicidas puede ser por procesos abióticos, tales como reacciones térmicas, químicas y fotoquímicas o por procesos bióticos, como el metabolismo de los microorganismos, plantas o animales (Plimmer, 2001).

Cuando los plaguicidas se liberan al ambiente, los primeros procesos de transformación son los fotoquímicos o térmicos, los cuales dependen de la energía solar (Barbash, 2005). Posterior a estos procesos se degradan por hidrólisis mediante reacciones químicas influenciadas por el pH del medio. La principal degradación de estos compuestos es por la actividad microbiológica, esto debido a que existe una gran abundancia y diversidad de microorganismos en el ambiente que modifican a estos compuestos mediante reacciones de óxido-reducción y a través de enzimas como las hidrolasas y amilasas (Albert y Benítez, 1996; Plimmer, 2001). La degradación de los plaguicidas por los microorganismos se conoce como biotransformación (Hodgson y Levi, 2001). Los microorganismos degradadores de plaguicidas más importantes pertenecen a los siguientes géneros: *Alcaligenes*, *Aspergillus*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Fusarium*, *Penicillium* y *Phanerochaete* (Stenersen, 2004).

En general los metabolitos producidos son menos tóxicos, más solubles y más fácilmente excretados que sus compuestos precursores. Sin embargo, en algunos casos la degradación abiótica y biótica de los plaguicidas genera compuestos con estructura química diferente al

compuesto inicial y que tienen mayor toxicidad y estabilidad en el ambiente. Cuando la biotransformación resulta en un producto más tóxico y más estable se le conoce como “síntesis letal” (Hodgson y Levi, 2001).

La degradación microbiana de los plaguicidas se modifica por factores diversos, pero la estructura química de estos compuestos y los factores ambientales son de los más importantes. A continuación se mencionan algunas de estas características estructurales y factores ambientales que afectan esta degradación, de acuerdo a Stenersen (2004):

- Los plaguicidas fuertemente adsorbidos en el suelo y sedimento tienen una degradación microbiológica reducida.
- Los compuestos con un estado alto de oxidación, tales como los compuestos clorados, son refractarios a otra oxidación, por lo tanto son degradados anaeróbicamente.
- Las sustancias con toxicidad alta para los microorganismos no son fácilmente degradadas.
- Las temperaturas altas incrementan la tasa de degradación de plaguicidas, esto debido a que estos compuestos son más solubles y menos adsorbidos por las partículas coloides y estarán más disponibles para los organismos, además el número de microorganismo y su actividad metabólica se incrementa.
- La humedad del suelo influye fuertemente en la degradación de los plaguicidas.
- Los ambientes con valores altos de pH, favorecen la mayor degradación microbiológica de plaguicidas.

Hidrocarburos en México

A partir de la década de 1950 la industria petroquímica en México ha desarrollado un crecimiento acelerado y es en estos últimos años donde la importancia de este energético ha sido de tal magnitud que la economía del país depende en un alto porcentaje de las reservas, venta y distribución de este recurso (Ponce y Botello, 2005). Sin embargo, su expansión y desarrollo también da origen a graves problemas ambientales derivados de emergencias ambientales con repercusiones graves a la salud de la población y al equilibrio ecológico de los ecosistemas (Quadri, 1994).

El Golfo de México es una de las regiones petroleras más grandes del mundo, encontrándose en el área de la Sonda de Campeche el 95% de las reservas del recurso petrolero de México (Ponce y Botello, 2005). Debido a lo anterior, el transporte mediante oleoducto y poliductos es una de las formas más eficientes y rápidas de traer este producto al centro del país. Sin embargo, la infraestructura de oleoductos y poliductos tiene un retraso tecnológico y cuenta con 24 a 28 años de edad promedio y con confiabilidad operativa baja (PEMEX, 2011a). Por lo cual, las malas condiciones de los ductos y las fugas por tomas clandestinas son las principales causas de derrames de hidrocarburos en el suelo.

En cuanto a la normatividad de los niveles máximos permisibles de hidrocarburos, la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. Estos límites para suelos agrícolas son 1,200 ppm para HFM y 3,000 pm para HFP.

Persistencia de los hidrocarburos

La persistencia de estos compuestos en el suelo está dado principalmente por lo complejo de su composición y estructura química (Castillo, 2005), es decir, entre más moléculas de carbono tenga el compuesto más persistente será. Pero éste no es el único factor, también las características fisicoquímicas y biológicas del suelo, cantidad de hidrocarburo derramado y la presencia de microorganismos nativos del suelo tienen un papel fundamental en la permanencia de compuestos orgánicos.

Degradación y metabolismo de hidrocarburos

Los hidrocarburos son una fuente de carbono y energía, por lo cual, al igual que los plaguicidas, la principal degradación es por los microorganismos. La biodegradación de los hidrocarburos ocurre en condiciones aerobias mayoritariamente y en una proporción menor en condiciones anaerobias. En ambos procesos se necesita de una fuente de energía para degradar los hidrocarburos, siendo este el oxígeno en aerobiosis y nitrato, sulfato o Fe (III) en anaerobiosis (Castillo, 2005).

La degradación de hidrocarburos alifáticos es un proceso que ocurre en condiciones aerobias preferentemente. Los microorganismos capaces de llevar a cabo estas reacciones son los siguientes géneros: *Nocardia*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* (Castillo, 2005). La degradación de los hidrocarburos aromáticos también se realiza principalmente bajo procesos de aerobiosis por organismos de los géneros como: *Pseudomonas*, *Paenibacillus* y *Anthracophyllum* (Acevedo *et al.*, 2011; Launen *et al.*, 2008).

Biorremediación de suelos

La biorremediación es una de las técnicas de remediación más competitivas económica y funcional en comparación con las técnicas de incineración o tratamientos químicos, pero se necesita ampliar el conocimiento de manera preliminar para diseñar el proceso (Admassu y Korus, 1996). La tecnología de Cultivo Sólido *On-site* o *Ex-situ* (biopilas) es un proceso desarrollado por Rodríguez-Vázquez *et al.* (2011) que se controla mediante la adición de nutrientes, material orgánico, agua y aeración pasiva mezclado con el material contaminado y aeración pasiva. Generalmente, dependiendo del volumen, se utiliza maquinaria para poder excavar, transportar y homogenizar el suelo.

En los procesos de biorremediación, existen dos alternativas que son la bioestimulación y bioaumentación. La bioestimulación de un sistema contaminado es la introducción de nutrientes, en particular de fertilizantes orgánicos y/o inorgánicos, con el fin de promover el crecimiento y estimular a los microorganismos autóctonos con capacidad de degradar los contaminantes de interés (Juwarkar *et al.*, 2010; Pankrantz, 2001). La bioaumentación es la adición de cepas o consorcios de microorganismos nativos (bioaumentación endógena) y/o no-nativos (bioaumentación exógena) para eliminar la contaminación (Fantroussi y Agathos, 2005).

Dentro de la biorremediación, la alternativa de adicionar residuos agroindustriales como paja, bagazo de caña y cáscara de naranja, hace que sea técnicamente posible, sencilla y amigable con el ambiente. Dichos residuos orgánicos no sólo cumplen la función de mejorar las características del suelo cuando se emplean en elevadas cantidades, sino que además son materiales de densidad baja, que mejoran las propiedades físicas, químicas y biológicas del

suelo. Incrementan la porosidad y permiten una difusión de oxígeno mejor, lo cual favorece la actividad microbiana, estabilidad y estructura mediante la infiltración del agua y el intercambio gaseoso (Navarro *et al.*, 1995).

El fundamento bioquímico de la biorremediación se basa en que en la cadena respiratoria o transportadora de electrones de las células se producen una serie de reacciones de óxido-reducción, cuyo fin es la obtención de energía. La cadena se inicia con un sustrato orgánico (compuestos hidrocarburoados o plaguicidas), que es externo a la célula y que actúa como donador de electrones, de modo que la actividad metabólica de la célula acaba degradando y consumiendo dicha sustancia. en condiciones aerobias el oxígeno es el aceptor de electrones más comúnmente utilizado por los microorganismos, y en las reacciones anaerobias los nitratos, el hierro (III), los sulfatos y el dióxido de carbono son los aceptores principales (Maroto y Rogel, 2001).

La tecnología de remediación utilizada en este trabajo es el “Cultivo Sólido *On site*” mediante la utilización de grano verde de café, desarrollada en el CINVESTAV con patente mexicana otorgada No. 291975 (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2011). Esta tecnología presenta una variante del proceso de cultivo sólido debido a que emplea bajas cantidades de materiales orgánicos (paja de trigo y grano verde de café), de humedad y aireación.

Material Orgánico

El material orgánico o residuos agroindustriales añadidos al suelo proporcionan un aumento en la densidad aparente y porosidad, lo que permite una difusión del oxígeno y el agua más eficiente, favoreciendo la actividad microbiana debido al aumento de la permeabilidad (Levin y Gealt, 1997; Roldán-Martín *et al.*, 2007; Seoanez-Calvo, 1996). El uso de residuos agrícolas en los procesos de biorremediación es ventajoso pues los residuos agroindustriales contienen nutrientes y en general son ricos en fósforo, nitrógeno y carbohidratos (Pandey *et al.*, 2000), los cuales son potencialmente importantes en el crecimiento de microorganismos degradadores de contaminantes orgánicos (Roldán-Martín *et al.*, 2007). Por otro lado, la reutilización de estos residuos también podría resolver problemas relacionados con su disposición (Barragán-Huerta *et al.*, 2007).

En trabajos de remediación de suelo diversos se han utilizado desechos agrícolas (paja, grano verde de café y bagazo de caña) como material orgánico en el proceso de remoción de contaminantes orgánicos como OCs, hidrocarburos y PCB (Fernández-Sánchez *et al.*, 2001; Chávez - Gómez *et al.*, 2003; Dzul-Puc *et al.*, 2004; Pérez- Armendáriz *et al.*, 2004; Barragán-Huerta *et al.*, 2007; Rigas *et al.*, 2007; Roldán-Martín *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008; Shahsavari *et al.*, 2013). En el presente trabajo se utilizó la paja de trigo y el grano verde de café en cantidades bajas para la remoción de plaguicidas OCs e hidrocarburos.

Nutrientes

Los nutrientes se clasifican en macronutrientes y micronutrientes; los macronutrientes son compuestos requeridos en cantidades grandes y forman parte de las macromoléculas de las células como carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos. Entre los macronutrientes se tiene al carbono (C), nitrógeno (N), fósforo (P) y azufre (S) (Atlas, 1981; Sylvia *et al.*, 1999). La limitación de algunos nutrientes como N y P puede reducir la actividad microbiana, por lo cual su presencia es fundamental en la biorremediación. La cuantificación de N, junto con la materia orgánica (MO) y P, es importante para determinar qué nutrientes presentan un déficit en el suelo, pues no permitirían el desarrollo adecuado de los microorganismos autóctonos que participaran en la biorremediación.

La MO se refiere a la mezcla de compuestos orgánicos como lípidos, lignina, celulosa, proteínas, sustancias húmicas y otros compuestos provenientes de restos de plantas y animales (Meyers y Ishiwatari, 1993). La MO en general es de aproximadamente un 5% del volumen total del suelo y es un factor clave en la dinámica y fertilidad del mismo, ya que actúa sobre las propiedades físicas (porosidad, capacidad de campo, estabilidad de agregados, etc.) y químicas, aportando nutrientes mediante los procesos de mineralización y a través de su capacidad de cambio de cationes, que actúa como una reserva nutricional, y sobre las biológicas, ya que mantiene la actividad microbiana del suelo (Bernal, 2004).

El N es un componente esencial de proteínas y lípidos, por lo cual, en los microorganismos, la carencia de N puede afectar el crecimiento de la población microbiana, la cual no tendrá un

desarrollo óptimo. La cantidad de N presente en muchos suelos es escasa, debido a su propia dinámica y a su ciclo biogeoquímico (Fernández *et al.*, 2006). El N puede llegar al suelo a través de los aportes de MO y a la fijación bacteriana a partir del aire.

El P es un nutriente esencial en el desarrollo metabólico de los microorganismos debido a que es un componente del ATP, los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos (Fernández *et al.*, 2006). El P en el ambiente es un elemento poco abundante en el suelo (<0.01-1 ppm) y puede llegar a ser un elemento limitante para el crecimiento microbiano y por consecuencia para una biorremediación de suelos adecuada. Además, debido a su biodisponibilidad baja es más difícil el acceso a este nutriente (Rengel, 2008).

Biofertilizantes

Existen trabajos diversos que mencionan que los biofertilizantes con microorganismos fijadores de N atmosférico y solubilizadores de P insoluble favorecen el crecimiento de plantas agrícolas (Wu *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2006; Shankar *et al.*, 2011) y el efecto negativo de la utilización de fertilizantes químicos en el ambiente debido a sus metabolitos secundarios y acumulación (Pesakovic *et al.*, 2013). La utilización de productos microbianos tiene varias ventajas sobre los productos químicos convencionales agrícolas pues: (i) los productos microbianos se consideran más seguros que muchos de los productos químicos; (ii) ninguna de las sustancias tóxicas ni los microbios mismos se acumularán en la cadena alimentaria, y; (iii) la auto-replicación de los microbios evita la necesidad de una aplicación repetida (Gloud, 1990; Shen, 1997). Sin embargo, no se han desarrollado estudios para determinar el efecto de biofertilizantes en el proceso de biorremediación de suelos. Por lo que proponer la utilización de biofertilizantes es una alternativa en los procesos de biorremediación para poder contar con tecnologías más verdes y amigable con el ambiente. Debido a lo anterior, en la presente investigación se realizó el proceso de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación de un suelo agrícola utilizando materiales agrícolas y biofertilizantes.

Análisis toxicológicos del suelo

Los posibles efectos negativos sobre el suelo debido al uso inadecuado o un accidente en los que participen compuestos orgánicos, como hidrocarburos o plaguicidas, son muy

significativos, debido a la dificultad de aplicar un procedimiento de limpieza adecuado y las importantes consecuencias, directas o indirectas, ocasionadas por estos compuestos sobre los ecosistemas (Galán-Huertos *et al.*, 2003). Debido a lo anterior, es importante realizar análisis toxicológicos para observar los efectos adversos dañinos de estas las sustancias compuestos orgánicos presentes en el suelo.

Pruebas de fitotoxicidad

La toxicidad de un contaminante puede evaluarse por medio del análisis cualitativo y cuantitativo del efecto provocado en uno o más parámetros fisiológicos que se consideran relevantes o representativos. En este sentido, es común que las pruebas de fitotoxicidad estén orientadas a la valoración de: 1) la mortalidad (toxicidad aguda y crónica con lombrices), 2) fitotoxicidad con índice de germinación y la elongación radicular, 3) el crecimiento o producción de biomasa, 4) el contenido de clorofila y 5) la tasa fotosintética, entre otras (Fernández *et al.*, 2006). En el presente trabajo se realizaron pruebas con semillas de lechuga y raíces de cebolla para observar el efecto de hidrocarburos y plaguicidas organoclorados.

En los bioensayos de toxicidad con semillas se evalúan los efectos adversos de un compuesto puro o de una mezcla compleja en el proceso de germinación y en el desarrollo de las plántulas durante los primeros días de crecimiento (Sobrero y Ronco, 2008). Como respuesta se determina la inhibición en la germinación y de la elongación de la radícula. Es importante destacar que durante la germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir, alterando la supervivencia y desarrollo normal de las plántulas.

En las pruebas de toxicidad en cebolla (*Allium* sp.), se produce una estimulación del crecimiento de las células, lo cual permite la elongación de las raíces de la planta. Sin embargo, cuando la hidratación se lleva a cabo en presencia de sustancias tóxicas, la división celular de los meristemos radiculares puede inhibirse, ya sea retardando el proceso de mitosis o destruyendo las células. Este tipo de alteraciones generalmente impide el crecimiento normal de la raíz y por tanto su elongación (Fiskesjö, 1989). El efecto puede determinarse en forma indirecta, mediante la comparación de la elongación de las raíces de cebollas expuestas al

compuesto tóxico contra la de cebollas no expuestas. La cuantificación del efecto se realiza estableciendo el porcentaje de inhibición del crecimiento de las raíces respecto a la longitud promedio de las raíces del control (Díaz-Baéz *et al.*, 2008). Además la división celular de los meristemas radiculares puede afectarse, retardando el proceso de mitosis o alterando el proceso de alargamiento radicular (Uribe, 2008).

JUSTIFICACION

La biorremediación resulta una alternativa importante para la restauración de suelos contaminados con agroquímicos e hidrocarburos y evitar efectos a corto y largo plazo en el ambiente y la salud humana. Debido al uso excesivo de los plaguicidas y a los derrames accidentales de hidrocarburos en suelos, es imprescindible estudiar y determinar métodos de biorremediación que permitan mitigar los efectos de la contaminación por estos compuestos tóxicos.

Asimismo, es trascendental determinar las condiciones nutricionales y ambientales que favorezcan la remediación para comprender las rutas metabólicas y las posibles mejoras en las técnicas de remediación biológica.

La presencia de dos o más tipos de contaminantes en un suelo es muy frecuente y puede mostrar diferencias en la eficiencia de remoción de los compuestos, por lo que el estudio de los efectos del conjunto de varios contaminantes y su degradación, representa un reto a la investigación que hasta el momento no se ha estudiado.

Por otra parte, es importante efectuar pruebas de toxicidad del suelo para establecer no sólo la tasa de remoción de los contaminantes, sino también la recuperación de la capacidad de cultivo del suelo afectado.

HIPÓTESIS

El proceso de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación y su optimización favorecerá la degradación de los plaguicidas e hidrocarburos presentes en el suelo agrícola, debido a la acción de los nutrientes, material orgánico agregado y microorganismos nativos.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto en la degradación de plaguicidas-hidrocarburos durante el proceso de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación en un suelo agrícola contaminado.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Cuantificar la degradación/remoción de plaguicidas e hidrocarburos producido por el proceso de biorremediación de un suelo contaminado.
- Establecer el efecto del proceso de bioestimulación en el crecimiento de los microorganismos nativos en el suelo contaminado.
- Determinar la participación de las variables que inciden en la eficiencia del proceso de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación.
- Evaluar el efecto de adicionar biofertilizantes en el sistema de biorremediación por cultivo sólido-bioestimulación sobre la degradación/remoción de los contaminantes.
- Establecer el potencial de biorremediación producido por los microorganismos nativos aislados del suelo agrícola tolerantes a los contaminantes.
- Evaluar la toxicidad de los plaguicidas e hidrocarburos presentes en el suelo agrícola.

MATERIAL Y MÉTODOS

Área de estudio

El Estado de Puebla tiene una superficie de 34,290 Km² y 38.56% se utiliza para la agricultura (INEGI, 2011). Los cultivos cíclicos y perennes principales de acuerdo a la producción en toneladas son: alfalfa verde (1, 084,455.75 Ton), caña de azúcar (1, 653,309.25 Ton), grano de maíz (1,020,641.12 Ton), nochebuena (1,254,700.00 Ton) y plantas de ornato (995,117.50 Ton) (OEIDRUS Puebla, 2011). En estos cultivos se usan plaguicidas para controlar plagas principalmente carbamatos, organofosforados y únicamente el organoclorado endosulfán. Aunado a estos contaminantes se tienen diversos productos y subproductos de la industria petrolera que, durante su transporte impacta los suelos de cultivo, y las fugas en zonas agrícolas generalmente proviene de oleoductos adyacentes o por debajo de las zonas agrícolas que se encuentran en malas condiciones.

En el estado de Puebla existe una terminal de almacenamiento y oleoductos provenientes de la Refinería Minatitlán (**Fig. 1**) (PEMEX, 2011a). En la cual se han presentado derrames y fugas de hidrocarburos ocasionados por tomas clandestinas y al mal estado de las tuberías. En el 2010, en el estado de Puebla se detectaron 58 tomas clandestinas y en este mismo año se han registrado fugas en diferentes municipios entre los cuales se encuentra Tepeaca, afectando partes de las zonas agrícolas (García, 2011; Hernández, 2010; PEMEX, 2011b; Poblenerías, 2010).

El área de estudio donde se colectó el suelo está ubicada en el municipio de Tepeaca en el Estado de Puebla, ésta es una parcela que contiene suelo agrícola contaminado con plaguicidas e hidrocarburos. La presencia de hidrocarburos es debido un derrame de petróleo ocurrido en octubre de 2010, esta fuga fue provocada por la ruptura de un oleoducto que pasa por debajo de las zonas de cultivo, debido al paso de un tractor. En esta zona se siembran diferentes cultivos en el año agrícola (**Tabla 1**) y se utilizan diversos plaguicidas para controlar plagas y enfermedades (**Tabla 2**).

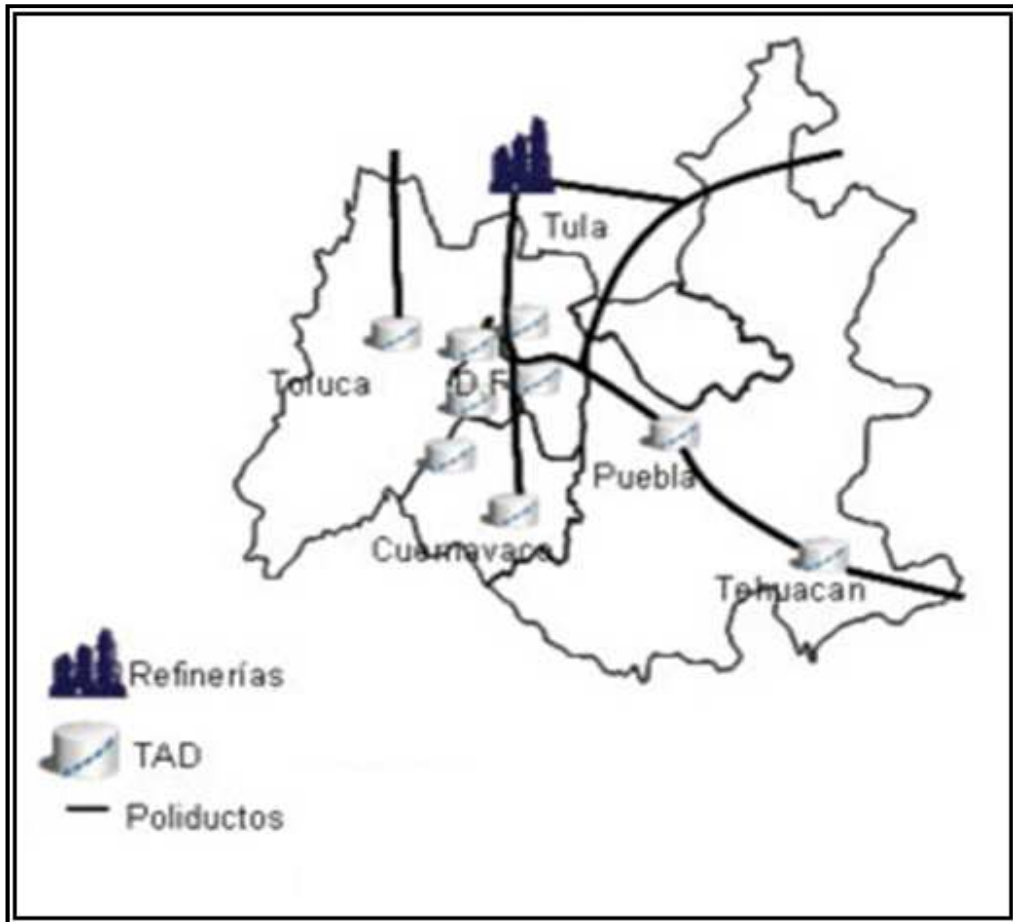


Figura 1. Ubicación de los poliductos en el Estado de Puebla (PEMEX, 2011a)

Tabla 1. Cultivos principales producidos en Tepeaca, Puebla (Oiedrus, 2011)

Cultivo	Producción (Ton/año)
Alfalfa verde	17,340.00
Maíz grano	10,710.00
Col (repollo)	4,550.00
Maíz forrajero	3,900.00
Coliflor	2,660.00
Zanahoria	2,608.00
Cilantro	2,570.00
Cebolla	1,920.00

Tabla 2. Plaguicidas utilizados en cultivos de Tepeaca, Puebla (CICOCPLAFEST, 2004)

Plaguicida	Clasificación	Uso
Carbarilo	Carbamatos	Alfalfa, Col, Coliflor, Maíz
Clorpirifos	Organofosforado	Alfalfa, Maíz
Diazinon	Organofosforado	Alfalfa, Cebolla, Col, Coliflor, Maíz, Zanahoria
Malation	Organofosforado	Alfalfa, Cebolla, Col, Coliflor, Maíz, Zanahoria
Metamidofos	Organofosforado	Alfalfa, Col, Coliflor
Endosulfán	Organoclorado	Alfalfa, Col, Coliflor, Maíz

Muestro de suelo

Para caracterizar la contaminación del suelo agrícola por plaguicidas e hidrocarburos, determinar parámetros fisicoquímicos y biológicos, se realizó un muestreo inicial en el área de estudio. El muestreo fue sistemático mediante una rejilla rectangular, debido a que la distribución de los contaminantes estudiados no se conoce y el sistema es muy heterogéneo (Einax *et al.*, 1997). Una vez tomando los datos, identificando, etiquetando y encintando cada muestra, se efectuó el llenado de la Cadena de Custodia. Las muestras fueron depositadas en una hielera y se enviaron al laboratorio para realizar el análisis de hidrocarburos y plaguicidas presentes en las muestras. Las técnicas de muestreo son similares a las técnicas y medidas de seguridad establecidas en los laboratorios certificados.

Determinación de los parámetros fisicoquímicos y biológicos

Para poder mantener activas a las poblaciones microbianas nativas del suelo durante el proceso de biorremediación, se requirió efectuar la cuantificación de los parámetros físico-químico-biológicos como la concentración de N, P y MO, establecer la humedad, realizar la cuenta bacteriana y fúngica y determinar el pH de acuerdo a las metodología establecidas por Fernández *et al* (2006).

Método analítico para determinar la concentración de hidrocarburos

La extracción de los Hidrocarburos Fracción Media (HFM) del suelo se realizó mediante el método de extracción EPA 3546 en un horno de microondas CEM MARS-Xpress de placa

giratoria. El análisis de hidrocarburos se realizó con el método EPA 8015C, por cromatografía de gases con detector de ionización de flama (CG/IF). Se empleó un cromatógrafo Thermo Scientific modelo GC Focus Series, equipado con columna capilar GRACE de 30 m de longitud por 0.32 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de capa ATTM-5. Como gas acarreador se utilizó N con un flujo de 1.3 mL/min y como gas auxiliar se empleó hidrogeno y aire. Las condiciones del equipo fueron: inyector 250° C (split flow: 39 mL/min), detector 250° C y columna 50-270° C (rampa en 17.67 min). Las muestras se concentraron a un volumen de reconstitución de 2 mL y se inyectó 1 μL en el CG. El límite de detección (LD) fue de 0.01 ppm. El estándar utilizado fue una mezcla de hidrocarburos n-alcanos (C₁₀-C₂₈) Resteck DRO Mix on Rtx[®]-5. Los tiempos de retención y suma de áreas bajo la curva para determinar las concentraciones de las muestras, se realizaron mediante un integrador de áreas.

El análisis de los Hidrocarburos Fracción Pesada (HFP) se efectuó mediante la determinación gravimétrica de acuerdo al método EPA 1664A. Para ello se utilizaron los métodos de extracción EPA 3546 y EPA 9071B, mediante un horno de microondas CEM MARS-Xpress.

Método analítico para determinar la concentración de plaguicidas

El análisis de plaguicidas OCs en las muestras de suelo se realizó mediante el método EPA 8081B por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (CG/DCE). Se realizó la extracción mediante el método EPA 3546 y se utilizó el horno de microondas CEM MARS-Xpress. La limpieza de los extractos se realizó mediante columnas de adsorción con Florisil (SupelcleanTM ENVITM Florisil[®] SPE Tubes 6 mL 1g). Se utilizó un cromatógrafo de gases con sistema capilar Varian Modelo CP-3380 con fuente de poder 63Ni y columna capilar Varian de 15 m de longitud por 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μm de grosor de capa CP-Sil 5CB, como gas acarreador se utilizó N a una presión constante de 17 psi. Las condiciones del equipo fueron: inyector 200° C, detector 300° C y columna 100-230° C (rampa en 35 min). Las muestras se concentraron a un volumen de reconstitución de 2 mL y se inyectó 1 μL en el CG. Los tiempos de retención y el área bajo la curva se calcularon con un integrador de áreas. El LD fue de 0.01 ppb. La mezcla de estándares utilizados fue de 20 OCs (Restek Mix AB #3): α -BCH, β -BCH, γ -BCH (lindano), δ -BCH, heptacloro, epóxido de heptacloro, trans-

clordano, cis-clordano, aldrín, dieldrín, endrín, endrín aldehído, endrín cetona, 4,4'-DDE, 4,4'-DDD, 4,4'-DDT, metoxiclor, endosulfán I, endosulfán II y endosulfán sulfato.

Método analítico para determinar el CO₂

La determinación de CO₂ y O₂ en los microcosmos se realizó mediante un cromatógrafo de gases GOW-MAC Modelo SERIES 580, columna concéntrica empacada ALLTECH CTR 8700, el gas acarreador fue el helio. Condiciones del equipo: inyector 40° C, detector a 100° C, corriente 125mA, columna temperatura ambiente (25° C) (rampa en de 4.0 min). El volumen inyectado de muestra fue de 2 mL. Mediante un integrador de áreas se calculó el área bajo la curva del CO₂ y O₂.

Condiciones para realizar el estudio de remediación en microcosmos

Debido a que la caracterización inicial de plaguicidas nos indicó que su concentración en el suelo agrícola era muy baja (Islas-García *et al.*, 2015), se estableció que, para determinar adecuadamente la remoción de los plaguicidas era necesario adicionar plaguicidas OCs. Para lo cual, se determinó que el mejor disolvente para adicionar los plaguicidas al suelo sin que modificaran los microorganismos nativos fue el hexano, debido a que si permitió el crecimiento de bacterias y hongos, en contraste con la acetona, que redujo el crecimiento de hongos y bacterias en comparación con una muestra de suelo sin disolvente. La concentración inicial de hidrocarburos fue adecuada para observar su remoción durante el tratamiento de biorremediación, por lo que no se modificó.

Los plaguicidas OCs adicionados al suelo fueron; endosulfán, heptacloro y DDT, se adicionó 1 mL por cada 5 g de suelo en hexano y se mezcló homogéneamente. Posteriormente se evaporó el disolvente en las muestras de suelo. Los plaguicidas se seleccionaron debido a que el heptacloro se detectó en el muestreo inicial, el endosulfán es un plaguicida actualmente utilizado y el DDT es un plaguicida OCs estándar en los estudios de remediación (Mo *et al.*, 2008).

Estudio de remediación en microcosmos

Se establecieron pruebas de tratabilidad de nivel microcosmos para los estudios de biodegradación del sistema plaguicida-hidrocarburos. La bioestimulación se realizó

manteniendo la proporción de nutrientes C:N:P, agregando grano verde de café y paja de trigo como material orgánico, biofertilizantes y micronutrientes. La bioestimulación se realizó con microorganismos aislados del mismo suelo agrícola contaminado. En estos sistemas se realizaron muestreos a los 20 y 40 días para determinar la remoción de los HFM, HFP, OCs y cuantificar el CO₂ en los microcosmos.

La tecnología de remediación empleada en esta investigación fue la patente de “Cultivo Sólido *On site*” que utiliza grano verde de café (Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2011). Debido a lo anterior, no se aportan detalles de esta tecnología en el presente trabajo.

Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos hidrocarburoclastas y plaguicidaclastas

Los microorganismos del suelo agrícola tolerantes a plaguicidas (plaguicidaclastas) y/o hidrocarburos (hidrocarburoclastas) se aislaron utilizando medios de cultivo de agar noble con estos contaminantes para obtener las colonias puras, de acuerdo al método propuesto por Islas-García *et al.* (2015). Posteriormente se resembraron las bacterias y levaduras en placas con agar nutritivo (AN) y los hongos a un medio (PDA) para obtener las cepas puras. La forma de garantizar la pureza de las cepas de bacterias y levaduras fue mediante estriados hasta agotamiento de las colonias aisladas. Mientras que para obtener las cepas puras de los hongos simplemente se resembraron las cepas aisladas a otras placas mediante sacabocados.

Una vez aislados y purificados la bacteria, levadura y hongos se colocaron en tubos inclinados con AN y PDA, respectivamente, para su envío y posterior identificación por expresión de marcadores moleculares en el Centro de Biotecnología Genómica del IPN, que incluyen el análisis comparativo de sus secuencias nucleotídicas para encontrar similitudes en las bases de datos de microorganismos, mediante análisis bioinformático de comparación y búsqueda de secuencias llamada BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y así determinar la identidad biológica de los microorganismos.

Los métodos para la identificación de la bacteria fueron mediante la secuenciación del 16S ADNr, y su comparación en de esta secuencia en BLAST NCBI. Para la levadura fue mediante la secuenciación de dominios D1/D2 del 26S ADNr, y la comparación de la secuencia ITS1-5.8S ADNr-ITS2 en BLAST. La identificación de los hongos filamentosos fueron mediante métodos la secuenciación de espaciadores internos transcritos y/o dominios NL1/NL4, ITS1/ITS2 y 26S ADNr, y su comparación de las secuencias en BLAST NCBI.

Análisis toxicológicos del suelo contaminado

Evaluación de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L.

La evaluación de toxicidad aguda se realizó mediante el método descrito por Sobrero y Ronco (2008), con modificaciones. El material biológico empleado fueron semillas de *Lactuca sativa* L. (ITSCO) con una tasa de germinación del 86% y de 120 h. El ensayo se realizó por triplicado en charolas para cultivo celular con 24 pozos. En cada pozo se agregaron 3 g de muestra (a 40% de humedad) y dos semillas de *Lactuca sativa* L. Debajo de cada charola se colocó un paño húmedo y se envolvieron por separado con bolsas de polipapel. Las condiciones de crecimiento fueron: fotoperiodos de 16 h con luz y 8 h en obscuridad, ventilación durante todo el ensayo, temperatura de $25 \pm 4^\circ$ C y humedad de $19 \pm 3\%$.

Después de 120 h se contaron las semillas germinadas y se cuantificó la elongación radicular. Con estos datos se calculó el porcentaje de germinación (%G), el índice de germinación (IG), la elongación radicular (ER) y la elongación radicular relativa (ERr).

Evaluación de toxicidad y citotoxicidad con *Allium cepa* L.

La prueba de citotoxicidad se realizó siguiendo el método descrito por Fiskesjö (1989) y Barbério *et al.* (2011) con algunas modificaciones. Es importante mencionar que esta prueba se emplea para evaluar toxicidad de muestras de agua o de suelo diluido, sin embargo se consideró como una buena alternativa en el presente trabajo.

Las cebollas (*Allium cepa*) se lavaron, se les eliminó la capa superficial seca y se les cortaron las raíces existentes sin dañar el aro radicular, los cuales se expusieron a la solución Hoagland

durante 72 h para inducir el pre-crecimiento de las raíces. Transcurridas 72 h, se cuantificó la ER de cada bulbo. Posteriormente, se expusieron a las muestras de suelo contaminado y controles con 40% de humedad por 72 h a temperatura ambiente y evitando la exposición directa a la luz solar. Después de 72 h de exposición en el suelo, las raíces se enjuagaron con agua destilada y se cuantificó nuevamente la ER. Con estos valores se calculó ERr.

Evaluación de anomalías en figuras mitóticas en *A. cepa*

Posteriormente, a las cebollas utilizadas en el ensayo anterior se les cortaron tres ápices radiculares (2-3 mm) de cada bulbo y cada ápice se montó en un portaobjetos, se fijaron con una mezcla de etanol:ácido acético glacial (3:1) por 10 min y se eliminó el exceso del fijador. Se les agregó ácido clorhídrico 4 M y se dejó por 75 min, después se efectuó un baño en frío con ácido clorhídrico 0.1 M, las raíces se sumergieron inmediatamente en el reactivo de Schiff por 40 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizó un lavado con agua sulfurosa (tres baños durante 5 min cada uno) y finalmente otro con agua destilada. A cada ápice de raíz se les agregaron dos gotas de ácido acético al 45%, se les colocó un cubreobjetos y se realizó el “squash”, finalmente los bordes del cubreobjetos se sellaron con barniz o bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron con un microscopio estereoscópico a un aumento de 40 y 100X y se evaluaron 100 células para calcular el porcentaje presente de las distintas fases mitóticas en cada raíz. Al mismo tiempo se observaron aproximadamente 1000 células para encontrar posibles anomalías mitóticas o diferencias entre células de raíces expuestas a diferentes suelos contaminados.

Análisis estadístico

El análisis para determinar qué variables experimentales afectaron de forma positiva o negativa el proceso de remoción de contaminantes en cada tratamiento se realizó mediante el programa Design Expert 8.0.2. En los resultados de remoción de contaminantes se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para determinar si existían diferencias entre los diferentes tratamientos, con un valor de $p < 0.05$, mediante el software SAS 9.1. En las diferentes pruebas de toxicidad se realizó la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p < 0.05$) con el software SAS 9.1. Los tratamientos de remoción se hicieron por duplicado y para las pruebas de toxicidad por triplicado, reportándose en los resultados los promedios obtenidos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización inicial del suelo agrícola y su potencial de degradación por biorremediación

Inicialmente, en este estudio se determinó la concentración inicial de hidrocarburos y plaguicidas organoclorados presente en las muestras de suelo agrícola de Tepeaca, Puebla del área contaminada, así como la actividad microbiana del mismo, para determinar la viabilidad de su biorremediación. Los plaguicidas OCs que se detectaron fueron heptacloro, aldrín, trans-clordano, 4,4'-DDE, endosulfán I, endosulfán II, 4,4'-DDT y endrín aldehído con valores entre 0.69 y 30.81 ppb. Respecto a la concentración de hidrocarburos en el suelo se detectaron valores de HFM de 4608.1 y 27747.9 ppm y de 1117.1 y 19609.9 ppm de HFP. El suelo presentó deficiencia de nutrientes; N (0.03-0.07%) y P (0 ppm), por lo que fue necesario bioestimular el suelo para realizar la biorremediación del mismo (Islas-García *et al.*, 2015).

En las muestras de suelo agrícola de Tepeaca que se colectaron se detectó la presencia de hongos hidrocarburoclastas con 3.72 a 44.6×10^2 UFC/g d.s. y bacterias hidrocarburoclastas con 0.17 a 8.60×10^5 UFC/g d.s. con tolerancia a concentraciones de 30,000 ppm de hidrocarburos. Además se determinó la presencia de hongos plaguicidaclastas con 5.13 a 42.2×10^2 UFC/g d.s. y bacterias plaguicidaclastas con 0.15 a 9.68×10^5 UFC/g d.s. con capacidad de tolerar los plaguicidas y con potencial para degradar los plaguicidas OCs a concentraciones de 20 ppm. Asimismo, se cuantificaron hongos y bacterias capaces de tolerar la presencia de ambos contaminantes (Islas-García *et al.*, 2015). Por lo anterior se determinó que existen microorganismos con potencial para llevar a cabo la degradación por bioestimulación, de hidrocarburos y plaguicidas en presencia de ambos contaminantes. De acuerdo a la concentración de contaminantes y a la actividad microbiana analizada se concluye que es factible una biorremediación utilizando la microfauna nativa del suelo agrícola contaminado.

Debido a lo anterior, posteriormente se realizaron experimentos para determinar la remoción de estos contaminantes orgánicos mediante la bioestimulación y además con la bioaumentación con los microorganismos aislados del suelo.

Diseño experimental para determinar la remoción de los contaminantes orgánicos y el efecto de las variables utilizadas para la biorremediación

Para determinar las variables que afectan la remoción de HFM, HFP y OCs se efectuó un diseño experimental de Plackett-Burman, el cual considera 11 variables y 12 tratamientos, además de 3 puntos centrales para determinar el error experimental (Montgomery, 2011) y dos controles. En la **Tabla 3** se muestran los valores naturales y codificados del diseño Plackett-Burman. En este análisis se utilizó una muestra de suelo de Tepeaca con valores de HFM de 20,000 a 25,000 ppm y contaminado con 5 ppm de endosulfán, heptacloro y DDT. Las variables a valores altos y bajos fueron: Paja de trigo, grano de café como materiales texturizantes, humedad, sulfato de amonio $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ y urea $[\text{CO}(\text{NH}_2)_2]$ como fuentes de N, biofertilizantes, fosfato monopótasio $[\text{KH}_2\text{PO}_4]$ y fosfato dipótasio $[\text{K}_2\text{HPO}_4]$ como fuentes de P y sulfato ferroso (Fe SO_4) y sulfato de magnesio $[\text{MgSO}_4]$ como micronutrientes (Tabla 3). Las variables de respuesta que se evaluaron para determinar el nivel de biorremediación fueron; CO_2 , HFM, HFP y OCs. Los biofertilizantes que se utilizaron fueron BIOFERTIBUAP, que contiene microorganismos fijadores de N atmosférico, y BIOFSOFBUAP, que contiene microorganismos solubilizadores del P insoluble. Ambos se elaboran y comercializan por la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP).

El tratamiento se realizó por 40 días. Se cuantificó la concentración inicial a los 0 días de los HFM, los HFP, los OCs, el CO_2 y el O_2 . Posteriormente, se evaluó la concentración de CO_2 y O_2 cada dos días, se aireó 10 min y se ajustó la humedad. Después de 20 días de tratamiento se determinó el porcentaje de remoción de HFM, HFP y OCs y además se realizó reajuste de nutrientes. Posteriormente, a los 40 días de tratamiento se efectuó la determinación de la remoción de HFM, HFP y OCs en todos los microcosmos.

Tabla 3. Variables naturales (tabla superior) y codificadas (tabla inferior) del diseño Plackett-Burman para determinar su efecto en la remoción de HFM, HFP y OCs, en el suelo agrícola de Tepeaca, Puebla.

Variables Naturales	Niveles	
	Bajo (-1)	Alto (1)
A = Paja de trigo (%)	-1*	+1*
B = Grano de café (%)	-1*	+1*
C = Humedad (%CC)	40	50
D = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	0	1.90
E = Urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (g)	0	0.86
F = BIOFERTIBUAP N (%)	0	1
G= BIOFOSFOBUAP P (%)	0.5	1
H= KH_2PO_4 (g)	0	0.23
I= K_2HPO_4 (g)	0	0.18
J= Hierro (Fe SO_4) (g)	0.02	0.08
K= MgSO_4 (g)	0.02	0.05
*Cantidades omitidas para resguardo de la patente		

Tratamiento	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
T 1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1
T 2	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1
T 3	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1
T 4	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1	1
T 5	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1	1
T 6	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1	-1
T 7	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1	-1
T 8	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1	-1
T 9	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1	1
T 10	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1	-1
T 11	-1	1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	1	1
T 12	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1
PC 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PC 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CH2O	-	-	+1	-	-	-	-	-	-	-	-

Producción de CO₂ a los 20 días de tratamiento

La producción de CO₂ aumentó en todos los tratamientos alcanzando su máximo a los 2 y 4 días después de la bioestimulación inicial y no se observó aumento de producción de CO₂ en el control **CH2O** que sólo contiene agua, ni en el control **C**, sin nutrientes agua y material orgánico (**Fig. 2a**). Todos los tratamientos disminuyeron la producción de CO₂ de los 6 a los 12 días, y aumentó ligeramente hasta los 20 días. En el tiempo de análisis de remoción de contaminantes y nutrientes de los 20 días, la producción de CO₂ aumentó ligeramente y se mantuvo hasta los 32 días en algunos tratamientos. Este aumento de producción después de una disminución puede indicar la sucesión o readaptación de poblaciones microbianas durante el proceso de degradación de contaminantes y la variación en la cantidad de nutrientes y material orgánico (Reddy *et al.*, 2011). Esto indica la complejidad de los procesos microbianos que suceden en este tipo de procesos durante la biorremediación de suelos.

Para determinar qué tratamiento presentó la mayor producción de CO₂, se realizó la cuantificación del CO₂ acumulado, correspondiente a la suma de la producción determinada cada día. De esta manera se observó que el tratamiento **T11** presentó la mayor cantidad de CO₂ en los primeros 20 días de tratamiento, seguido del tratamiento **T2**, **T1** y **T12** (**Fig. 3**). Por otro lado, los tratamientos con menor producción de CO₂ fueron los tratamientos **T3**, **T6**, **T5** y **T10**. El control **C** no mostró ninguna producción de CO₂ mientras que el control **CH2O** mostró una producción inclusive mayor que otros tratamientos, indicando que la presencia sólo de agua favorece la actividad microbiana. La producción de CO₂ alta o baja en cada tratamiento indica la combinación y cantidades de las variables del diseño experimental adecuadas para favorecer la actividad biológica y consecuentemente efectuar una remediación eficiente de los contaminantes. Las condiciones que favorecieron la mayor producción de CO₂ fueron del tratamiento **T11**: valores bajos de paja de trigo, humedad, (NH₄)₂SO₄, urea y K₂HPO₄ y valores altos de grano de café, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP, KH₂PO₄, Fe SO₄ y MgSO₄.

Coefficiente Respiratorio a los 20 días de tratamiento

El coeficiente respiratorio (CR) es la relación entre las moles de CO₂ producidos y los moles de O₂ (Fig. 2b) e indica si un sistema es aerobio o anaerobio durante el proceso respiratorio (Saucedo-Castañeda *et al.*, 1994). De acuerdo a la figura 2c, se observó que los tratamientos T2, T4, T5, T8 y T9 tuvieron el mayor CR, significa que los moles consumidos de O₂ son menores que el número de moles producidos de CO₂ y que el sistema está trabajando aeróbicamente utilizando el oxígeno. Esto puede deberse a que el sistema tuvo una mineralización de MO alta, a la presencia de los contaminantes u otros componentes del suelo. En los tratamientos con los valores de CR más bajos, como los tratamientos T1, T3, T6 y T10 y se observó que la actividad biológica no fue adecuada y que el oxígeno que entraba en cada microcosmos no se utilizó en el metabolismo del sistema (Fig. 2c).

Producción de CO₂ a los 40 días de tratamiento

Después de la bioestimulación final a los 20 días, la producción de CO₂ aumentó hasta los 4 días en la mayoría de los tratamientos de la misma manera que en los primeros 20 días de la primera bioestimulación. Posteriormente, a partir de los 6 días después de la bioestimulación y hasta el final de los 40 días de tratamiento la producción de CO₂ disminuyó. El comportamiento de la producción de CO₂ en el presente trabajo es similar a lo reportado por Roldán-Martín *et al.* (2007), que también reportan un aumento en la producción de CO₂ durante la bioestimulación inicial y la final en el proceso de biorremediación del suelo contaminado con hidrocarburos donde bioestimulan únicamente con N y P.

Los tratamientos T11, T1, T2 y T12 mantuvieron valores altos de CO₂ acumulado a los 40 días (Fig. 3) Sin embargo, con excepción de los tratamientos T11, T1, T2, T12 y T7, en todos los demás microcosmos la producción de CO₂ fue menor comparada con los primeros 20 días. Esta reducción en la producción de CO₂ está relacionada a la reducción en los nutrientes como lo menciona Roldán-Martín *et al.* (2007), pero debido a que se realizó una bioestimulación inicial y también puede deberse a la sucesión poblacional de los microorganismos (Reddy *et al.*, 2011). Asimismo este comportamiento del CO₂ puede atribuirse a las diferentes variables y cantidades añadidas a cada tratamiento. Por lo que en los 40 días las condiciones que

favorecieron la producción de CO₂ fueron las mismas que para los 20 días en **T11**, valores bajos de paja de trigo, humedad, (NH₄)₂SO₄, urea y K₂HPO₄ y valores altos de grano de café, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP, KH₂PO₄, Fe SO₄ y MgSO₄.

En el experimento con los microcosmos del diseño de Plackett-Burman se observó que existen tratamientos con alta y baja producción de CO₂, lo cual es un indicador adecuado de la actividad biológica, pero conforme a los resultados obtenidos, esta producción de CO₂ no está completamente relacionada con el porcentaje de remoción de los contaminantes. Los resultados fueron contrarios a lo descrito por Lee *et al.* (2006), que concluyeron que las tasas de respiración del sistema y producción de CO₂ se relacionaron con las tasas de degradación de hidrocarburos totales de petróleo (HTP). Esta discrepancia posiblemente se pueda atribuir a la mineralización de material orgánico, nutrientes y otros procesos metabólicos ocurridos en nuestras muestras de suelo y a que, en otras investigaciones, se observó que las tasas de biodegradación, basadas en la producción de CO₂ son usualmente menos significativas que las basadas en O₂ (Hinchee y Ong, 1992).

Coefficiente Respiratorio a los 40 días de tratamiento

En la mayoría de los tratamientos el CR a los 40 días fue menor a la unidad (**Fig. 2**), lo que demuestra que a pesar de que si hubo actividad biológica, la cantidad de CO₂ producida fue menor a la cantidad de O₂. Debido a que el CO₂ acumulado en los 40 días fue menor que el de los 20 días en la mayoría de los tratamientos se puede sugerir que el metabolismo máximo de los microorganismos se produce en la etapa inicial del tratamiento, donde la cantidad de nutrientes, material orgánico y humedad son adecuados para esta actividad, y que posteriormente, las condiciones del suelo no son óptimas para continuar el proceso de biorremediación con la misma eficiencia.

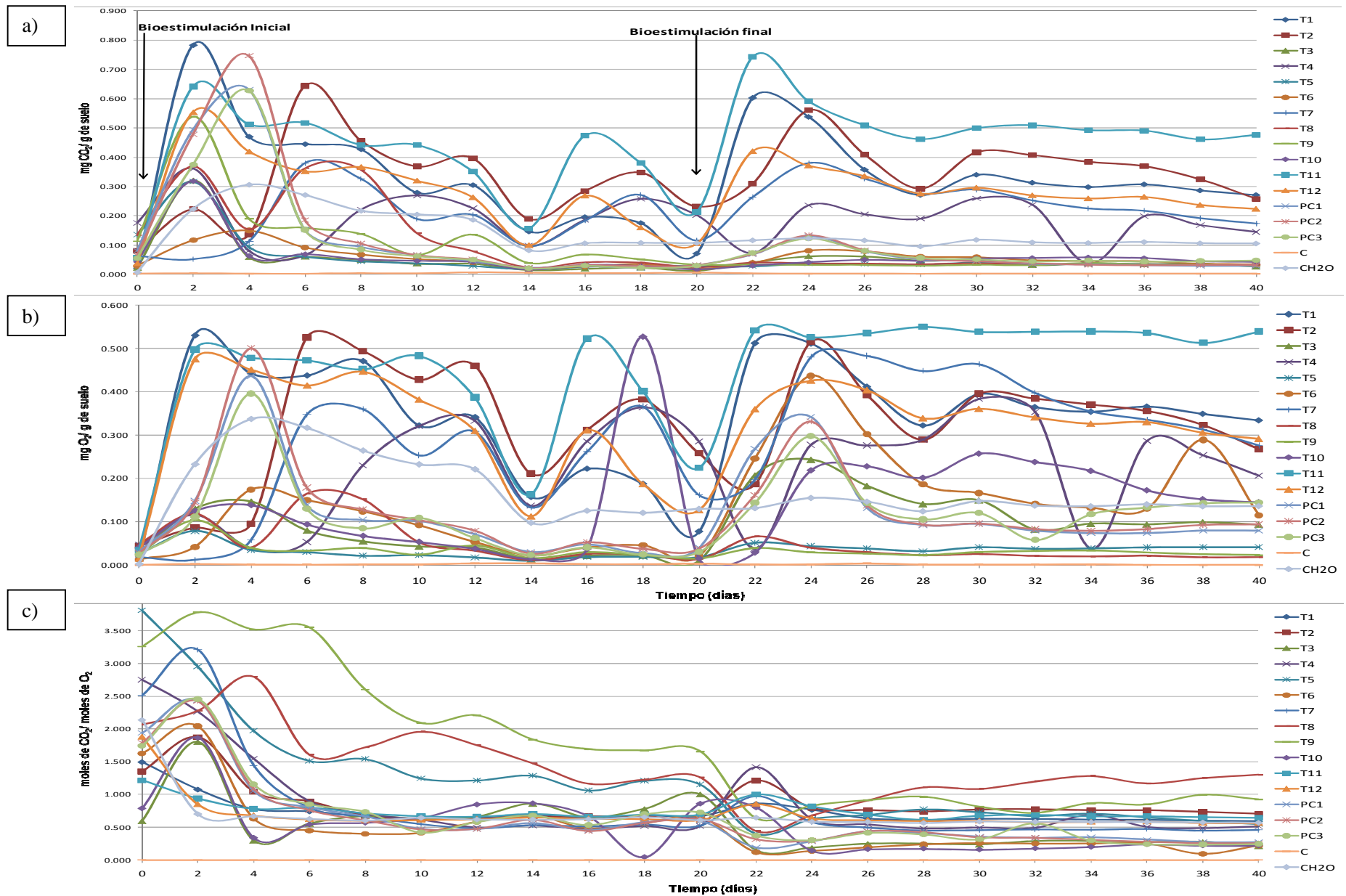


Figura 2. a) Producción de CO₂, b) Concentración de O₂ y c) Coeficiente Respiratorio (CR) durante 40 días en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman. Valores puntuales n=1.

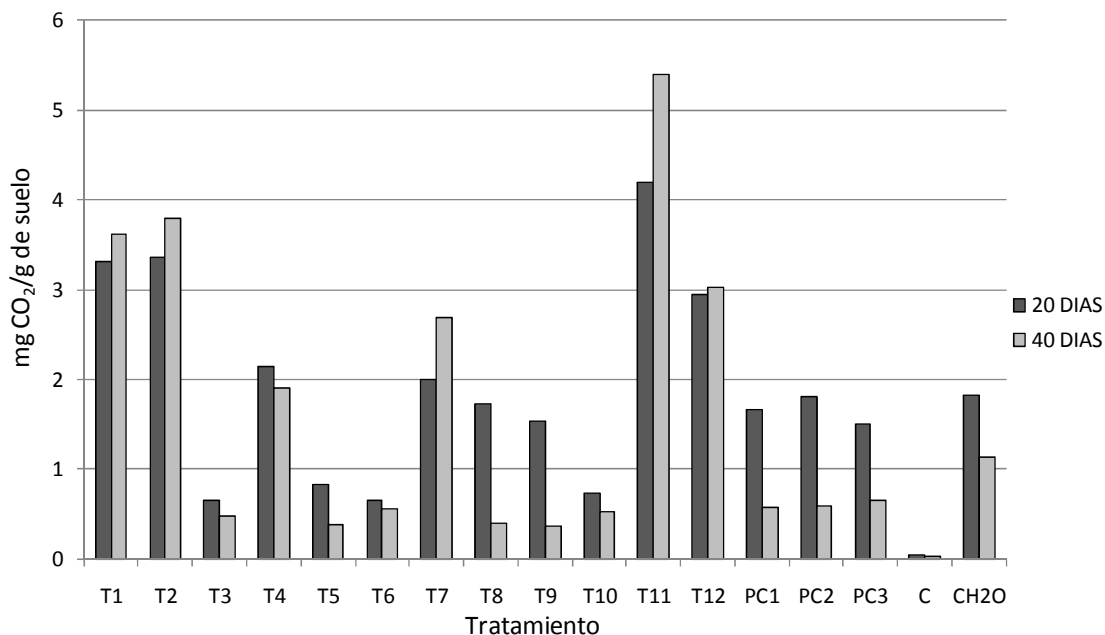


Figura 3. Producción total de CO₂ en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman. Valores puntuales n=1.

Remoción de HFM e HFP a los 20 días

La degradación de HFM en los microcosmos varió dependiendo del tratamiento, observándose valores entre 1.6 y 29.0% de remoción (Fig. 4). Los tratamientos **T5**, **T7**, **T4**, **T9** y **T10** presentaron la mayor proporción de remoción de HFM (>25%), mientras que los tratamientos **T1**, **T6**, **T2**, **T8** y **T12** produjeron una remoción de HFM menor al 20% y el tratamiento **T3** fue el que presentó la menor remoción con 1.6%. La degradación del petróleo puede ser compleja (Chemlal *et al.*, 2012), pero en este proceso por biorremediación se observaron diferentes valores de remoción, esta variación en los diferentes tratamientos está relacionado principalmente a las diferentes condiciones propias de cada tratamiento. En los controles **C** se obtuvo una remoción del 2.8% de HFM, mientras que en el **CH20** se observó una remoción del 21.0% de HFM, lo que indica que el sólo hecho de adicionar agua se promueve la actividad microbiológica y el proceso de biorremediación, debido a que se favorece la dilución de nutrientes y condiciones para el desarrollo de los microorganismos (Henry y Heinke, 1999). En el análisis de varianza para determinar si en los resultados de remoción para HFM en los 20 días había diferencia entre los tratamientos, se observó que esta no fue significativa (Ver Anexo estadístico). Las

mejores condiciones para la remoción de HFM a los 20 días, tratamiento **T5**, fueron valores bajos de humedad, BIOFERTIBUAP, KH_2PO_4 , K_2HPO_4 y Fe SO_4 y valores altos de paja de trigo, grano de café, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea, BIOFOSFOBUAP y MgSO_4 .

Por otra parte los valores de remoción de HFP fluctuaron entre 33.2 y 66.5% (**Fig. 5**). Los tratamientos que presentaron mayor remoción en orden descendente fueron **T6**, **T4**, **T10**, **T2** y **T11**. Sin embargo, **T5**, **T1** y **T3** mostraron valores menores a 40% de remoción. El análisis de varianza de los tratamientos para remover los HFP fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico), indicando que las diferentes condiciones de cada tratamiento afectan de diferente forma la remoción. El control **C** produjo el 11.4% de remoción, mientras que el **CH2O** produjo nuevamente una remoción media, del 30.9% del HFP. Lo anterior puede deberse a que la humedad es un factor prioritario en el crecimiento y actividad biológica de los microorganismos que contribuyen a la biodegradación de contaminantes del suelo (Cho *et al.*, 2001). Las mejores condiciones para remoción de HFP a los 20 días, de acuerdo a las variables originales del diseño, fueron las del tratamiento **T6** con valores bajos de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BIOFOSFOBUAP, K_2HPO_4 , Fe SO_4 y MgSO_4 y valores altos de paja de trigo, grano de café, humedad, urea, BIOFERTIBUAP y KH_2PO_4 .

Es interesante mencionar que la remoción de HFP fue mayor que la de HFM, indicando probablemente que la degradación de hidrocarburos de la fracción pesada, al degradarse, aumenta en principio la proporción de hidrocarburos de la HFM y que posteriormente se observa la degradación de la fracción media, mostrando una aparente degradación lenta de las fracciones medias debido al aumento de su concentración. De acuerdo a lo anterior, el seguimiento de la degradación de hidrocarburos puede ser mediante las fracciones medias, debido a que son las que aumentan su concentración durante la biorremediación. Pero para alcanzar valores menores a lo establecidos en la normatividades es importante determinar ambas fracciones.

Remoción de HFM e HFP a los 40 días

Después de 40 días de tratamiento la degradación de HFM fue mayor que a los 20 días, alcanzando valores de remoción entre 18.8 y 50.6% (**Fig. 4**). Los valores altos se

presentaron en **T7**, **T11**, **T12** y **T4**. De estos tratamientos, **T7** y **T4** también produjeron valores altos de remoción de hidrocarburos a los 20 días. El aumento de la remoción en relación al tiempo de tratamiento se puede atribuir al aumento, adaptación y estabilidad de las poblaciones degradadoras y que al disminuir gradualmente la concentración de hidrocarburos se permita el desarrollo de otras poblaciones de microorganismos menos tolerantes a los hidrocarburos pero que también contribuyen con su degradación. De la misma manera que en los casos anteriores, el control **C** presentó la menor remoción de hidrocarburos (16.8%), y en **CH20** se obtuvo un valor de 37.4%. Para determinar si en los resultados de remoción para HFM a los 40 días había diferencia entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza observando que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). Las cantidades de las variables de acondicionamiento más adecuadas para la remoción de HFM a los 40 días fueron las del tratamiento **T7** con valores bajos de paja de trigo, urea, KH_2PO_4 , Fe SO_4 y MgSO_4 y valores altos de grano de café, humedad, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP y K_2HPO_4 .

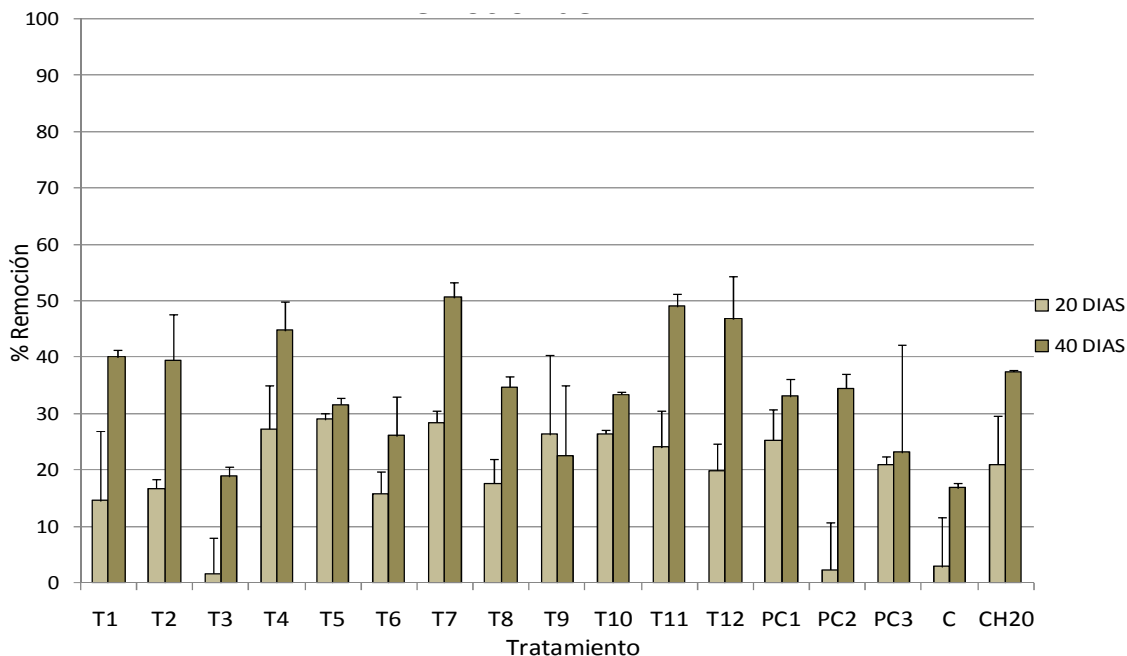


Figura 4. Remoción de HFM en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

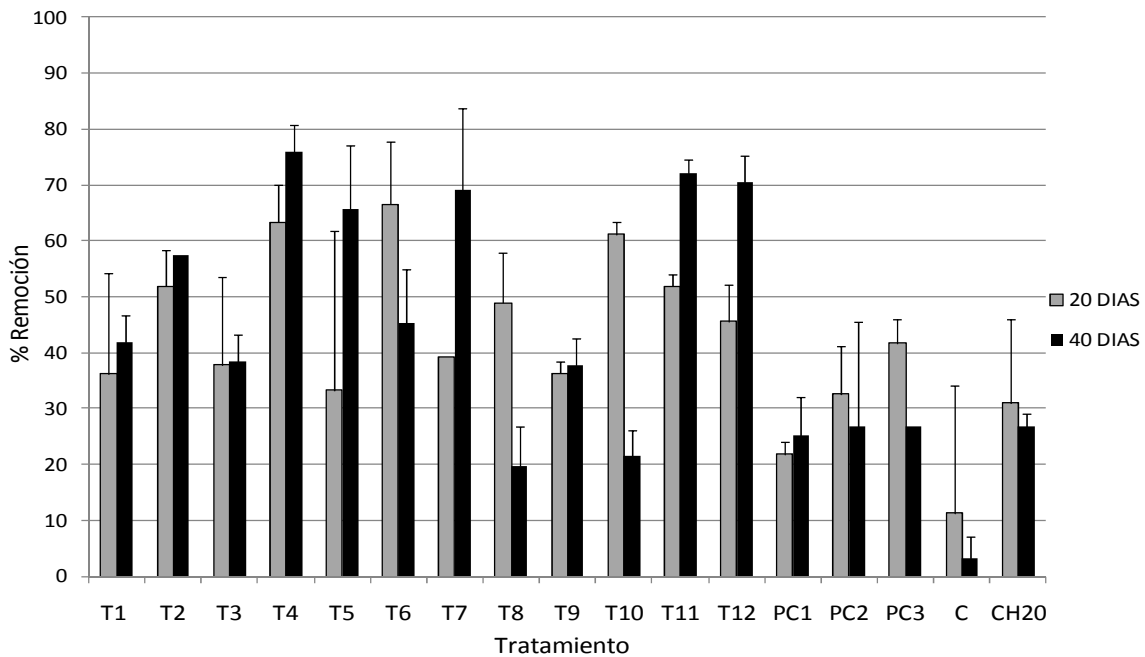


Figura 5. Remoción de HFP en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Cuando se compararon los niveles de remoción de HFP entre 20 y 40 días de tratamiento se observó que la remoción fue mayor a los 40 días (**Fig. 5**). La mayor remoción se observó en los tratamientos **T4**, **T11**, **T12**, **T7** y **T5** con valores entre 69.2 y 76.1%. La remoción más baja se presentó en los tratamientos **T8** y **T10**, con 19.6 y 21.5%, respectivamente. En algunos microcosmos la remoción fue mayor a los 20 días y menor a los 40 días, esto puede indicar un agotamiento de los nutrimentos y material orgánico que incidieron en la remoción de esta fracción de hidrocarburos. Al considerar los resultados de remoción a los dos tiempos de tratamiento, podemos indicar que los mejores tratamientos serían el **T4** y **T11**, ya que su alta remoción se mantiene durante el tiempo de remediación estudiado. En el análisis de varianza se compararon los valores de remoción de HFP para 40 días entre los diferentes tratamientos, observando que este fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). En cuanto a que condiciones presentaron mayor remoción de HFP, estas fueron las del tratamiento **T4** con valores bajos de grano de café, urea, BIOFOSFOBUAP,

K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , y valores altos de paja de trigo, humedad, $(NH_4)_2SO_4$, BIOFERTIBUAP, $Fe SO_4$ y $MgSO_4$.

Remoción de Plaguicidas OCs a los 20 días

Remoción de heptacloro

Por otra parte en cuanto a la remoción de plaguicidas OCs en los microcosmos, se observó que la remoción de heptacloro más alta se produjo con los tratamientos **T1** y **T2** (46.1 y 52.6%, respectivamente) (**Fig. 6**), mientras que los tratamientos **T3**, **T4**, **T6**, **T7** y **T8** mostraron valores entre 19.4 y 30.8% de remoción. Los tratamientos **T5**, **T9**, **T10**, **T11** produjeron la menor remoción del heptacloro de entre 12.7 y 0%. En el control **C** se observó una remoción mayor que otros tratamientos con 24.6%, mientras que **CH2O** mostró valores menores a la mayoría de los tratamientos con 9.1%. Para la remoción de heptacloro, de igual manera que en los otros contaminantes, se quería saber si existía una diferencia entre los tratamientos, para ello con ayuda del análisis de varianza se determinó que esta si existió siendo significativa ($p < 0.05$). Para este plaguicida OC las condiciones más adecuadas fueron valores bajos de las variables humedad, urea, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP y $MgSO_4$ y valores altos para paja de trigo, grano de café, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y $Fe SO_4$ que correspondieron al tratamiento **T2**.

Remoción de DDT

La remoción del plaguicida OC DDT total (2,4-DDT + 4,4-DDT) esta fue alta en los primeros 20 días con los tratamientos **T1** y **T2** (57.7 y 60.3%, respectivamente) (**Fig. 6**). Los microcosmos **T3**, **T4**, **T6**, **T7** y **T8** mostraron valores entre 19.0 y 40.2% de remoción, mientras que los tratamientos que no presentaron remoción de este plaguicida fueron **T10**, **T11** y **T12**. En general los controles **C** y **CH2O** presentaron remociones menores a los tratamientos con 24.4 y 7.9%, respectivamente. En el análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los tratamientos con respecto a la remoción de DDT total en 20 días, se observó que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). Al determinar que **T2** fue el tratamiento con mayor remoción para 20 días, las condiciones para su adecuada remediación fueron valores bajos de humedad, urea, BIOFERTIBUAP,

BIOFOSFOBUAP y $MgSO_4$ y valores altos para paja de trigo, grano de café, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y $Fe SO_4$.

Remoción de endosulfán

Para el plaguicida OC más utilizado en los últimos años, el endosulfán total (endosulfán I + endosulfán II), se presentó una remoción de hasta el 98.1% después de 20 días de tratamientos (**Fig. 6**). Estos fueron los esperados debido a que el tiempo de persistencia de este plaguicida es de meses o semanas. Los tratamientos **T4**, **T5**, **T6** y **T7** resultaron en una remoción del 92.4 al 98.1% de endosulfán, mientras que los tratamientos **T10** y **T12** se observó menor remoción (<28.7%), estos últimos dos tratamientos fueron constantes en la remoción ineficiente de los tres plaguicidas analizados. Mientras que en los controles **C** y **CH2O** se observaron remociones similares a los tratamientos con 59.5 y 85.1%, correspondientemente. Para la remoción de endosulfán total no hubo diferencia entre todos los tratamientos, por lo que el análisis de varianza no fue significativo (Ver Anexo estadístico). Para los 20 días iniciales de remediación, la mayoría de condiciones de los diferentes tratamientos fueron adecuadas para la remoción de endosulfán, sin embargo el tratamiento **T7** presentó la mayor remoción con las siguientes condiciones: variables con valores bajos de paja de trigo, urea, KH_2PO_4 , $Fe SO_4$ y $MgSO_4$ y valores altos de grano de café, humedad, $(NH_4)_2SO_4$, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP y K_2HPO_4 .

Remoción de Plaguicidas OCs a los 40 días

Remoción de heptacloro

En esta segunda fase del tratamiento la remoción de heptacloro presentó valores entre 16.1 y 47.9%. Los valores de remoción para 40 días fueron mayores a los 20 días en 7 de los tratamientos y menores en 5 tratamientos (**Fig. 6**). Para 40 días los tratamientos **T7** y **T8** mostraron los valores más altos con 47.9 y 41.1% y los valores bajos en de **T6**, **T9** y **T11** con 20.6, 21.6 y 16.1% de remoción, correspondientemente. En cambio para los controles **C** y **CH2O** con 0 y 15.2%, respectivamente, presentaron remociones menores a los tratamientos. En el análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los tratamientos con respecto a la remoción de heptacloro en 40 días, se observó que esta fue

significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). En esta caso, la mayor remoción de heptacloro a 40 días resultó para **T7** con condiciones de valores bajos para paja de trigo, urea, KH_2PO_4 , Fe SO_4 y MgSO_4 y valores altos de grano de café, humedad, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP y K_2HPO_4 .

Remoción de DDT

En cuanto a la remoción de DDT total en los 40 días, se observó que hubo una mayor remoción en la mayoría de los tratamientos con respecto de los 20 primeros días (**Fig. 6**), esto puede indicar que debido a la mayor persistencia de este plaguicida la remediación requiere mayor tiempo de tratamiento. Los tratamientos **T7**, **T8**, **T10** y **T11** presentaron los valores más altos de remoción de DDT total, con datos de 48.1, 50.7, 41.7 y 58.3%, respectivamente. Mientras tanto para los controles **C** con 18.0% y **CH2O** con 28.4%, estos valores fueron menores comparados con los tratamientos. En los 40 días el análisis de varianza de los tratamientos no fue significativo, por lo que indica que en cuanto a la remoción de DDT total para 40 días no existe diferencia entre los tratamientos (Ver Anexo estadístico). Para este plaguicida persistente, se pudo observar que la mayor remoción resultó en el tratamiento **T11**: valores bajos de paja de trigo, humedad, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea y K_2HPO_4 y valores altos de grano de café, BIOFERTIBUAP, BIOFOSFOBUAP, KH_2PO_4 , Fe SO_4 y MgSO_4 .

Remoción de endosulfán

Finalmente en la segunda etapa de remediación se observó que el endosulfán total presentó valores menores en comparación con los resultados de los 20 días en la mayoría de los microcosmos (**Fig. 6**). Los tratamientos **T4**, **T7** y **T8** presentaron los valores de 81.6, 68.9, 65.9% que fueron los más altos. Por otro lado, los valores bajos oscilaron entre 43.3 y 49.0 % en **T9**, **T10**, **T11** y **T12**. Las remociones de los controles **C** y **CH2O** fueron menores a la mayoría de los tratamientos con 28.0 y 51.6, respectivamente. La remoción de este plaguicida comparado con heptacloro y DDT total fue considerablemente mayor en los 20 y 40 días, esto está relacionado con el tiempo de persistencia o vida media de cada uno de estos compuestos. En el análisis de varianza para determinar diferencias entre los tratamientos con respecto a la remoción de endosulfán total en 40 días, se observó que esta

no fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). En cuanto a las mejores condiciones para la remoción de endosulfán total estas fueron: valores bajos de grano de café, urea, BIOFOSFOBUAP, K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , y valores altos de paja de trigo, humedad, $(NH_4)_2SO_4$, BIOFERTIBUAP, $Fe SO_4$ y $MgSO_4$, que correspondieron al microcosmos **T4**.

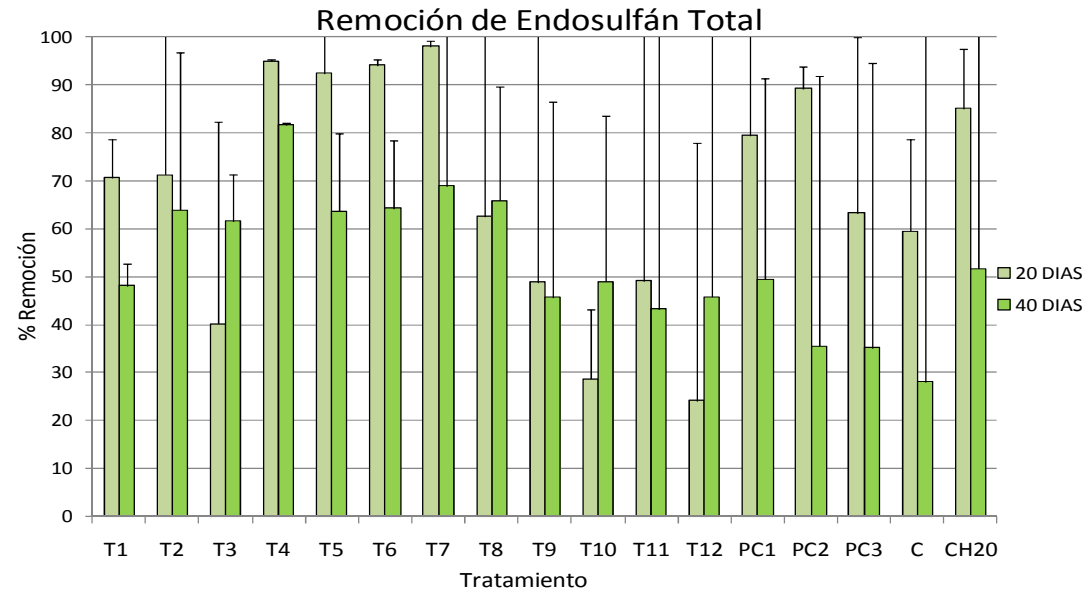
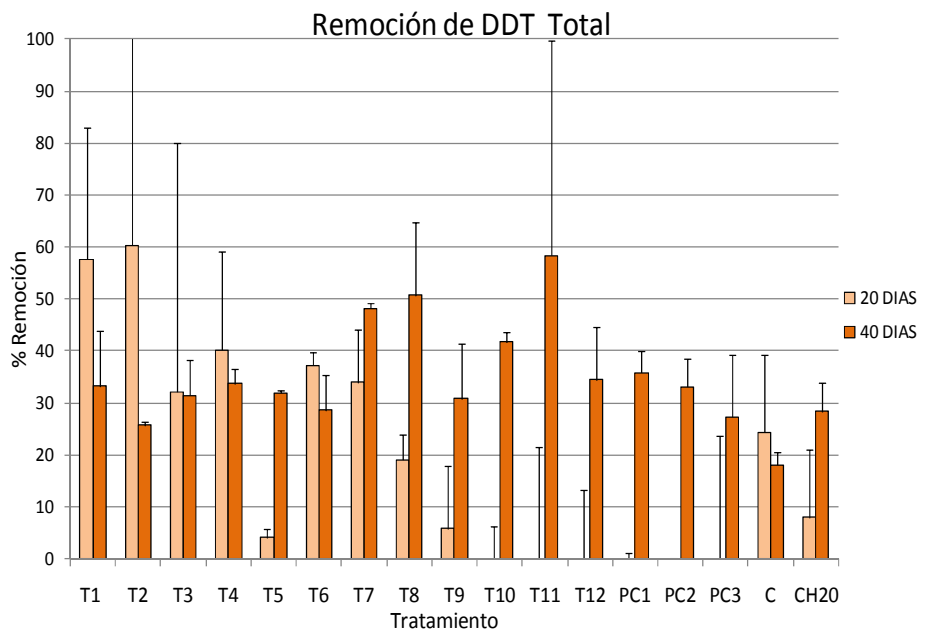
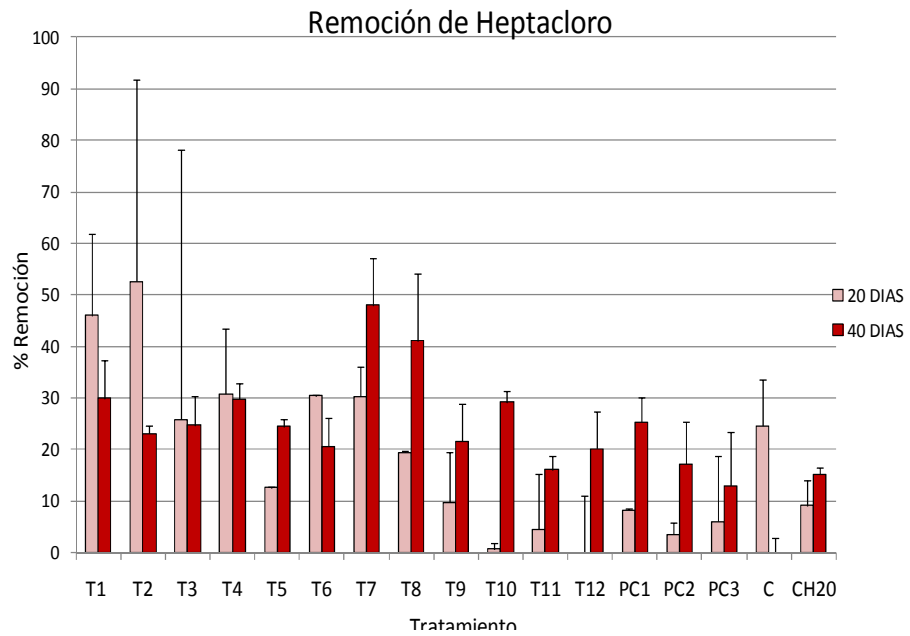


Figura 6. Remoción de Plaguicidas (OCs) en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño experimental Plackett-Burman. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Efecto de las variables en el diseño experimental Plackett-Burman

Posteriormente de haber obtenido los resultados de remoción de los contaminantes en cada tratamiento, se realizó un análisis de las variables para determinar si estas afectan positiva o negativamente a la remoción. El efecto positivo significa que la variable en su valor alto (+1) promueve una mayor remoción y el efecto negativo indica que el valor bajo (-1) promueve la mayor remoción.

Efecto de las variables a los 20 días

De acuerdo a los resultados se observó que para los primeros 20 días de tratamiento las variables **A** (paja de trigo), **C** (humedad), **D** ((NH₄)₂SO₄), **G** (BIOFOSFOBUAP), **H** (KH₂PO₄) y **J** (FeSO₄) presentaron un efecto positivo en la remoción de HFM y/o HFP (**Tabla 4**). Cabe señalar que la paja de trigo presentó un efecto positivo para ambas fracciones de hidrocarburos, lo que indica que este material texturizante durante los 20 primeros días de tratamiento favorece en cantidades altas el proceso de biorremediación, esto debido a que incrementa la porosidad del suelo y disposición del oxígeno (Navarro *et al.*, 1995). Asimismo, de manera interesante el biofertilizante BIOFERTIBUAP, también afectó de manera positiva la remoción de ambos hidrocarburos. De manera contrastante, el grano de café, urea y K₂HPO₄, presentaron un efecto negativo para la remoción de HFM e HFP, esto señala que es estas variables deben añadirse a cantidades bajas.

Por otra parte, para los plaguicidas OCs las variables **A** (paja de trigo), **B** (Grano de café), **C** (humedad), **D** ((NH₄)₂SO₄), **F** (BIOFERTIBUAP), **G** (BIOFOSFOBUAP), **H** (KH₂PO₄), **I** (K₂HPO₄), **J** (Fe SO₄) y **K** (MgSO₄) son las variables que presentan un efecto positivo en la remoción de los contaminantes. Vale la pena destacar que para la remoción de los tres plaguicidas OCs las variables paja de trigo, grano de café, humedad y KH₂PO₄, presentaron efecto positivo. Esto demuestra que para una adecuada biorremediación de estos plaguicidas, en la etapa inicial, son necesarios los materiales texturizantes, humedad, fuente de nitrógeno y fósforo. Por el contrario la urea fue la única variable que afecto negativamente a la remoción de OCs, esto puede atribuirse a que la fertilización de un suelo con urea puede provocar cambios en el pH afectando a las comunidades microbianas (Ge *et*

al., 2008). Lo anterior indica que el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ es una mejor fuente de N para la biorremediación. De igual manera, la mejor fuente de P considerando los efectos positivos para los primeros 20 días de tratamiento fue el KH_2PO_4 .

Efecto de las variables a los 40 días

Por otro lado a los 40 días, las variables de mayor efecto positivo en la remoción de hidrocarburos HFM e HFP fueron; **B** (grano de café), **D** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), **F** (BIOFERTIBUAP), **G** (BIOFOSFOBUAP), **J** (Fe SO_4) y **K** (MgSO_4) (**Tabla 4**). Al contrario de los 20 días de tratamiento, la paja de trigo presentó un efecto negativo en cantidades altas para la remoción de hidrocarburos, por lo que a los 40 días esta variable no necesita cantidades altas para favorecer la remediación. Por su parte la Humedad, Urea, KH_2PO_4 y K_2HPO_4 presentaron en efecto negativo para ambas fracciones de hidrocarburos. En contraste el BIOFERTIBUAP, de igual forma que a los 20 días, demostró un efecto positivo para HFM e HFP, que indica que la presencia de esta variable beneficia el proceso de remoción de hidrocarburos durante ambos tiempos de tratamiento.

Tabla 4. Efecto de las variables en la remoción de HFM, HFP y OCs en el suelo agrícola, obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman

Variables	Tratamiento									
	20 Días					40 Días				
	Remoción					Remoción				
	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	$\Sigma\text{Endosulfán}$	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	$\Sigma\text{Endosulfán}$
A = Paja de trigo (%)	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
B = Grano de café (%)	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
C = Humedad (%CC)	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+
D = $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g)	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
E = Urea $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (g)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F = BIOFERTIBUAP N (%)	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
G= BIOFOSFOBUAP P (%)	+	-	-	-	+	+	-	+	+	-
H= KH_2PO_4 (g)	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
I= K_2HPO_4 (g)	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
J= Hierro (Fe SO_4) (g)	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+
K= MgSO_4 (g)	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Para los plaguicidas a los 40 días de tratamiento las variables con efecto positivo en la remoción fueron; **A** (paja de trigo), **B** (grano de café), **C** (humedad), **D** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), **F** (BIOFERTIBUAP), **G** (BIOFOSFOBUAP), **H** (KH_2PO_4), **I** (K_2HPO_4) y **J** (Fe SO_4). Es importante destacar que la humedad y el BIOFERTIBUAP mostraron un efecto positivo para Heptacloro, DDT y Endosulfán para 40 días, reiterando su importancia en la remediación de plaguicidas OCs e hidrocarburos. Finalmente, las variables urea y MgSO_4 presentaron un efecto negativo para todo los OCs. La urea, al igual que para hidrocarburos no favorece la remoción de contaminantes orgánicos.

Aunque no existen referencias sobre el uso de biofertilizantes en la remediación, el BIOFERTIBUAP, que contiene bacterias fijadoras de N, presentó efectos positivos durante la remediación de ambos tipos de contaminantes orgánicos. Así pues, añadir este consorcio de microorganismos beneficia la biorremediación de plaguicidas OCs e hidrocarburos en suelo, esto mediante la fijación del N atmosférico y funcionando como una fuente de N para las otras poblaciones microbiológicas.

Para la optimización de las variables en la remoción de estos contaminantes se consideraron solamente las variables $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y Humedad, debido a que presentaron el mayor efecto (positivo) en los diferentes tipos de contaminantes y fueron significativas, estadísticamente ($p < 0.05$) (**Tabla 5**). Las demás variables se mantuvieron fijas: las variables significativas positivas a valor alto y las negativas a valor bajo, mientras que las variables no significativas se establecieron a los valores bajos. Esto es importante para disminuir costos de material y nutrientes si se plantea aplicar a un nivel de campo y escalar. Para realizar la optimización de la tecnología de remediación se efectuó un diseño factorial, manteniendo fijas las variables no seleccionadas y se establecieron diferentes valores a las dos variables $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y humedad hasta obtener la mayor remoción de los contaminantes.

Tabla 5. Modelos para la remoción de hidrocarburos y plaguicidas para las diferentes variables del diseño Plackett-Burman.

Variables	Tratamiento									
	20 Días					40 Días				
	Remoción					Remoción				
	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán
	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción
	HFM =	HFP =	Heptacloro =	DDT =	Endosulfán =	HFM =	HFP =	Heptacloro =	DDT =	Endosulfán =
	+19.78	+44.55	+18.76	+19.37	+67.17	+35.25	+46.27	+25.66	+36.33	+54.82
A = Paja de trigo (%)	+0.99 * A	+4.36 * A	+6.95 * A	+9.06 * A	+10.75 * A	-0.61 * A	-5.3E-003 * A	-1.20 * A	<u>-4.92</u> * A	+3.30 * A
B = Grano de café (%)	-1.38 * B	-0.92 * B	<u>+4.14</u> * B	+3.77 * B	+9.59 * B	-0.56 * B	+6.74 * B	-1.21 * B	-0.059 * B	+2.47 * B
C = Humedad (%CC)	-3.09 * C	+0.99 * C	<u>+8.56</u> * C	+12.51 * C	<u>+12.17</u> * C	-0.64 * C	-2.90 * C	+4.95 * C	+0.24 * C	+6.59 * C
D = (NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	<u>+3.59</u> * D	-2.17 * D	<u>+3.98</u> * D	+3.02 * D	<u>+13.46</u> * D	+0.79 * D	+3.01 * D	+3.95 * D	-0.57 * D	+6.48 * D
E = Urea CO(NH ₂) ₂ (g)	-1.18 * E	-0.36 * E	<u>-5.46</u> * E	-7.83 * E	-3.47 * E	<u>-8.64</u> * E	-13.26 * E	-0.43 * E	-1.53 * E	-0.14 * E
F = BIOFERT N (%)	<u>+4.09</u> * F	+5.41 * F	<u>-4.16</u> * F	-4.67 * F	+4.38 * F	<u>+1.25</u> * F	+2.38 * F	+0.16 * F	+2.83 * F	+0.32 * F
G= BIOFOSFO P (%)	+2.71 * G	-2.56 * G	<u>-2.98</u> * G	-5.07 * G	+2.33 * G	+3.41 * G	-2.97 * G	+4.06 * G	<u>+6.62</u> * G	-2.00 * G
H= KH ₂ PO ₄ (g)	-1.47 * H	+0.93 * H	<u>+5.21</u> * H	+5.80 * H	+1.52 * H	-1.17 * H	-5.60 * H	-1.99 * H	+0.53 * H	-3.29 * H
I= K ₂ HPO ₄ (g)	-1.64 * I	-3.90 * I	+5.63 * I	+7.44 * I	-4.98 * I	-2.34 * I	-6.92 * I	+2.03 * I	-2.21 * I	-2.29 * I
J= Hierro (Fe SO ₄) (g)	-1.69 * J	+4.81 * J	+0.39 * J	+1.06 * J	-6.80 * J	+0.22 * K	-3.76 * J	-0.054 * J	+2.88 * J	+2.40 * J
K= MgSO ₄ (g)	-0.18 * K	-4.57 * K	-0.31 * K	-0.89 * K	+1.44 * K	-2.03 * K	+4.03 * K	-2.95 * K	-0.83 * K	-1.17 * K

En negrita y subrayadas las variables significativas (p<0.05). El asterisco (*) significa multiplicación.

Optimización de la degradación de hidrocarburos y plaguicida OCs mediante un diseño factorial 2² con puntos centrales

De acuerdo a los resultados obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman para la remoción de hidrocarburos y plaguicidas OCs, se realizó un diseño factorial 2² mediante microcosmos para poder obtener el modelo de primer orden considerando las dos variables significativas Humedad y (NH₄)₂SO₄ (variables con efecto aditivo) y optimizar la remediación de los contaminantes (Tabla 6). Con este fin se establecieron las variables fijas y sus valores altos o bajos con respecto al efecto en la remoción de contaminantes en el diseño previo de Plackett-Burman. A los 20 días de tratamiento se realizó la determinación de nutrientes y se ajustó el sistema nuevamente para garantizar la biorremediación más adecuada.

En la muestra de suelo agrícola se determinó el pH, la humedad, la capacidad de campo, la cantidad de MO, de N y de P. Además de las concentraciones iniciales de HFM e HFP de 16866.6 y 13404.96 ppm, respectivamente, para determinar la remoción de OCs se adicionaron al suelo 5 ppm de heptacloro, DDT y endosulfán.

En la matriz experimental factorial 2² las variables de efecto aditivo se establecieron con 2 valores de Humedad (40 y 50 %) y (NH₄)₂SO₄ (C:N; 100:10 y 100:7) (Tabla 7), para obtener 4 tratamientos y 5 puntos centrales. Las variables de respuesta fueron el porcentaje de remoción de HFM, HFP y plaguicidas OCs (heptacloro, DDT y endosulfán) a los 20 y 40 días y la producción de CO₂ cada 2 días.

Tabla 6. Variables fijas establecidas para diseño factorial 2²

	Natural	Codificada
Paja (%)	+1*	+1*
Grano Verde Café (%)	+1*	+1*
BIOFERTIBUAP N (%)	1.0	+1
BIOFOSFOBUAP P (%)	1.0	+1
KH ₂ PO ₄ (g)**	0.08	+1
FeSO ₄ (g)	0.08	+1
MgSO ₄ (g)	0.02	-1

* Cantidades omitidas por patente

** Ajuste C:N:P (100:10:1)

Tabla 7. Matriz experimental para obtener el modelo del primer orden con las variables ξ_1 =Humedad (%CC) y ξ_2 =(NH₄)₂SO₄ (C:N)

Tratamiento	Natural		Codificada	
	ξ_1	ξ_2	x ₁	x ₂
T1	40	100:7	-1	-1
T2	50	100:7	+1	-1
T3	40	100:10	-1	+1
T4	50	100:10	+1	+1
PC1	45	100:8.5	0	0
PC2	45	100:8.5	0	0
PC3	45	100:8.5	0	0
PC4	45	100:8.5	0	0
PC5	45	100:8.5	0	0

Producción de CO₂ a los 20 días de tratamiento

En los resultados de la producción total de CO₂ durante los 20 días de remediación se observó que es mayor a los 40 días (Fig. 7), además de que los tratamientos (T1 a T4) y puntos centrales (PC) presentaron concentraciones similares con valores de 4.4 a 4.8 mgCO₂/g de suelo. En el control CH2O presentó una menor producción de 1.1 mgCO₂/g de suelo en comparación con los tratamientos, para el control C la producción fue prácticamente nula. Es necesario señalar que la similitud de la producción de CO₂ en los tratamientos indica una optimización del proceso mediante la modificación de las variables Humedad y (NH₄)₂SO₄.

Producción de CO₂ a los 40 días de tratamiento

En los 40 días de tratamiento la producción total de CO₂ disminuyó con respecto a los 20 días en todos los tratamientos y puntos centrales presentando valores de 1.5 a 2.3 mgCO₂/g de suelo (Fig. 7), indicando que el proceso de remediación quizá llegue a un punto estacionario con respecto a sus poblaciones involucradas, esta disminución de CO₂ no puede atribuirse a la disminución de nutrientes debido a que todos los microcosmos fueron reacondicionados a los 20 días. Los controles mantienen prácticamente las mismas concentraciones de CO₂. Por otra parte es importante mencionar que esta producción de CO₂ no es directamente proporcional a la remoción de los contaminantes, esto también fue observado en los experimentos de remediación realizados anteriormente. Por lo que podemos concluir que la presencia de CO₂ es un indicador de la activación del circuito microbiano y de sus diversos procesos a parte de la remoción de contaminantes.

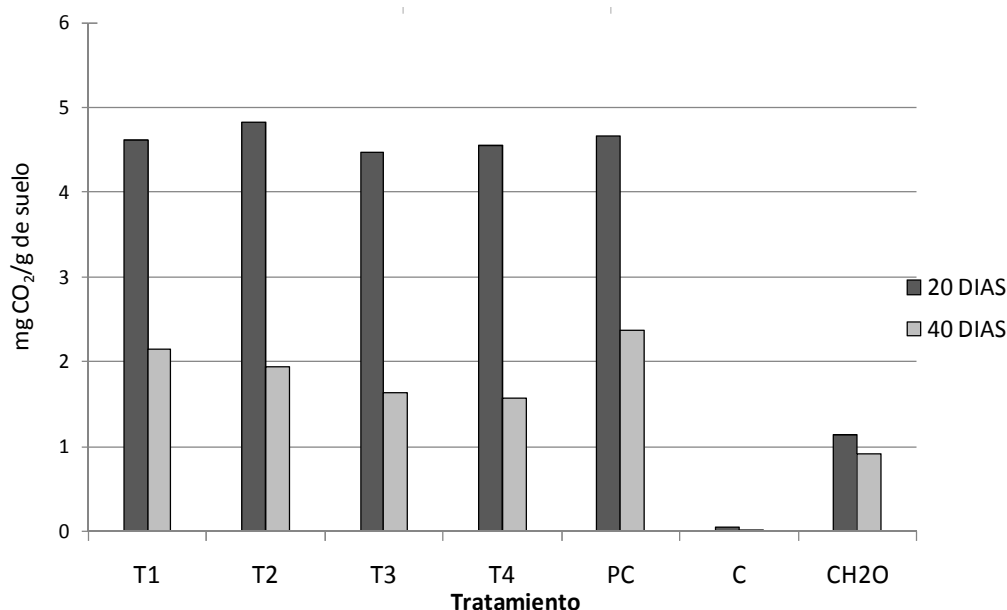


Figura 7. Producción total de CO₂ en los diferentes tratamientos de suelo. Diseño Factorial para optimización. Valores son puntuales n=1.

Remoción de HFM e HFP a los 20 días

Para este diseño factorial en la remoción de HFM a los 20 días, se obtuvieron valores de 46.4 a 56.5% en los tratamientos (**T1** a **T4**), 40.8% para los puntos centrales (**PC**) y 22.3 a 70.8% para los controles (**C** y **CH2O**) (**Fig. 8**). Los tratamientos **T1** y **T2** presentaron los mayores valores de remoción para HFM 56.5 y 56.1%, respectivamente. Pero el control **CH2O** al que sólo se añadió agua presenta la mayor remoción con 70.86 %, demostrando que para HFM el añadir agua puede activar a los microorganismos y efectuar una remoción. En todos los tratamientos se observa que los HFM se degradan más durante los primeros 20 días y esta degradación disminuye en los 40 días. En el análisis de varianza para determinar si en la remoción para HFM para 20 días había diferencia entre los tratamientos, se observó que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). El tratamiento **T1** con mayor remoción de HFM presentaba las siguientes condiciones: 40% de humedad y una relación de C:N de 100:7, que indica que el N en menor cantidad, para este suelo agrícola contaminado, es más adecuado para la remediación de HFM. Aunque en otros trabajos generalmente se trabajan con proporciones de 100:10 (Acuña *et al.*, 2008; Chemlal *et al.*, 2012). Por otro lado, los valores máximos de remoción de HFM en este diseño factorial fueron mayor a los observados en el

diseño previo Plackett-Burman para 20 días, esto nos indica que el proceso de biorremediación se está optimizando adecuadamente.

Mientras que para la remoción de HFP valores de 17.5 a 53.0% se obtuvieron de los tratamientos (**T1** a **T4**) y 0% para los puntos centrales y controles (**Fig. 9**). Los tratamientos **T2** y **T4** presentaron los mayores porcentajes de remoción con 43.7 y 53.0%, respectivamente. Para el control **CH₂O** no hubo remoción de HFP, al contrario que HFM, lo cual puede indicar que para degradar las cadenas más largas los microorganismos requieren de nutrientes además de sólo agua. Para establecer si en los resultados de remoción para HFM a los 40 días había diferencia entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza observando que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). Las condiciones de tratamiento con mayor porcentaje de remoción para HFP, tratamiento **T4**, fueron 50% de humedad y una relación de C:N 100:10, condiciones contrarias para HFM. Lo anterior demuestra que para el proceso de remediación de HFP se requieren mayor humedad y mayor cantidad de N debido a la dificultad de su degradación. Para HFP las remociones de este diseño factorial fueron menores en comparación con el anterior diseño Plackett-Burman para 20 días, esto debido a que los microorganismos prefirieron degradar cadenas de HFM.

Remoción de HFM e HFP a los 40 días

En los 40 días de tratamiento en este diseño factorial la remoción de HFM presentó valores de 29.7 a 50.5% en los tratamientos (**T1** a **T4**), 39.9% para los puntos centrales (**PC**) y 0% en el control **C** y 42.1% para el control **CH₂O** (**Fig. 8**). Los tratamientos **T1** y **T4** presentaron los mayores valores de remoción con 50.5 y 42.4%, respectivamente. Pero el control **CH₂O** presentó menor remoción en comparación con los 20 días. Para determinar si en los resultados de remoción para HFM a los 40 días había diferencia entre los tratamientos, se realizó un análisis de varianza que fue significativo ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). En los 40 días la remoción de HFM disminuyó con respecto a la remoción a los 20 días. Las condiciones que aumentaron la remoción de HFM a 40 días fueron las mismas que para 20 días: 40% de humedad y una relación de C:N de 100:7, implementadas en **T1**, demostrando que estas condiciones son las adecuadas para la biorremediación de esta fracción de hidrocarburos. Con respecto al diseño previo para 40 días Plackett-Burman, los valores del diseño factorial fueron similares para HFM a los 40 días.

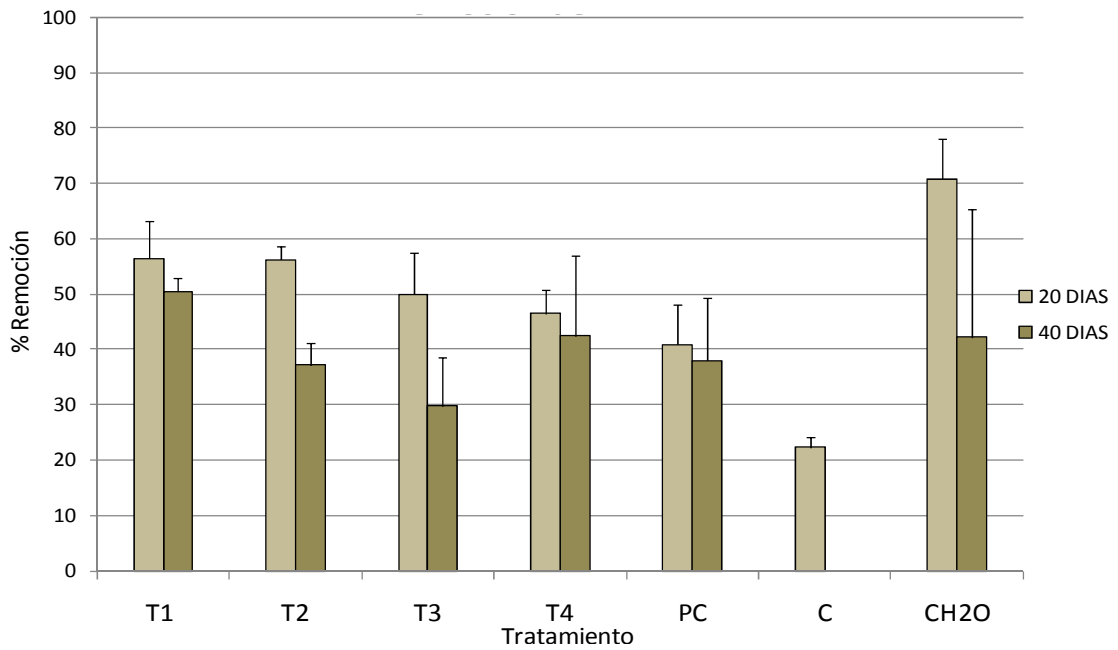


Figura 8. Remoción de HFM en los diferentes tratamientos. Diseño Factorial para optimización. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

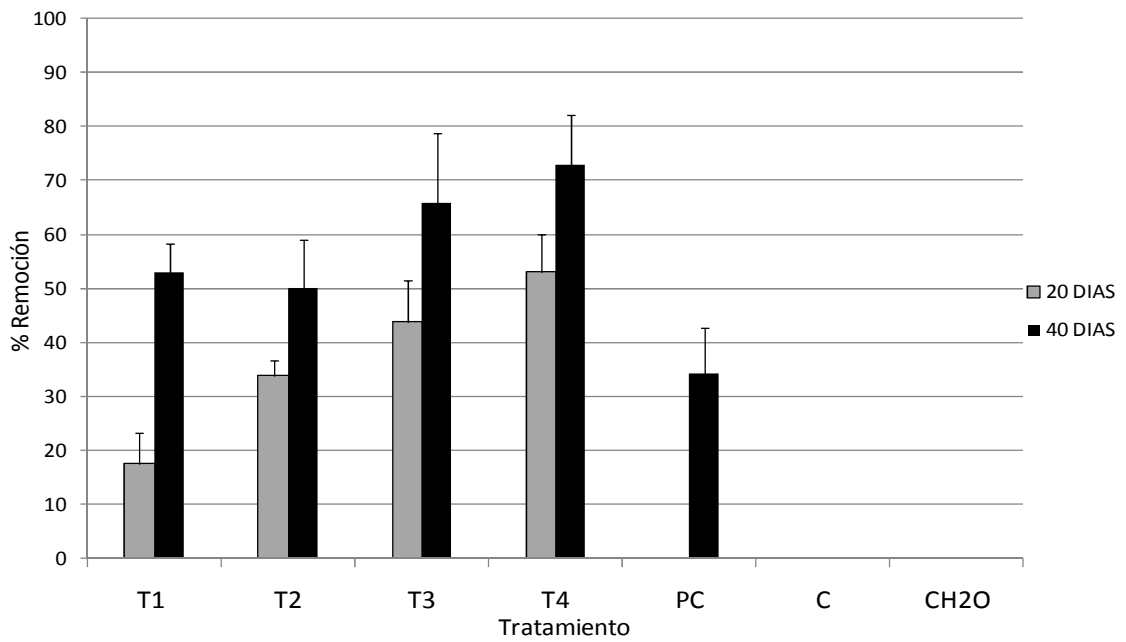


Figura 9. Remoción de HFP en los diferentes tratamientos. Diseño Factorial para optimización. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Para los resultados de este diseño factorial la remoción de HFP, en los tratamientos (**T1** a **T4**), los valores oscilaron entre 49.9 y 72.9 %, para los puntos centrales 34.1% y 0% para ambos controles (**C** y **CH2O**) (**Fig. 9**). Los tratamiento **T3** y **T4** presentaron los mayores porcentajes con 65.9 y 72.9%, respectivamente. En la mayoría de los tratamientos la remoción de HFP aumentó a los 40 días indicando que para cadenas de hidrocarburos largas se requiere mayor tiempo de tratamiento. En el análisis de varianza se compararon los valores de remoción de HFP para 40 días entre los diferentes tratamientos, observando que este fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). Las mejores condiciones para remoción de HFP para 40 días fueron las mismas que para 20 días con 50% de humedad y una relación de C:N 100:10, estableciendo que el tratamiento **T1** resultó en el mejor tratamiento para fracciones pesadas. Al comparar los valores de remoción del diseño factorial y al diseño previo Plackett-Burman, los valores de remoción fueron similares.

En la remoción de hidrocarburos se observó que la remoción de HFM fue mayor que HFP a los 20 días y lo inverso a los 40 días, por lo que para saber realmente si la degradación de hidrocarburos inicia primero con las cadenas largas y después con fracciones medianas sería necesario realizar pruebas con marcadores y evaluar los degradación de los hidrocarburos (Ortiz *et al.*, 2003).

Remoción de Plaguicidas OCs a los 20 días

Remoción de heptacloro

En los primeros 20 días se observó que los tratamientos **T1** y **T2** presentaron los mayores valores de remoción de heptacloro con 50.9 y 50.7%, respectivamente (**Fig. 10**). El tratamiento **T3** presentó una remoción de 42.6% y **T4** fue el tratamiento con menor remoción de heptacloro con 39.1%. Los puntos centrales (**PC**) mostraron 41.1% de remoción, mientras que los controles **C** y **CH2O** 8.0 y 10.0% de remoción. Para la remoción de heptacloro a los 20 días se quería saber si existía una diferencia entre los tratamientos, para ello con ayuda del análisis de varianza se determinó que esta no existió siendo no significativa (Ver Anexo estadístico). El tratamiento **T1**, ligeramente mayor a **T2**, presentó la mayor remoción con 50% de humedad y una relación de C:N 100:10 como condiciones de tratamiento. No existen reportados trabajos de remoción para heptacloro. Con respecto al diseño previo Plackett-

Burman para 20 días, los porcentajes de remoción fueron mayores en este diseño factorial de optimización.

Remoción de DDT

En cuanto a la remoción del DDT total (2,4-DDT + 4,4-DDT) en lo primero 20 días del tratamiento de remediación, se observaron mayores valores en comparación con los otros plaguicidas, la mayoría de los tratamientos y puntos centrales presentaron valores mayores al 80%, presentando el valor máximo **T1** con 90.0%, y sucesivamente **T2**, **T3** y **T4** con 89.5, 86.6 y 85.1%, correspondientemente (**Fig. 10**). Los controles **C** y **CH2O** presentaron valores menores de 12%, indicando que la bioestimulación del suelo ayuda a degradar estos contaminantes orgánicos. En el análisis de varianza para determinar diferencia entre los tratamientos con respecto a la remoción de DDT total en 20 días, se observó que esta no fue significativa (Ver Anexo estadístico). Es interesante mencionar que los cuatro tratamientos con sus condiciones o variables correspondientes removieron de manera similar al DDT. Al respecto, en otra investigación se utilizó una relación de C:N 100:8 para le remediación de DDT obteniendo 94% de remoción (Betancur-Corredor *et al.*, 2015), resultados similares a los reportados a los obtenidos al presente trabajo. Para este plaguicida OC las remociones fueron mucho mayores con respecto al diseño previo Plackett-Burman a los 20 días, indicando que estas variables Humedad y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ son importantes para la remoción de este tipo de compuesto organoclorado.

Remoción de endosulfán

Para la remoción de endosulfán total (endosulfán I + endosulfán II) para los 20 días los resultados fueron altos con remociones mayores al 80 %. En todos los tratamientos los porcentajes de remoción fueron mayores que los 40 días (**Fig. 10**). El tratamiento con mayor remoción fue **T2** con 88.0%, **T1** con 87.2%, **T3** con 85.5% y el menor fue **T4** con 82.0%. El control **C** presentó 26.2% y **CH2O** 31.0% de remoción de endosulfán total, valores muy por debajo de los tratamiento bioestimulados. En cuanto a la remoción de endosulfán total a los 40 días hubo diferencia entre todos los tratamientos, por lo que el análisis de varianza fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). **T2** fue el tratamiento que presentó la mayor remoción con variables de 50% de humedad y proporción C:N de 100:7. Los porcentajes de remoción fueron similares a los 20 días del diseño Plackett-Burman para este plaguicida OC.

Remoción de Plaguicidas OCs a los 40 días

Remoción de heptacloro

En los 40 días de remediación la mayor remoción de heptacloro se presentó en el tratamiento **T2** con 50.4%, mientras que **T1** y **T4** mostraron 48.0 y 44.9% de remoción y en **T3** se observó la menor remoción con 35.2% (**Fig. 10**). Los puntos centrales (**PC**) presentaron 48.2% y los controles **C** y **CH2O** 10 y 15%. En el análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los tratamientos con respecto a la remoción de heptacloro en 40 días, se observó que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). El tratamiento **T2** con 50% de humedad y proporción C:N de 100:7, fueron las mejores condiciones para remoción de heptacloro. Los valores obtenidos en estos tratamientos del diseño factorial fueron superiores a la mayoría de los tratamientos del diseño Plackett-Burman, esto indica que el mejoramiento del proceso de biorremediación es indicado para este plaguicida.

Remoción de DDT

En los 40 días la remoción para DDT total presentó mayores valores que a los 20 días, el tratamiento **T2** presenta el máximo con 93.8% de remoción, seguido del **T1**, **T4** y **T3** con 93.5, 92.5 y 89.7%. Para **PC** la remoción fue de 92.2%, y valores de 9.0 y 8.0% para **C** y **CH2O**, respectivamente (**Fig. 10**). En el análisis de varianza para determinar si existía diferencia entre los tratamientos con respecto a la remoción de DDT total en 40 días, se observó que esta fue significativa ($p < 0.05$) (Ver Anexo estadístico). Las condiciones de cada tratamiento no pareció haber afectado la remoción de DDT. De la misma manera que a los 20 días, la remoción de DDT a los 40 días fue superior al diseño Plackett-Burman.

Remoción de endosulfán

La remoción de endosulfán total en los 40 días fue ligeramente menor en comparación a los 20 días. El tratamiento con mayor remoción fue **T2** con 84.0%, **T1** con 82.0%, **T4** con 80.9% y el menor fue **T3** con 75.9%. El control **C** presentó 30.0% y **CH2O** 35.0% de remoción de endosulfán total (**Fig. 10**). Con respecto a la remoción de endosulfán total no hubo diferencia entre todos los tratamientos, por lo que el análisis de varianza no fue significativo (Ver Anexo estadístico). Los porcentajes de remoción fueron equivalentes a los 20 días del diseño Plackett-Burman.

En general se observó que la remoción de hidrocarburos y plaguicidas OCs fueron similares a los 20 y 40 días, esto indica que el establecimiento de variables con diseños experimentales previos y la bioestimulación fue la adecuada, y que la optimización del proceso de biorremediación ha llevado a un mejor desempeño del sistema. Esto debido valores más altos de remoción con respecto a los experimentos realizados anteriormente.

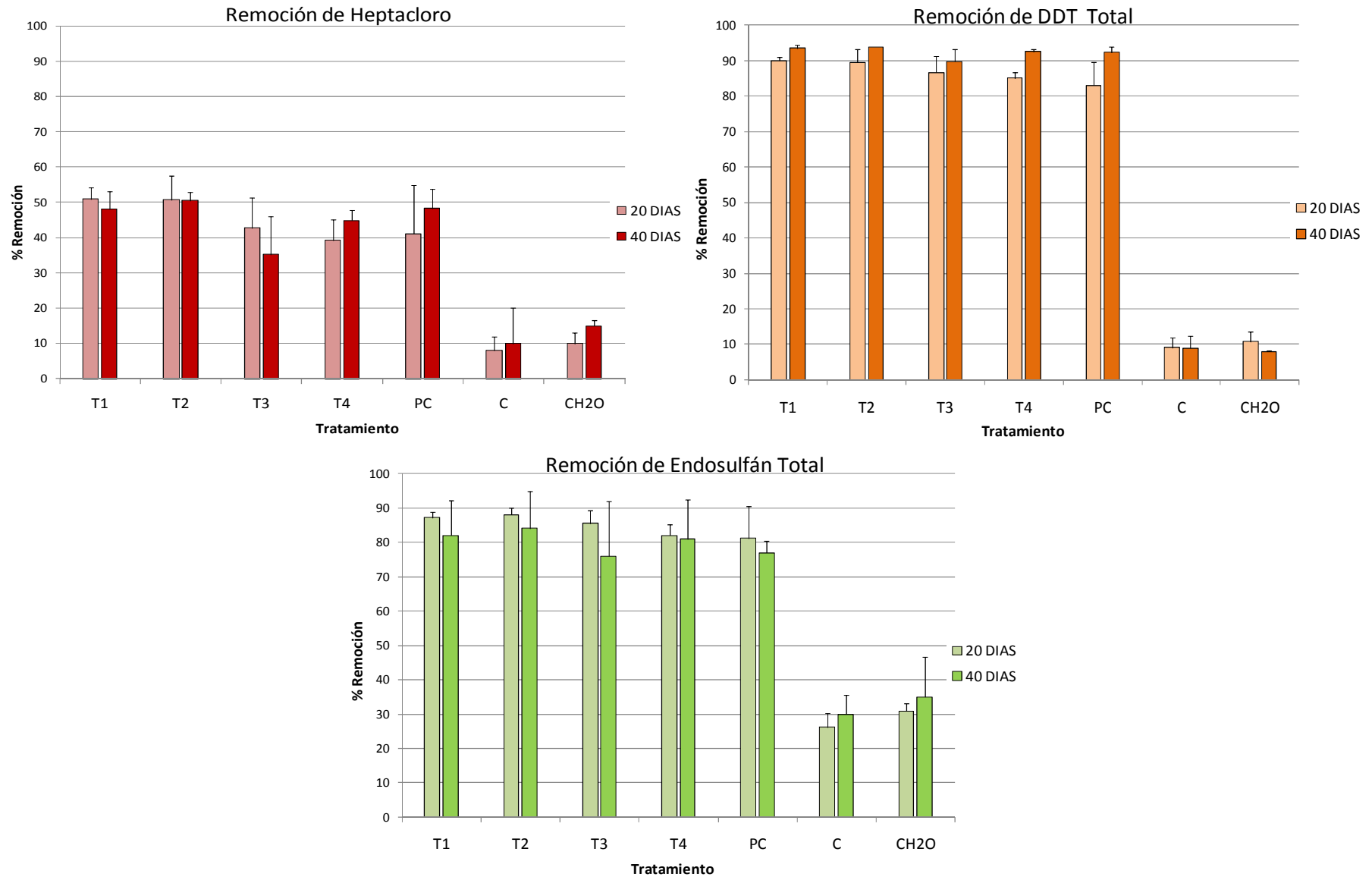


Figura 10. Remoción de Plaguicidas OCs en los diferentes tratamientos del suelo de Tepeaca, Puebla. Diseño Factorial para optimización. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Efecto de las variables en el diseño experimental factorial 2² con puntos centrales

Con los resultados de remoción de los contaminantes en cada microcosmos, se realizó un análisis de cómo las variables **Humedad** y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ afectan, de forma positiva o negativa, el proceso de remoción de los hidrocarburos y plaguicidas. El efecto positivo significa que la variable en su valor alto (+1) promueve una mayor remoción y el efecto negativo indica que el valor bajo (-1) promueve la mayor remoción. También se debe recordar que las otras variables, excluyendo **Humedad** y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se mantuvieron con valores fijos determinados por el diseño previo Plackett-Burman.

Para los 20 días en los tratamientos se observó que las variables **A** (humedad) y **B** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) presentaron un efecto negativo para la remoción de HFM y un efecto positivo para HFP (**Tabla 8**). En cambio para los plaguicidas OCs las variables **A** (humedad) y **B** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) presentaron un efecto negativo en la remoción de estos contaminantes. En el diseño Plackett-Burman a los 20 días los efectos observados para estas dos variables fueron diferentes a los obtenidos en el diseño factorial, esto debido a que los valores altos y bajos (+1, -1) fueron distintas (**Tabla 8 y 10**), indicando que variar la cantidad de estas variables fijas tiene un efecto en la remoción.

Por otra parte a los 40 días, las variables **A** (humedad) y **B** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) mostraron también un efecto negativo para la remoción de HFM y positivo para HFP (**Tabla 8**). Mientras que para los plaguicidas OCs, la variable **A** (humedad) presentó un efecto positivo en la remoción y la variable **B** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) un efecto negativo. De la misma forma los efectos obtenidos del diseño previo Plackett-Burman fueron diferentes a los obtenidos por el diseño factorial, indicando que los cambios en la cantidad de variables presentaron un efecto diferente en la remoción de los contaminantes a los 20 y 40 días.

De acuerdo a lo anterior, se concluye que en los primeros 20 días de remediación las variables **A** (humedad) y **B** ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) se mantendrán a un valor bajo (-1), Humedad= 40% y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4= 100:7$, debido a que en la mayoría de los contaminantes se observó un efecto negativo y no fue significativo (**Tabla 9**). En cambio para los 40 días de tratamiento la variable **A** (humedad) se mantendrá a un valor alto (+1), Humedad= 50%, por tener un efecto

positivo en la remoción de los contaminantes y **B** $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a un valor bajo (-1), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, por tener un efecto negativo (**Tabla 9**).

Finalmente con estos resultados el siguiente paso sería escalar este experimento de microcosmos a un nivel piloto o de campo, esto para comprobar los resultados de esta optimización de la remediación de un suelo agrícola contaminados con hidrocarburos y plaguicidas OCs.

Tabla 8. Efecto de las variables Humedad y (NH₄)₂SO₄ en la remoción de HFM, HFP y OCs en el suelo agrícola, obtenidos del diseño factorial 2² con puntos centrales

Variables	Tratamiento									
	20 Días					40 Días				
	Remoción					Remoción				
	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán
A= Humedad (%CC)	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+
B = (NH₄)₂SO₄ (C:N)	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-

Tabla 9. Modelos para la remoción de hidrocarburos y plaguicidas para las variables Humedad y (NH₄)₂SO₄ del diseño factorial 2² con puntos centrales.

Variables	Tratamiento									
	20 Días					40 Días				
	Remoción					Remoción				
	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán	HFM	HFP	Heptacloro	ΣDDT	ΣEndosulfán
	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción	Remoción
	HFM =	HFP =	Heptacloro =	DDT =	Endosulfán =	HFM =	HFP =	Heptacloro =	DDT =	Endosulfán =
	+48.92	+21.68	+44.48	+84.41	+84.41	+39.37	+52.74	+45.74	+92.38	+79.68
A= Humedad (%CC)	-0.96 * A	<u>+6.40</u> * A	-0.94 * A	-0.52 * A	-0.68 * A	-0.15 * A	+0.97 * A	+3.01 * A	+0.80 * A	+1.76 * A
B = (NH ₄) ₂ SO ₄ (C:N)	<u>-4.05</u> * B	<u>+11.38</u> * B	-4.95 * B	-1.95 * B	-1.92 * B	-3.89 * B	<u>+8.95</u> * B	<u>-4.61</u> * B	<u>-1.27</u> * B	-2.29 * B

En negrita y subrayadas las variables significativas (p<0.05). El asterisco (*) significa multiplicación.

Metabolitos secundarios y mecanismos que afectan la remoción de OCs

Es importante mencionar que en este trabajo en los experimento del diseño Plackett-Burman y diseño Factorial para optimización, se detectaron los metabolitos del DDT (DDE y DDD), metabolitos del endosulfán (endosulfán sulfato y endosulfán éter) y de heptacloro (Epóxido de heptacloro), pero en concentraciones cercanas al límite de detección de 0.01 ppb, estas concentraciones de metabolitos pueden explicarse por los siguientes mecanismos:

- a) Degradación de los metabolitos u otras rutas de degradación de los plaguicidas, esto debido a que en los cromatogramas existían otros compuestos que no se pudieron identificar, quizá esto indique otros metabolitos derivados durante el proceso. Debido a lo anterior, sería necesario analizar a fondo mediante cromatografía de gases/masas e identificar estos compuestos. Por otro lado, la utilización de indicadores de biodegradación y marcadores radioactivos puede ser una herramienta para determinar las rutas de degradación de los carbonos de estos contaminantes orgánicos a nivel laboratorio (Lee *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2004).
- b) La biosorción de los plaguicidas en los microorganismos, algunos microorganismos (baterías, levaduras y hongos) tienen la capacidad de adsorber en sus paredes celulares los contaminantes recalcitrantes que son difíciles de metabolizar, entre estos contaminantes se incluyen los plaguicidas OCs (Aksu, 2005; Kumar y Philip, 2006). Y debido a la bioestimulación y consecuente aumento de biomasa de microorganismos, esta biosorción pareciera aumentar en los tratamientos que en los controles.
- c) La volatilización de los plaguicidas OCs, se ha reportado el potencial intercambio suelo-aire de plaguicidas OCs (Syed *et al.*, 2013; Wong *et al.*, 2010), en este presente trabajo los controles presentaron baja remoción comparando con los tratamientos, lo cual puede indicar que algunos procesos derivados de la bioestimulación favorecen la volatilización. Esto indica ventajas del tratamiento realizado en esta investigación.
- d) La adsorción de los plaguicidas por el suelo puede haber disminuido las concentraciones en lugar de una degradación y afectado la remoción de plaguicidas. En los resultados obtenidos los controles presentaron menores remociones en comparación con los tratamientos, esto puede indicar que la actividad de la bioestimulación puede

cambiar las propiedades y características del suelo y afectar la adsorción (Kodešová *et al.*, 2011). Además se menciona que la interacción entre los plaguicidas y las sustancias húmicas de la MO participa activamente en la adsorción-desorción y degradación de estos contaminantes (Klavins *et al.*, 2006; Pacheco *et al.*, 2003).

Comparación de valores máximos de remoción de hidrocarburos y plaguicidas OCs con respecto a otros estudios

El comparar con otros trabajos nos proporciona una idea general de los resultados obtenidos y los anteriormente reportados, aunque es difícil realizar una comparación, debido a que las propiedades intrínsecas de cada suelo son muy diferentes y estas características fisicoquímicas y biológicas son elementales en los procesos de biorremediación, pero esta diversidad de suelos nos proporciona información perspicaz para determinar este proceso en diferentes condiciones. Por lo anterior, se realizó una comparación con otros estudios de remediación en suelo, y en su defecto en agua, para hidrocarburos (HTP, diesel) y plaguicidas OCs (DDT, heptacloro, endosulfán) y determinar si los máximos valores de remoción obtenidos en el presente estudio fueron similares a los reportados. En estos trabajos se realizó bioestimulación del suelo con nutrientes con fuentes de N y P, de manera similar al diseño realizado en esta investigación y algunos añaden otras fuentes de carbono como paja o glucosa. Los porcentajes máximos de remoción de contaminantes orgánicos obtenidos del diseño factorial para optimización fueron: HFM (56.50%), HFP (72.92%), heptacloro (50.97%), DDT total (93.87%) y endosulfán total (84.09%).

En cuanto a la remoción de hidrocarburos se comparó con trabajos de remoción de HTP debido a que existen pocos trabajos con las diferentes fracciones de hidrocarburos, en estos reportes se observaron remociones del 50 a 69% de remoción para HTP en suelo y para diesel una remoción de 70% (**Tabla 10**), los valores reportados son similares a la remoción de HFM en el presente trabajo, mientras que la remoción de HFP presenta un mayor valor, pero cabe mencionar que las concentraciones iniciales son diferentes y las condiciones de tratamiento.

Para los plaguicidas OCs se han reportado remociones en suelo mediante bioestimulación del suelo contaminado. En estos trabajos se determinaron remociones de 23.5 a 94.3% de DDT y de 67 a 100 % para endosulfán, estas remociones presentaron similitud a las obtenidas en el presente trabajo (**Tabla 11**). Para heptacloro no existen reportes de remediación en suelo, aunque existen trabajos donde reportan la remoción de heptacloro hasta el 79 % en medio líquido mediante el hongo *Pleurotus ostreatus* (Setyo *et al.*, 2013) y hasta el 90 % con el hongo *Phlebia sp.* (Xiao *et al.*, 2011).

Tabla 10. Remoción máxima en estudios de degradación de hidrocarburos en suelo

Concentración Inicial Hidrocarburos (ppm)	Nutrientes Proporción (C:N:P) Material orgánico	Valor máximo de remoción (%)	Referencia
HFM (16866.6) HFP (13404.96)	N y P (100:10:1) Grano de café y paja	HFM (50) HFP (72.92)	Este trabajo
Diesel (5800)	N y P (100:10:1) -	Diesel (70)	Chemlal <i>et al.</i> , 2012
HTP (28000)	N y P (100:10:1) -	HTP (50)	Sabaté <i>et al.</i> , 2004
HTP (58715)	N y P (100:2:0,02I) -	HTP (54.4)	Acuña <i>et al.</i> , 2008
HTP (1500)	N y P - paja	HTP (56.6)	Zhang <i>et al.</i> , 2008
HTP (58000)	N y P (100:10:1) Grano de café y paja	HTP (69)	Roldán-Martín <i>et al.</i> , 2008

Tabla 11. Remoción máxima en estudios de degradación de plaguicidas OCs en suelo

Concentración Inicial Plaguicidas OCs (ppm)	Nutrientes Proporción (C:N:P) Material orgánico	Valor máximo de remoción (%)	Referencia
Heptacloro (5) DDT (5) Endosulfán (5)	N y P (100:10:1) Grano de café y paja	Heptacloro (50.97) DDT total (93.87) Endosulfán total (84.09)	Este trabajo
Σ OCs (500)	N y P - -	Σ OCs (90)	Qureshi <i>et al.</i> , 2008
DDT (7.46)	N y P - -	DDT (67.16)	Ortíz <i>et al.</i> , 2013
DDT (29.9)	N y P - -	DDT (70.3)	Ce-Hui <i>et al.</i> , 2008
DDT (99.46)	N y P 100:8:1 -	DDT (94.3)	Betancur-Corredor <i>et al.</i> , 2015
Endosulfán (350000)	N y P - glucosa	Endosulfán total (100)	Bhalerao, 2013
Endosulfán (50)	N y P - -	alfa-Endosulfán (91) beta-Endosulfán (67)	Kumar <i>et al.</i> , 2008

Es importante resaltar que en los reportes anteriores se trabajaron con los contaminantes por separado, caso contrario del presente trabajo donde se determinó la remoción de los dos tipos de contaminantes, por lo que los microorganismos nativos están expuestos a hidrocarburos y plaguicidas y las complicaciones metabólicas y de ecología de poblaciones que esto conlleva.

Aislamiento, purificación e identificación de microorganismos hidrocarburoclastas y plaguicidaclastas

Posteriormente del aislamiento y purificación de los microorganismos aislados del suelo agrícola de Tepeaca Puebla, se observaron cepas de una bacteria, una levadura y cinco hongos filamentosos tolerantes a plaguicidas, hidrocarburos y mezcla de ambos (Fig. 11).

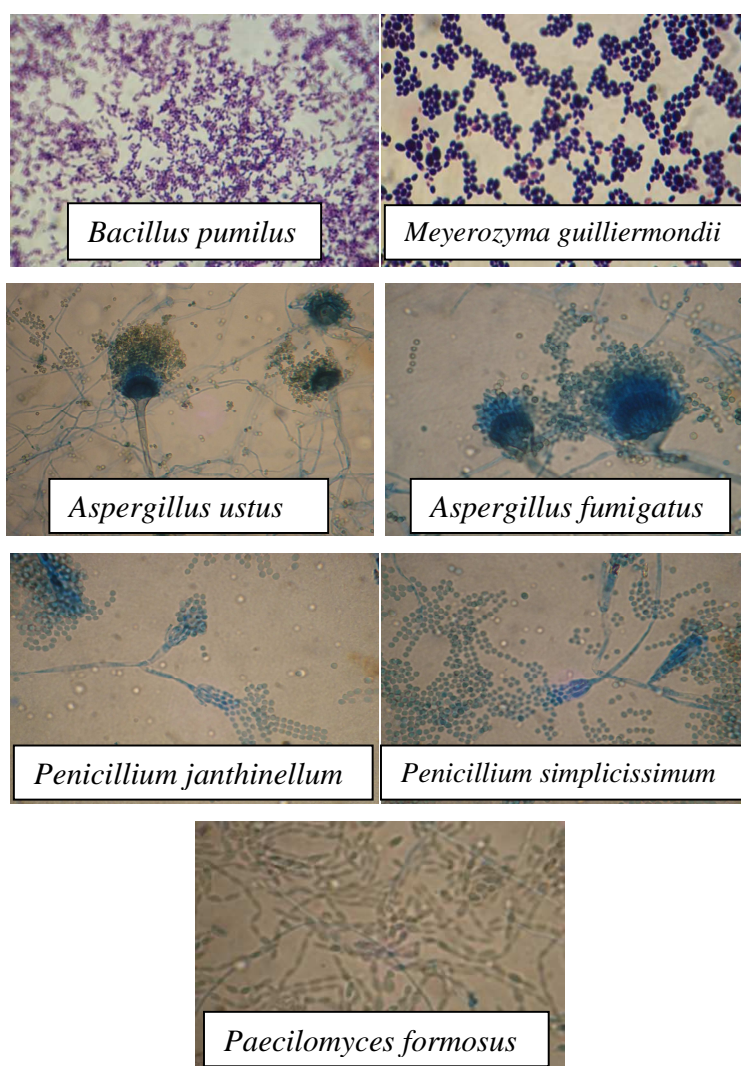


Figura 11. Fotografía de la bacteria, levadura y hongos aislados de los medios con plaguicidas y/o hidrocarburos de muestras de suelos de Tepeaca, Puebla.

Identificación de la bacteria y levadura

De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que la bacteria, con un 100% de similitud, correspondió a la especie *Bacillus pumilus*. Y la levadura, con un 99% de similitud, se identificó como *Meyerozyma guilliermondii*.

B. pumilus se utiliza como un fungicida de control biológico de hongos patógenos (CICOPLAFEST, 2004), esta especie produce biosurfactante (surfactina) con potencial para su uso en remediación de hidrocarburos y plaguicidas (Mulligan, 2005). En cuanto a hidrocarburos se ha reportado que *B. pumilus* tiene potencial de degradación de cadenas de hidrocarburos menores de 20 carbonos (HFM) (Kadali *et al.*, 2012) y además presentó una remoción de 81.83% de hexadecano en un medio líquido (Costa *et al.*, 2014). Choi *et al.* (2003) mencionan que esta bacteria puede promover la adsorción de contaminantes aromáticos y halogenados. En cuanto a plaguicidas no existen reporte de remoción de OCs, pero se ha observado que *B. pumilus* puede degradar plaguicidas organofosforados (Ahmad *et al.*, 2012; Anwar *et al.*, 2009; Muhammad *et al.*, 2011).

La especie *M. guilliermondii* ha sido utilizada como un antifúngico en el almacenamiento a largo plazo de pan de trigo (Coda *et al.*, 2013). Además se ha reportado que *M. guilliermondii* ayuda en la solubilización de P (Nakayan *et al.*, 2013). En cuanto a remoción de hidrocarburos se ha reportado que *M. guilliermondii* presentó remediación de suelos contaminados con gasolinas (HFM) con remociones del 21.7 a 87.4 % (Goulart *et al.*, 2014). *M. guilliermondii* también ha sido reportado en la remoción de compuestos orgánicos volátiles (COVs) como el etanol (Granström *et al.*, 2002) y para residuos de glicerol crudo (Duarte *et al.*, 2013). Para esta levadura no se han reportados trabajos de remoción de ningún tipo de plaguicida OCs.

Identificación de hongos filamentosos

De acuerdo a los resultados obtenidos se identificó a las 5 cepas como *Paecilomyces formosus* con un 100% de identidad, *Aspergillus ustus* con 100%, *Aspergillus fumigatus* con 99.6%, *Penicillium simplicissimum* 99.2% y *Penicillium janthinellum* con 99.3% de identidad.

P. formosus no se ha reportado anteriormente como una especie que participe en algún proceso de remediación de contaminantes orgánicos halogenados o no halogenados, por lo que este es su primer registro.

La especie *A. ustus* se ha reportado en otra investigación como potencial degradador de colorantes en agua y suelo (Novotný, *et al.*, 2003), pero no existe antecedente de remediación de hidrocarburos o plaguicidas en suelos, por lo que es importante determinar su participación en el proceso de remoción de estos contaminantes orgánicos.

La especie *A. fumigatus* ha demostrado tener la capacidad de biorremediar suelos contaminados con metales pesados mediante biosorción (Shazia *et al.*, 2013). Ekundayo y Osunla (2013) mostraron que *A. fumigatus* en medio líquido tiene potencial de remediación de petróleo crudo debido a que esta especie crece adecuadamente en presencia de hidrocarburos. De manera similar Jin-Shao *et al* (2011) reportaron que en medio líquido este hongo filamentoso tiene la capacidad de degradar antraceno después de 5 días hasta en un 60%, atribuido a la secreción extracelular de la enzima lignina peroxidasa. Pero no existen reportes asociados al proceso de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos o plaguicidas OCs.

Para *P. simplicissimum*, no se ha registrado trabajos de remediación en suelo para hidrocarburos y plaguicidas, pero se ha investigado que tiene la capacidad de decoloración y la desintoxicación de los colorantes textiles en medio líquido (Bergsten-Torralla *et al.*, 2009). Además se ha reportado que *P. simplicissimum* es capaz de degradar polietileno (Yamada-Onodera *et al.*, 2001), favorece la adsorción de Zn(II) por la producción de ácido cítrico (Franz *et al.*, 1991) y degrada efectivamente el fenol utilizándolo como fuente de carbono y energía (Marr *et al.*, 1996).

Para *P. janthinellum* se ha registrado la biodegradación de HAPs (Hidrocarburos aromáticos policíclicos) de alto peso molecular en medio líquido y suelo mediante consorcio con una bacteria (Boonchan *et al.*, 2000) Asimismo se ha reportado que esta especie de hongo aislada de un suelo puede oxidar adecuadamente el benzopireno otro HAPs (Launen *et al.*, 1995). Este hongo tampoco presenta antecedentes de remediación de plaguicidas OCs o hidrocarburos no aromáticos.

Diseño experimental para la degradación de hidrocarburos y plaguicida organoclorado (endosulfán) por bioaumentación con bacteria y levadura

Para determinar la participación de los microorganismos aislados del suelo agrícola en la degradación de los contaminantes orgánicos se bioaumentó adicionando la bacteria *B. pumilus* y la levadura *M. guilliermondii* a un suelo agrícola de Tepeaca conteniendo 26,200 y 20,900 ppm de HFM e HFP, respectivamente, además de 20 ppm de endosulfán técnico. Para la determinar la concentración del inóculo de la bacteria y de la levadura que se adicionó al suelo agrícola se realizaron diferentes métodos tradicionales de conteo, como la utilización de la escala de Mcfarland/espectrometría, cámara de Neubauer, densidad óptica (DO), y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) por dilución en placas. En este experimento se consideraron las mejores condiciones de humedad, cantidades de nutrientes y material orgánico (paja), obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman realizado anteriormente.

Una vez establecidas las condiciones del suelo, el balance de nutrientes (C:N:P 100:10:1) y ajuste de humedad, se prepararon los microcosmos, y se inoculó el suelo de los diferentes tratamientos establecidos con 2.65×10^4 UFC/ml de bacteria y/o 4.38×10^4 UFC/ml de levadura, en suelo estéril y no estéril para observar el efecto de la bioaumentación endógena con presencia o ausencia de microorganismos nativos, y sus respectivos controles ([Tabla 12](#)). Las variables de respuesta que se midieron fueron CO_2 , remoción de HFM e HFP y remoción endosulfán. Además se realizaron las curvas patrón del endosulfán, dos de sus metabolitos endosulfán sulfato y endosulfán éter. La medición de CO_2 se realizó cada 2 días, mientras que la determinación de HFM e HFP y endosulfán se realizó a los 10, 20, 30 y 40 días de tratamiento. En los 20 días de tratamiento se realizó la determinación de nutrientes para ajustar el sistema nuevamente para su adecuada biorremediación.

Tabla 12. Matriz experimental para la biorremediación del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla mediante bacteria y levadura.

Tratamiento	Bioestimulación							Bioaumentación	
	Variables de acondicionamiento							Bacteria 2.65x10 ⁸ UFC/ml (mL)	Levadura 4.38x10 ⁸ UFC/ml (mL)
	Suelo (30 g)	H ₂ O (mL)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	KH ₂ PO ₄ (g)	Fe SO ₄ (g)	MgSO ₄ (g)	Paja (g)		
T1NE	NE	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	1	-
T1E	E	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	1	-
T2NE	NE	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	-	1
T2E	E	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	-	1
T3NE	NE	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	0.5	0.5
T3E	E	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	0.5	0.5
C	NE	-	-	-	-	-	-	-	-
CH2O	NE	6.624	-	-	-	-	-	-	-
CB	NE	6.624	2.106	0.206	0.02	0.02	0.15	-	-

NE= No estéril

E= Estéril

Producción de CO₂

En la producción total de CO₂ durante los 10, 20, 30 y 40 días de tratamiento de biorremediación se observó que la mayor producción de CO₂ fue a los 20 y 30 días para los diferentes tratamientos (Fig. 12). La producción de CO₂ en los tratamientos bioaumentados con *B. pumilus* fue similar en los diferentes días, con valores de 1.3 a 2.5 mgCO₂/g de suelo para **T1NE** (no estéril) y 0.7 a 2.7 mgCO₂/g de suelo en **T1E** (estéril). En los tratamientos con *M. guilliermondii* la producción total de CO₂ fue similar en el tratamiento estéril y no estéril, con intervalos entre 1.0 a 2.7 mgCO₂/g de suelo en **T2NE** (no estéril) y 0.6 a 2.8 mgCO₂/g de suelo para **T2E** (estéril). En los microcosmos bioaumentados con ambas cepas el tratamiento no estéril **T3NE** (no estéril) presentó mayor producción de CO₂ con 1.2 a 2.8 mgCO₂/g de suelo, en comparación con el tratamiento estéril **T3E** (estéril) con una producción menor con 0.2 a 2.4 mgCO₂/g de suelo. En el control **CH2O** presentó una menor producción de 0.5 a 1.9 mgCO₂/g y el control **C** la producción fue prácticamente nula. El control **CB** únicamente bioestimulado mostró valores de 0.9 a 2.4 mgCO₂/g de suelo, similares a los tratamientos bioaumentados.

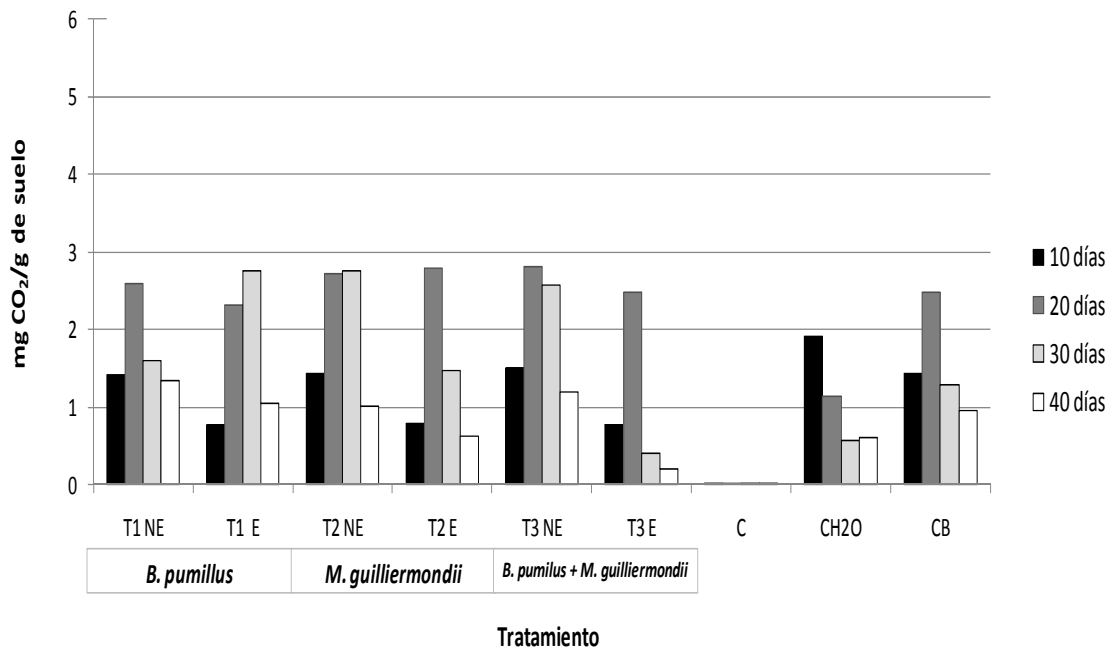


Figura 12. Producción total acumulada de CO₂ en los diferentes tratamientos con *B. pumilus* y *M. guilliermondii*. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores son puntuales n=1.

La alta o baja producción de CO₂ indican la actividad metabólica en cada tratamiento, pero el CO₂ no necesariamente es proporcional con la remoción del contaminante, debido a que quizás existen otros factores abióticos o transformaciones abióticas (fotólisis e hidrólisis) (Martín *et al.*, 2004 Martín) y factores bióticos como la descomposición de materiales orgánicos que también generan CO₂ o puede existir otras fuentes inorgánicas y sumideros en el suelo (Li, 1995). Esto nos demuestra la complejidad de los procesos microbianos y fisicoquímicos que suceden en los sistemas de suelos.

Remoción de HFM

Se observó que los tratamientos inoculados con *B. pumilus* presentaron valores de remoción de HFM 3.0 a 18.0% en el tratamiento **T1NE** (no estéril) y de 11.0 a 31.0% en el **T1E** (estéril), determinando cuando sólo está presente *B. pumilus* y que es mayor la remoción que en un suelo con los microorganismos nativos (Fig. 13). De forma similar en los tratamientos con *M. guilliermondii* se observó para **T2NE** (no estéril) remociones del 12.0 al 28.0% y para el **T2E** (estéril) del 12.0 al 78.0% (Fig. 13).

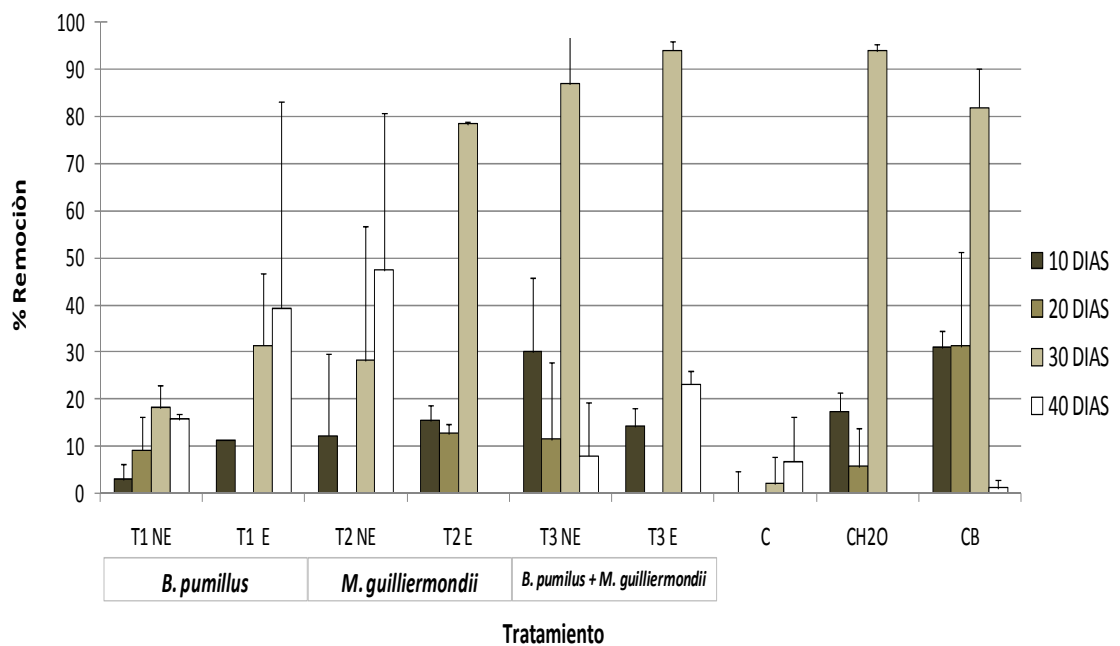


Figura 13. Remoción de HFM en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con *B. pumilus* y *M. guilliermondii*. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

En los tratamientos inoculados con *B. pumilus* y *M. guilliermondii* se presentaron los mayores valores de remoción del experimento con el 11.0 al 86.0% en el tratamiento **T3NE** (no estéril) y del 14.0 al 93.0% en el **T3E** (estéril) (Fig. 13), demostrando que en conjunto estos microorganismos presentan una mayor metabolización y biorremediación del suelo contaminado.

Estos resultados nos indican que estas cepas, aisladas del mismo suelo contaminado, tienen la capacidad de degradar este contaminante. Pero en presencia de los microorganismos nativos del suelo la remoción disminuye, quizá debido a la competencia e inhibición entre las poblaciones inoculadas y las nativas. En general se observó que remoción a los 10 y 20 días es baja en todos los microcosmos, mientras que la mayor remoción se presentó a los 30 días de tratamiento y esta disminuye a los 40 días.

El control **C** presentó una mínima remoción de 0 a 2.0%. El control **CH2O** presentó una remoción de 5.0 a 93.0%, valores mayores y similares a los tratamientos bioestimulados,

indicando que los microorganismos pueden remover esta fracción de hidrocarburos únicamente con presencia de humedad.

El control **CB** (bioestimulado) presentó valores de remoción de HFM del 31.0 al 81.0% (**Fig. 13**), mostrando que sólo con la bioestimulación de los microorganismos nativos se puede degradar adecuadamente los contaminantes.

Remoción de HFP

En los tratamientos inoculados con *B. pumilus*, **T1NE** (no estéril) presentó valores de remoción de HFP de 2.0 a 29.0% en el tratamiento y de 0 a 26.0% en el **T1E** (estéril) (**Fig. 14**). No se ha reportado trabajos de remoción para hidrocarburos de cadenas largas para esta bacteria. En el suelo inoculado con *M. guilliermondii* se observó para **T2NE** (no estéril) remociones del 0 a 29.0% y para el **T2E** (estéril) del 0 a 28.0% (**Fig. 14**). Para esta levadura no se han realizado trabajos de remoción para hidrocarburos de cadenas largas.

En los tratamientos inoculados con *B. pumilus* y *M. guilliermondii* se observaron los mayores valores de remoción de todos los microcosmos inoculados, con el 17.0 a 42.0% en el tratamiento **T3NE** (no estéril) y de 0 a 95.0 % en el **T3E** (estéril) (**Fig. 14**), indicando, de manera similar que en HFM, que ambos microorganismos en conjunto presentan una mayor metabolización y biorremediación del suelo contaminado. La menor remoción en el tratamiento **T3NE** (no estéril) puede deberse a la competencia microbiana de las cepas inoculadas con las poblaciones nativas.

El control **C** presentó una mínima remoción de HFP del 0 a 2.0%. El control **CH2O**, únicamente con agua, presentó una remoción menor con valores de 0 a 10.0% a diferencia de HFM, demostrando que para la remoción de fracciones más grandes de hidrocarburos la presencia sólo de agua no es lo suficiente para su remoción.

Por otro lado, el control **CB** (bioestimulado) presentó valores de remoción para HFP de 0 a 50.0% (**Fig. 14**), valores mayores a los otros tratamientos inoculados, lo cual indica que los microorganismos nativos pueden degradar adecuadamente ambas fracciones de hidrocarburos en este suelo.

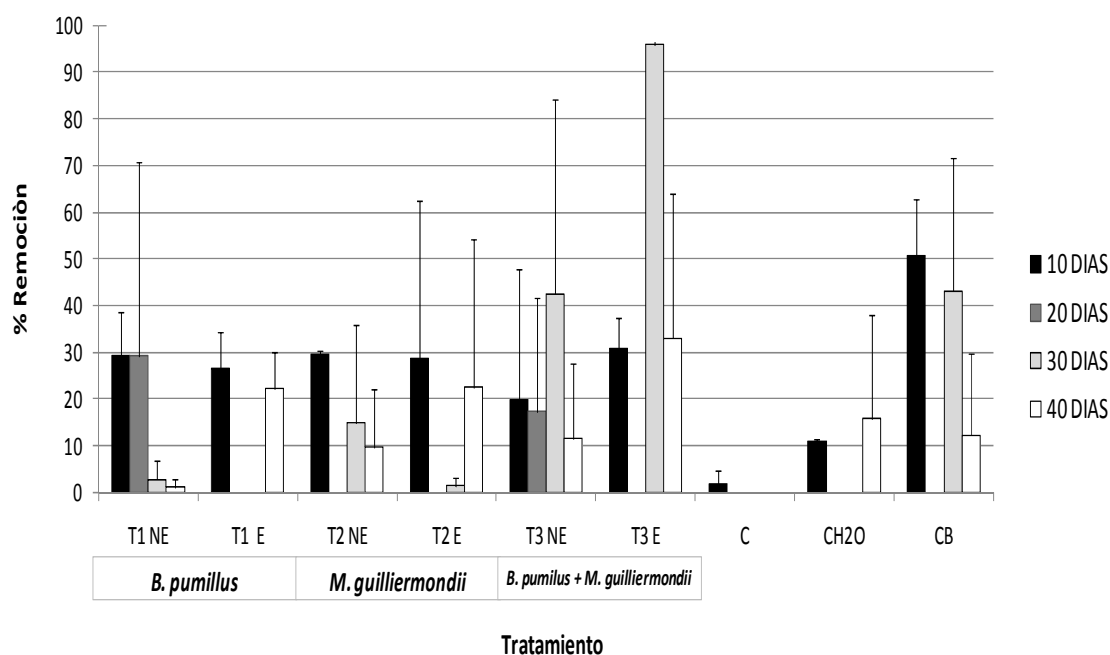


Figura 14. Remoción de HFP en diferentes tiempos y diferentes tratamientos *B. pumilus* y *M. guilliermondii*. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

En los tratamientos y los controles sus mayores remociones se presentaron en los 10 días del tratamiento, excepto para los tratamientos **T3NE** y **T3E** inoculados con las dos cepas. Pero es evidente la participación de estas dos cepas en la degradación de hidrocarburos.

Remoción de endosulfán

En los microcosmos bioaumentados con *B. pumilus*, el tratamiento **T1NE** (no estéril) presentó valores de 0 a 100% de remoción de endosulfán total con máximos en los 30 y 40 días (Fig. 15). **T1E** (estéril) removió del 0 al 99.1% con un máximo a los 30 días de tratamiento. En estos tratamientos la presencia o ausencia de los microorganismos nativos no parece ser determinante en la remoción. Para los microcosmos inoculados con *M. guilliermondii* se observó mayor remoción de endosulfán total en el tratamiento **T2NE** (no estéril) con 0 a 100%, en comparación con el tratamiento **T2E** (estéril) con valores de 0 a 46.0% (Fig. 15). Los valores máximos fueron a los 30 y 40 días para **T2NE** (no estéril) y a los 30 días para **T2E** (estéril). La mayor remoción del microcosmos con suelo no estéril indica que la bioaumentación con esta levadura puede aumentar la eficiencia de biorremediación de este plaguicida organoclorado, al contrario que con los hidrocarburos.

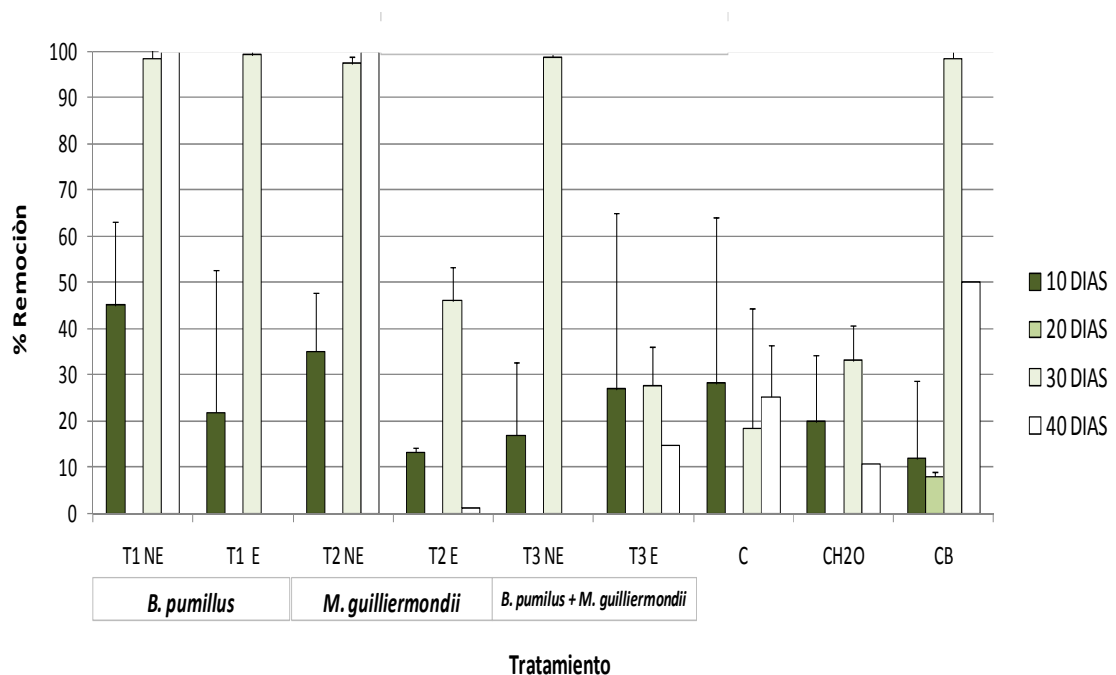


Figura 15. Remoción de endosulfán total en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con *B. pumilus* y *M. guilliermondii*. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

En los tratamientos inoculados con ambas cepas se presentaron valores de remoción para endosulfán total de 0 a 98.7% para **T3NE** (no estéril) y 0 a 27.7% en **T3E** (estéril) (Fig. 15). Los valores máximos de remoción fueron a los 30 días para ambos tratamientos. En estos resultados se observó nuevamente que en el suelo no estéril hay una mayor remoción debido quizá a la presencia de la microbiota nativa.

En general en los tratamientos inoculados con bacteria y/o levadura se observó que la mayor remoción fue a los 30 días de tratamiento. Además se observó que en los microcosmos con suelo no estéril hay mayor remoción de endosulfán total.

El control **C** presentó una mínima remoción de 0 a 28.1% para endosulfán total que fue menor que los tratamientos bioaumentados. **CH2O** presentó una remoción similar de 0 a 33.1%, indicando que los microorganismos no pueden remover adecuadamente este plaguicida añadiendo sólo agua (Fig. 15).

En el control únicamente bioestimulado **CB** se observaron valores de remoción de endosulfán total del 8.0 al 98.3% (**Fig. 15**), mostrando que sólo con una adecuada bioestimulación de los microorganismos nativos del suelo se pueden degradar adecuadamente los contaminantes. Estas observaciones denotan que no siempre la bioaumentación favorecerá la remoción del contaminante problema y que la bioestimulación puede ser suficiente para realizar la biorrestauración de un suelo impactado. Esto ha sido anteriormente reportado en otros trabajos, donde mencionan que la adición de microorganismos no aumentan las velocidades de degradación con respecto a lo que se consigue únicamente añadiendo nutrientes para estimular a la población microbiana nativa (Lee y Merlin, 1999; Van Hamme *et al.*, 2003).

Con respecto a los metabolitos secundarios del endosulfán, en este experimento con *B. pumilus* y *M. guilliermondii* se detectó únicamente endosulfán éter, en concentraciones de 0.01 a 0.1 ppm, lo cual indica que el contaminante se está degradando. La presencia de este metabolito es similar a lo reportado por Kafilzadeh *et al* (2015) y Hussain *et al* (2007).

Diseño experimental para la degradación de hidrocarburos y plaguicida organoclorado (endosulfán) por bioaumentación con hongos filamentosos

Para comprobar la degradación de estos contaminantes orgánicos mediante los 5 hongos filamentosos aislados se efectuaron pruebas a nivel microcosmos. En este experimento se consideraron las mejores condiciones de humedad, cantidades de nutrientes (C:N:P 100:10:1) y material orgánico (paja), obtenidos del diseño experimental Plackett-Burman para la bioestimulación. Las concentraciones iniciales de HFM e HFP fueron 20070 ppm y 24504 ppm, respectivamente. Para determinar la remoción de endosulfán se contaminó el suelo a 20 ppm con endosulfán técnico. Para la bioaumentación endógena, en cada tratamiento con suelo estéril y no estéril, se le agregó 1 mL de la solución de esporas (1.58×10^7 esporas/mL) de los diferentes hongos: *Paecilomyces formosus* (T1NE y T1E), *Aspergillus ustus* (T2NE y T2E), *Penicillium simplicissimum* (T3NE y T3E), *Aspergillus fumigatus* (T4NE y TE4), *Penicillium janthinellum* (T5NE y T5E) y tres controles (Tabla 13). Las variables respuesta determinadas fueron CO₂ cada 2 días y % de Remoción de HFM, HFP y endosulfán a los 10, 20, 30 y 40 días. A 20 días de tratamiento se realizó el reacondicionamiento de nutrientes.

Tabla 13. Matriz experimental para la micorremediación del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla mediante hongos filamentosos.

		Bioestimulación						Bioaumentación
		Variables de acondicionamiento						
Tratamiento	Suelo (30 g)	H ₂ O (mL)	(NH ₄) ₂ SO ₄ (g)	KH ₂ PO ₄ (g)	Fe SO ₄ (g)	MgSO ₄ (g)	Paja (g)	Hongo 1.58×10^7 esporas/mL (mL)
T1NE	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T1E	E	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T2NE	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T2E	E	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T3NE	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T3E	E	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T4NE	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T4E	E	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T5NE	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
T5E	E	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	1
C	NE	-	-	-	-	-	-	-
CH2O	NE	10.40	-	-	-	-	-	-
CB	NE	10.40	1.42	0.15	0.08	0.02	0.3	-

NE= No estéril

E= Estéril

Producción de CO₂

En los diferentes microcosmos inoculados con los diferentes hongos filamentosos se observó que la mayor producción de CO₂ ocurrió en los 10 y 20 primeros días de tratamiento y disminuyó a los 30 y 40 días (**Fig. 16**). La producción en los diferentes microcosmos se comportó de manera similar, observándose que los tratamientos estériles presentaron mayor cantidad de CO₂ que los tratamientos no estériles.

En los microcosmos inoculados con *P. formosus* se mostraron valores para **T1NE** (no estéril) de 0.6 a 1.7 mgCO₂/g de suelo y **T1E** (estéril) de 0.4 a 1.4 mgCO₂/g de suelo (**Fig. 16**). En los tratamientos con *A. ustus* los valores de CO₂ fueron de 0.5 a 1.6 mgCO₂/g de suelo para **T2NE** (no estéril) y 0.3 a 1.3 mgCO₂/g de suelo para **T1E** (estéril). En los microcosmos con *P. simplicissimum* presentó producción de CO₂ con valores entre 0.5 a 1.9 mgCO₂/g de suelo para **T3NE** (no estéril) y 0.3 a 0.9 mgCO₂/g de suelo para **T3E** (estéril). En los tratamientos con *A. fumigatus* los valores oscilaron entre 0.3 a 1.5 mgCO₂/g de suelo y 0.4 a 1.1 mgCO₂/g de suelo para **T4NE** (no estéril) y para **T4E** (estéril), respectivamente. Finalmente los tratamientos bioaumentados con *P. janthinellum* presentaron una producción de CO₂ con 0.3 a 1.5 mgCO₂/g de suelo para **T5NE** (no estéril) y para **T5E** (estéril) de 0.5 a 1.4 mgCO₂/g de suelo.

Para el control **C** no existió una producción de CO₂, mientras que los controles **CH2O** y **CB** presentaron una cantidad de CO₂ de 0.9 a 1.3 y 0.6 a 1.4 mgCO₂/g de suelo, correspondientemente (**Fig. 16**).

De la misma manera que en otros tratamientos previos, la alta o baja producción de CO₂, no necesariamente es proporcional con la remoción del contaminante, debido a que quizás existen otros factores involucrados en la producción de CO₂ (Martín *et al.*, 2004).

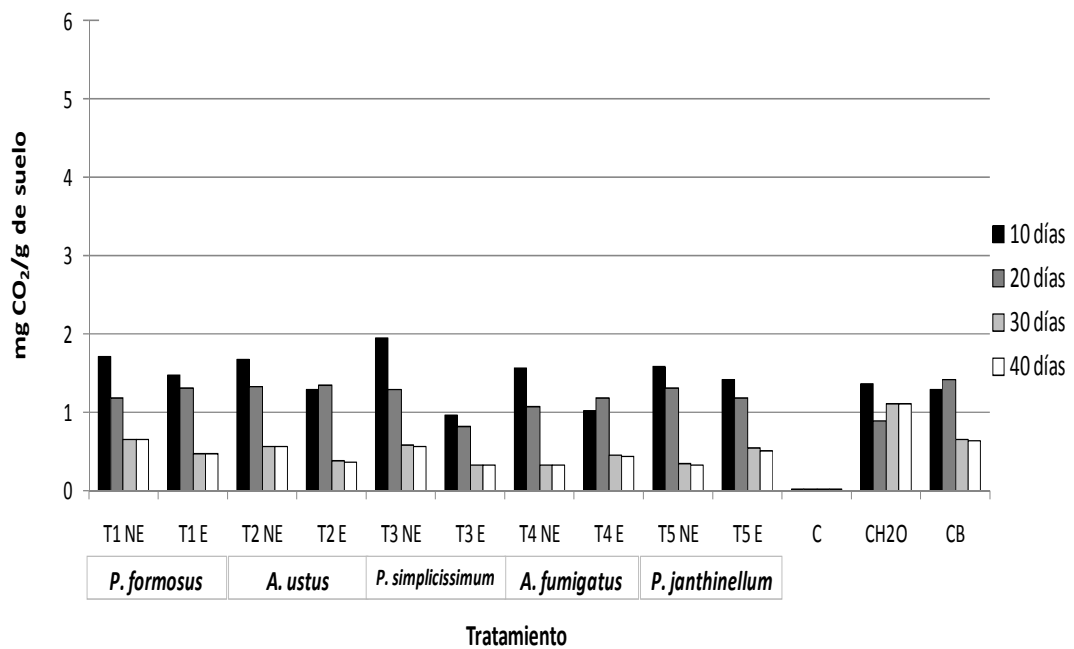


Figura 16. Producción total acumulada de CO₂ en los diferentes tratamientos con hongos filamentosos. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores son puntuales n=1.

Remoción de HFM

En cuanto a la remoción de HFM es importante denotar que todos los hongos nativos inoculados al suelo contaminado presentaron remoción, ya sea en tratamiento estéril o no estéril (Fig. 17). Asimismo, de manera general se observa que las 5 especies de hongos filamentosos presentaron la mayor remoción a los 10 días de tratamiento, disminuye a los 20 días y aumenta a los 30 días aunque la remoción es menor en comparación a los primeros días de tratamiento (Fig.17).

En el suelo bioaumentados con el hongo *P. formosus* la remoción de HFM en el tratamiento **T1NE** (no estéril) fue de 0.5 a 32.3% presentando el mayor valor a los 10 días y menor a los 20 días, para **T1E** (estéril) se observaron valores de 0 a 34.3% de remoción de HFM, con 0 % en los 20 y 40 días y el máximo en los 10 días (Fig. 17). En el suelo con *A. ustus* la remoción de HFM en **T2NE** (no estéril) fue de 0 a 26.4% con el mayor valor a los 10 días, para **T2E** (estéril) los valores observados fueron de 7.14 a 31.6% de remoción, y el máximo a igualmente a los 10 días. En los tratamientos con *P. simplicissimum* los resultados fueron de 0 a 35.1% de remoción de HFM para **T3NE** (no estéril) y 0.85 a 32.6% para **T3E** (estéril) observando mayor remoción en los primeros 10 días. En los microcosmos inoculados con *A.*

fumigatus se observó el máximo de remoción de HFM de todo el experimento, con valores entre 1.93 y 48.2% en **T4NE** (no estéril) y en el tratamiento **T4E** (estéril) valores de 0 a 30.2%, y los máximos valores a los 10 días. Finalmente el suelo tratado con *P. janthinellum* mostró remoción de 9.72 a 45.7% en **T5NE** (no estéril) con el mayor valor en 10 días y remociones de 3.42 a 20.3% en **T5E** (estéril) con el máximo a los 30 días. Para la remoción de HFM los microcosmos bioaumentados con *A. fumigatus* y *P. janthinellum* presetaron las mayores remociones.

En los controles se observó que **C** no presentó remoción, mientras que **CH2O** mostró remoción de HFM de 28.4% únicamente a los 10 días. En cambio el control bioestimulado **CB** presentó remociones de 0 a 17.2%, con valores mucho menores que los microcosmos inoculados con las esporas de los hongos filamentosos (**Fig. 17**). Al contrario que con los tratamientos con la bacteria y levadura *B. pumilus* y *M. guilliermondii*, realizados anteriormente en otro experimento, la bioaumentación con hongos filamentosos parece aumentar la remoción de contaminantes con respecto al tratamiento no bioaumentado, este resultado también fue documentado por Pao-Wen *et al* (2011) donde observaron que la bioaumentación fue la técnica más efectiva de remoción de hidrocarburos en comparación de únicamente la bioestimulación, aunque esta bioaumentación fue exógena.

Remoción de HFP

Los tratamientos inoculados con los 5 hongos nativos presentaron remoción de HFP, tanto en los tratamientos estériles como en los no estériles (**Fig. 18**). En la mayoría de los microcosmos inoculados los valores máximos de remoción de HFP se mostraron a los 40 días de tratamiento, a diferencia de la remoción de HFM donde los valores fueron a los 10 días. Lo cual indicó que, al igual que otros experimentos anteriores, la remoción de los hidrocarburos más grandes requieren un mayor período para ser removidos por los microorganismos.

En el suelo con *P. formosus* la remoción de HFP en el tratamiento **T1NE** (no estéril) fue de 0 a 43.3% con el mayor valor a los 20 días, para **T1E** (estéril) se observaron valores de 0 a 43.0% de remoción de HFP, el máximo en los 40 días (**Fig. 18**). En el suelo bioaumentados con el hongo *A. ustus* la remoción de HFP en **T2NE** (no estéril) fue de 0 a 43.0% con el mayor valor a los 20 días, para **T2E** (estéril) los resultados fueron de 0 a 67.1% de remoción, y el máximo a los 40 días. En los microcosmos inoculados con *P. simplicissimum* los resultados de

remoción de HFP fueron de 0 a 67.1% para **T3NE** (no estéril) y 0 a 19.5% para **T3E** (estéril) observando r en los tratamientos con *A. fumigatus* el microcosmos **T4NE** (no estéril) mostró una remoción de 0 a 56.5% y en el tratamiento **T4E** (estéril) valores de 0 a 25.1%, y los máximos valores a los 40 días. Por último el suelo tratado con *P. janthinellum* mostró remoción de 0 a 51.9% en **T5NE** (no estéril) con el mayor valor en 40 días y remociones de 0 a 34.7% en **T5E** (estéril) con el máximo a los 40 días. Los microcosmos hongos *A. ustus* y *P. simplicissimum* presentaron los valores máximos de remoción para HFP.

En los controles se observó que **C** no presentó remoción, mientras que la remoción de HFP en **CH2O** fue menor comparado con los tratamientos inoculados con los hongos (**Fig. 18**). En cambio el **CB** presentó remociones de 0 a 37.5%. De manera similar a la remoción de HFM la bioaumentación con hongos filamentosos parece aumentar la remoción de contaminantes con respecto al tratamiento no bioaumentado **CB**.

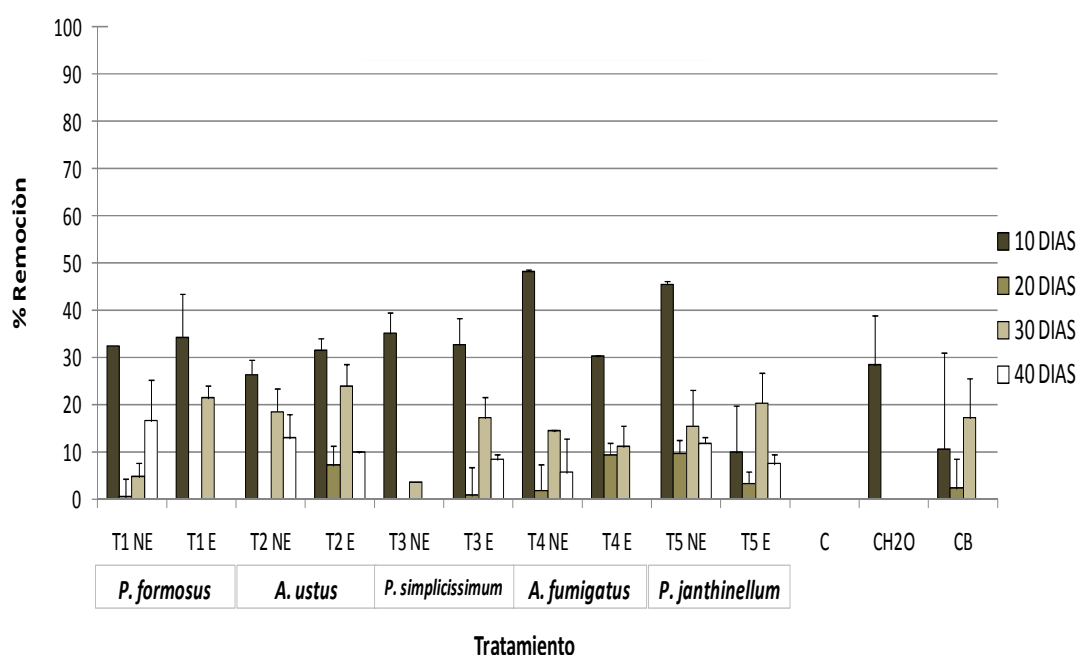


Figura 17. Remoción de HFM en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

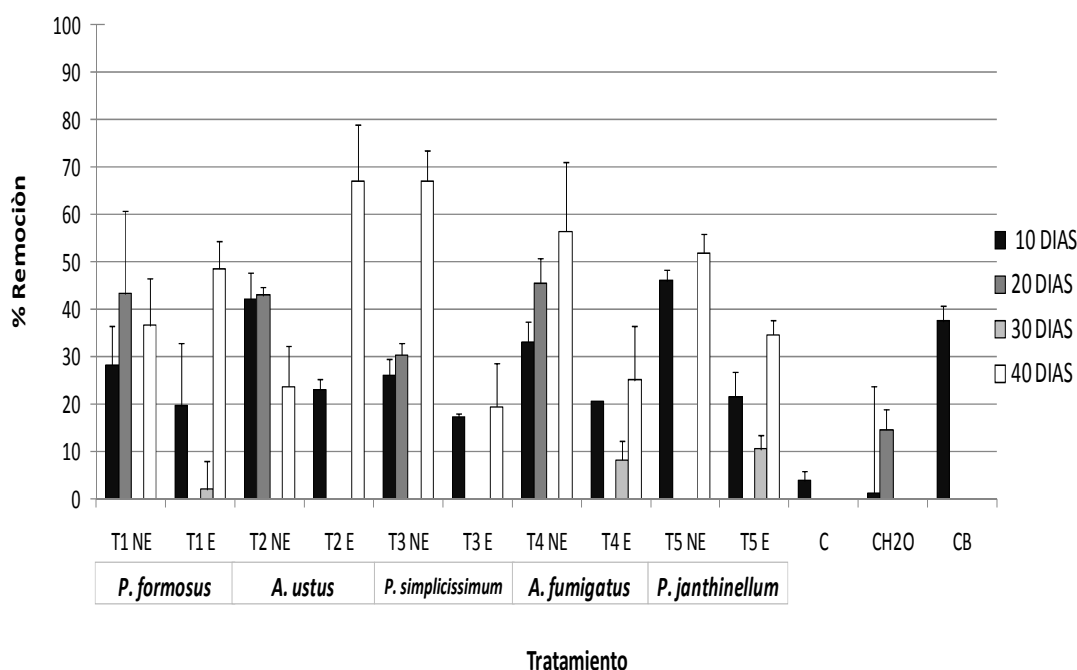


Figura 18. Remoción de HFP en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Remoción de endosulfán

En los resultados de remoción del plaguicida organoclorado endosulfán, todos los hongos nativos aislados del suelo presentaron remoción en conjunto con los microorganismos nativos (no estéril) y sin presencia de otros microorganismos (estéril), aunque a diferentes tiempos (Fig. 19). Estos resultados de microrremediación indican claramente la participación de estos microorganismos en la remoción de estos contaminantes, pero de manera diferente para cada especie.

En los tratamientos bioaumentados con el hongo *P. formosus* la remoción de endosulfán en T1NE (no estéril) fue de 0 a 70.1% presentando el mayor valor a los 40 días, para T1E (estéril) se observaron valores de 0 a 93.6%, y el máximo a los 40 días (Fig. 19). En el suelo con *A. ustus* la remoción de endosulfán en T2NE (no estéril) fue de 0 a 96.5% con el mayor valor a los 10 días, para T2E (estéril) se presentó únicamente remoción a los 40 días con 74.6%. En el suelo tratado con *P. simplicissimum* en T3NE (no estéril) sólo hubo remoción de endosulfán a los 30 días con 34.5% y de igual forma para T3E (estéril) se obtuvo remoción de 53.7%. En los microcosmos inoculados con *A. fumigatus* se observaron valores de 0 a 60.5% para T4NE (no estéril) con el máximo a los 10 días y en el tratamiento T4E (estéril) valores de

0 a 30.9% y máximos a los 30 días. En los tratamientos con *P. janthinellum* se mostró remoción de 0 a 52.5% en **T5NE** (no estéril) con el mayor a los 40 días y de 0 a 70.5% en **T5E** (estéril) con remoción únicamente a los 30 días. En general se observó que la cepas que mostraron mayor remoción de endosulfán fueron las especies *P. formosus* y *A. ustus*.

En los controles **C** presentó remoción de endosulfán de 0 a 22.9%, mientras que **CH2O** mostró remociones de 0 a 44.7%. En cambio el control bioestimulado **CB** presentó remociones de 0 a 17.2%, con valores mucho menores que los microcosmos inoculados con las esporas de los hongos filamentosos (**Fig. 19**). Al contrario que con los tratamientos con la bacteria y levadura *B. pumilus* y *M. guilliermondii*, realizados anteriormente en otro experimento, la bioaumentación con hongos filamentosos parece aumentar la remoción de contaminantes con respecto al tratamiento no bioaumentado y sólo bioestimulado. Lo anterior indica que los microorganismos nativos del suelo pueden o no aumentar la capacidad de remoción, esto es importante y manifiesta la necesidad de hacer pruebas preliminares antes de optar por la bioaumentación. Además esto demuestra la diversidad metabólica y adaptativa de cada especie a un ambiente con diferentes contaminantes y indica lo complejo de los procesos microbianos que ocurren en el suelo.

En tanto a los metabolitos secundarios del endosulfán, en este experimento con los hongos filamentosos se detectaron los metabolitos endosulfán sulfato y endosulfán éter, en concentraciones de 0.01 a 1 ppm, lo cual indica que el contaminante se está degradando. Pero es importante mencionar que el endosulfán éter presentó mayores concentraciones, similar a lo reportado por Goswami *et al* (2009) para la remoción de endosulfán con *Aspergillus sydoni* y contrario a lo que se menciona en otros trabajos de degradación donde el mayor metabolito fue el endosulfán sulfato (Kumar *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2011).

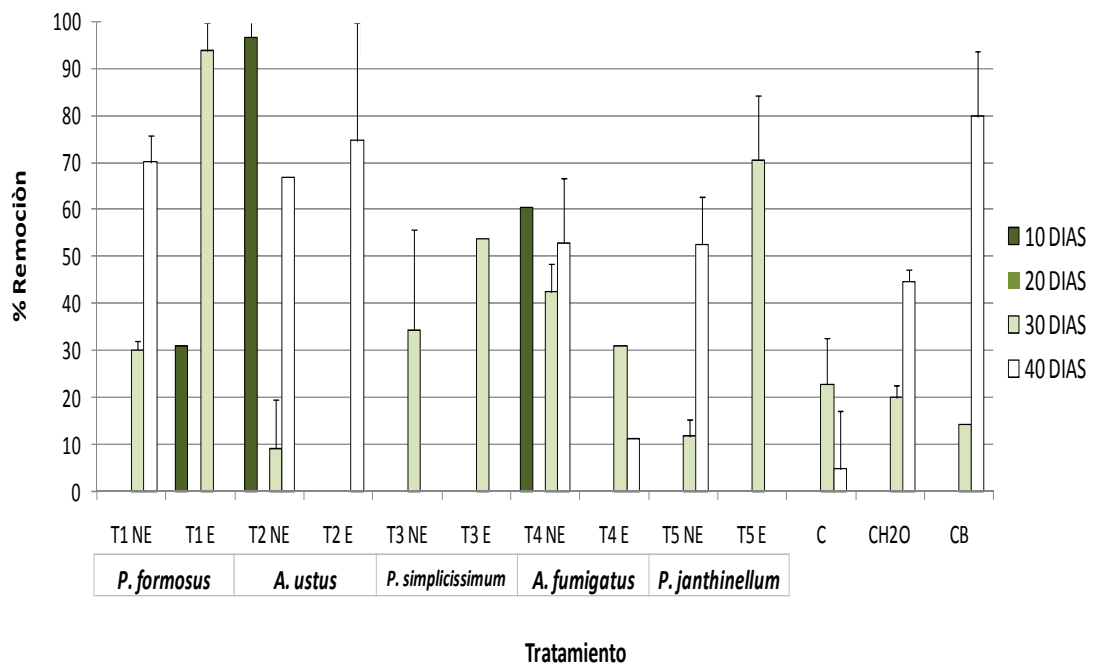


Figura 19. Remoción de endosulfán total en diferentes tiempos y diferentes tratamientos con hongos filamentosos. NE= No Estéril, E= Estéril. Valores promedio y desviación estándar (n=2).

Ensayos de toxicidad de contaminantes orgánicos en suelo

Para determinar la toxicidad de las muestras de suelo TEPEA01 (Sup), TEPEA01 (0.5m) y TEPEA 03 (0.5 m) se realizaron pruebas de fitotoxicidad (germinación de semillas y crecimiento o elongación radicular) y pruebas de citotoxicidad. Como control negativo de toxicidad se emplearon muestras de suelo limpio agrícola no contaminado (**SLa**) colectado en Acatzingo, Puebla y suelo limpio (**SL**) adquirido en una tienda de productos de jardinería. Los parámetros fisicoquímicos de los controles negativos y muestras de suelo se resumen en la **Tabla 14**.

Como controles positivos se utilizaron muestras de suelo limpio contaminado con 1.2 ppm de fenantreno (SF), suelo limpio contaminado con 20 ppm de estándar de DDT (Chem service PS74, DDTL) y suelo limpio agrícola contaminado con 20 ppm de estándar de DDT (DDTa), suelo limpio contaminado con diesel (**DieselL**), suelo limpio agrícola contaminado con diesel (**Diesela**), suelo limpio contaminado con 20 ppm de endosulfán (**Endosulfán L**), suelo limpio contaminado con 20 ppm de clordano (**ClordanoL**), suelo limpio agrícola contaminado con 20 ppm de endosulfán (**Endosulfána**), suelo limpio agrícola contaminado con 20 ppm de clordano (**Clordanoa**).

Tabla 14. Parámetros fisicoquímicos de las muestras del suelo agrícola de Tepeaca, Puebla y controles negativos de las pruebas de toxicidad

Muestra	pH	Humedad (%)	CC (%)	MO (%)	N (%)	HFM (ppm b.s.)	OCs (ppb)
TEPEA01 (Sup)	5.82	3.60	74.99	3.16	0.037	5202.5	35.06
TEPEA01 (0.5m)	5.64	7.37	66.27	3.08	0.043	4608.1	112.18
TEPEA03 (0.5m)	5.34	10.46	79.35	7.61	0.069	8392.7	136.74
SL	7.33	43.92	100	34.60	0.661	0	0
SLa	5.63	1.86	80.53	1.12	0.051	0	0

Evaluación de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L.

Los resultados de la evaluación de toxicidad aguda con *Lactuca sativa* L. se muestran en la **Tabla 15** (controles y muestras), en ella se observa el porcentaje de germinación (%G), la elongación radicular (Er) y el índice de germinación (IG), se usó como control negativo SL con un %G de 83.33 y con una elongación radicular promedio de 43.13mm, cabe mencionar que el IG fue de 100, ya que el número de semillas germinadas en este suelo se usó como base para calcular el IG del resto de las muestras y controles.

Las semillas que presentaron mayor porcentaje de germinación fueron las expuestas a los suelos contaminados con estándares puros, controles negativos (DDTa, SF, DDTL) las semillas en TEPEA01 (Sup) y en TEPEA01 (0.5m) quedaron por debajo con respecto a los controles positivos; en la muestra TEPEA03 (0.5m) no hubo germinación. Estos resultados pueden indicar que la mezcla de hidrocarburos en el suelo problema, provenientes del derrame, inhiben en mayor proporción la germinación de las semillas que contaminantes puros. Además, estos resultados pueden indicar que la presencia de diferentes contaminantes, hidrocarburos y plaguicidas, producen un efecto sinérgico negativo sobre la germinación de esta especie de planta.

Las plántulas que presentaron mayor elongación radicular fueron las sometidas a TEPEA01 (Sup) con 33.29 mm siguiéndole, TEPEA01 (0.5m), DDTa y SF, además cabe mencionar que en estas muestras las semillas no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Las plántulas con menor elongación radicular fueron las que se sometieron a DDTL y en TEPEA03(0.5m) no hubo germinación de semillas. El índice de germinación fue mayor en la muestra DDTa con 36.64, siguiéndole el suelo TEPEA01(Sup) con 27; mientras que TEPEA01(0.5m) y TEPEA03(0.5m) fueron menores con respecto a los controles negativos.

Tabla 15. Valores promedio de la evaluación de fitotoxicidad con *Lactuca sativa* L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles

Muestra	%G	ER (mm)	ERr	IG
T _{EPEA 01(SUP)}	29.20 ^{d,e,f,g}	33.30	-0.23	27.01 ^{b,c}
T _{EPEA 01(0.5m)}	8.33 ^{f,g}	29.50	-0.32	6.84 ^{b,c}
T _{EPEA 03(0.5m)}	0.00 ^g	0.00	-1.00	0.00 ^{b,c}
Controles positivos				
SL _{DIESEL 1200}	68.80 ^{a,b,c}	9.80	-0.80	18.70 ^{b,c}
SLa _{DIESEL1200}	37.50 ^{c,d,e,f}	7.90	-0.82	8.23 ^{b,c}
SL _{DIESEL 8000}	45.83 ^{c,d,e}	8.30	-0.81	10.52 ^{b,c}
SLa _{DIESEL8000}	27.10 ^{e,f,g}	8.31	-0.81	5.82 ^{b,c}
SL _{FENANTRENO}	52.10 ^{a,b,c,d,e}	14.90	-0.70	21.60 ^{b,c}
SL _{DDT}	43.80 ^{c,d,e}	9.81	-0.80	11.94 ^{b,c}
SLa _{DDT}	62.50 ^{a,b,c,d}	21.10	-0.51	36.64 ^b
SL _{ENDOSULFÁN}	87.50 ^a	36.74	-0.20	89.50 ^a
SLa _{ENDOSULFÁN}	27.10 ^{e,f,g}	14.20	-0.70	10.70 ^{b,c}
SL _{CLORDANO}	89.60 ^a	42.30	-0.02	105.33 ^a
SLa _{CLORDANO}	60.42 ^{a,b,c,d,e}	21.00	-0.51	35.30 ^b
Control negativo				
SL	83.33 ^{a,b}	43.13	0.00	100.0 ^a

Los valores de de Er, ERr e IG corresponden a la media ($n=3$).

Literales (a,b,c) iguales en cada variable indican que no hay diferencias estadísticamente significativa, según prueba de Tukey ($\alpha: 0.05$).

Evaluación de la toxicidad con Allium cepa L.

En la **Tabla 16** se observa la elongación radicular (Er) de los bulbos sometidos a los controles positivos y a las muestras, después del precrecimiento, los controles negativos presentaron una elongación radicular de SLa: 20mm y SL: 10mm.

Tabla 16. Valores promedio de la evaluación de fitotoxicidad con *Allium cepa* L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles

Muestra	ER (mm)	ERr
T _{EPEA01(SUP)}	4	-0.8
T _{EPEA01(0.5m)}	0	-1
T _{EPEA03(0.5m)}	0	-1
Controles positivos		
SL _{FENFANTRENO}	19	-0.05
SL _{DIESEL1200}	16	-0.2
SLa _{DIESEL1200}	13	-0.35
SL _{DIESEL3000}	14	-0.3
SLa _{DIESEL3000}	13.5	-0.33
SL _{DIESEL5000}	12.5	-0.33
SLa _{DIESEL5000}	12.5	-0.38
SL _{DIESEL8000}	11.5	-0.43
SLa _{DIESEL8000}	7.5	-0.63
SL _{DDT}	5	-0.75
SLa _{DDT}	18	-0.1
SL _{ENDOSULFÁN}	0	-1
SLa _{ENDOSULFÁN}	0	-1
SL _{CLOLDANO}	0	-1
SLa _{CLOLDANO}	0	-1
Controles negativos		
SL	20	0

Los valores corresponden a la media (n=3)

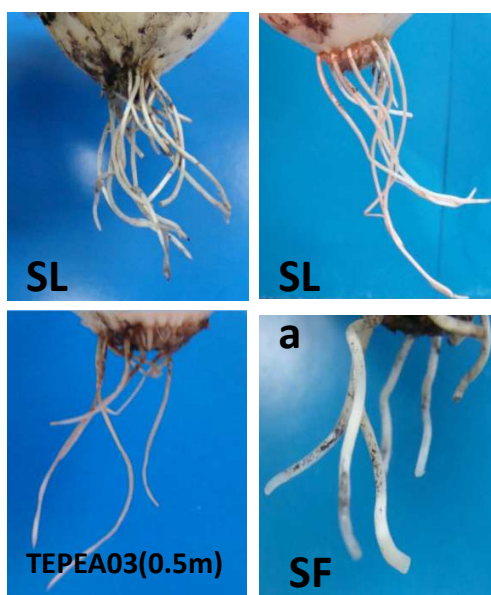
La elongación radicular de los bulbos en SL fueron 50% menor que en SLa (10mm); siguiéndole los bulbos en los controles negativos. Los bulbos en TEPEA01(Sup) tuvieron una elongación radicular similar a la del control positivo DDTa, mientras que en TEPEA01(0.5m) y TEPEA03(0.5m) no se presentó crecimiento radicular en los bulbos de cebolla. Es importante mencionar que las raíces en TEPEA03(0.5m) presentaron una aparente deshidratación o necrosis, a comparación a las muestras SL y SLa donde se observan las raíces

desarrolladas, además cabe mencionar que las raíces en la muestra SF se observaron más anchas (Fig. 20).

En cuanto a las muestras expuestas a plaguicidas, se observa que aquellas que contenían endosulfán y clordano no presentaron un crecimiento del ápice radicular.

La elongación radicular en los ápices expuestos a diesel, se observa que cuanto mayor es la concentración de diesel se disminuye el crecimiento radicular, esto se observa para las muestras de **Diesel L₁₂₀₀** a **Diesel L₈₀₀₀** y **Diesel a₁₂₀₀** a **Diesel a₈₀₀₀**. Lo anterior de muestra que este hidrocarburo es un factor limitante para el desarrollo adecuado de esta especie vegetal.

De acuerdo a los resultados anteriores, el no crecimiento de las raíces en las muestras de TEPEA01(Sup), TEPEA01(0.5m) y TEPEA03(0.5m) puede deberse al efecto de los componentes del petróleo crudo derramado, debido a que se observa que el diesel no inhibe el crecimiento completamente y la concentración de los plaguicidas en las muestras del área de estudio es baja.



SL=suelo limpio, SLa= suelo limpio agrícola, TEPEA03(0.5m) = muestra problema,
SF=suelo contaminado con fenantreno

Figura 20. Fotografía del crecimiento radicular de cebolla *Allium cepa* L. expuestas a las diferentes muestras de suelos, controles y suelo de Tepeaca, Puebla

Evaluación de citotoxicidad con Allium cepa L.

En cuanto a las observaciones microscópicas de los ápices de *Allium cepa*, primeramente se obtuvieron los porcentajes de cada fase mitótica (**Tabla 17**). Para posteriormente observar a nivel celular posibles aberraciones mitóticas como micronúcleos, núcleos anormales, polinúcleos y puentes interfásicos.

La fase mitótica con mayor porcentaje es la interfase, siguiéndole la profase, metafase, anafase y telofase. En la interfase el porcentaje mayor se presentó los ápices en TEPEA03(0.5m) con el 100% (por arriba de los controles negativos y positivos), TEPEA01(Sup) con 99.7 % y DDTa con 93%.

En las muestras expuestas a diferentes concentraciones de diesel se observa que la mayoría se encuentran en la interfase, lo cual nos indica una menor división celular y un menor crecimiento radicular.

En el efecto de los plaguicidas, se puede destacar que en las muestras expuestas a endosulfán y clordano se presentaron mayores porcentajes en la profase, a diferencia con el DDT que se observaron en la interfase. Esta diferencia, puede atribuirse a las propiedades químicas de estos compuestos xenobióticos que afectan de diferente forma en las fases mitóticas de esta especie vegetal.

En las muestras, los ápices que presentaron únicamente células en profase fueron TEPEA01(0.5m) con 4.3%, este porcentaje no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto a los controles positivos y negativos, que oscilaron entre 7.7-4.5%. profase a diferencia del DDT que presentó mayor porcentaje en interfase.

Los ápices que presentaron mayor porcentaje de células en metafase fueron de los bulbos sometidos a SF, nuevamente los ápices en TEPEA01(SUP) y TEPEA03(0.5m) no presentaron ninguna célula en metafase, TEPEA01(0.5m) tuvo 1.3%, este valor no tuvo diferencias estadísticamente significativas con los controles positivos y negativos (**Fig. 21**).

Mientras que en la anafase y telofase los porcentajes que se obtuvieron en las muestras y los controles (negativos y positivos) no presentaron diferencias estadísticamente significativas, los porcentajes oscilaron 0-1.8% en la anafase y en la telofase entre 0-2.7%.

Tabla 17. Porcentaje de células en cada fase mitótica en ápices de *Allium cepa* L. en muestras de suelo de Tepeaca, Puebla y controles

Muestra	Interfase %	Mitosis			
		Profase %	Metafase %	Anafase %	Telofase %
T _{EPEA01(SUP)}	99.3 ^a	0 ^e	0 ^d	0 ^a	0.7 ^{a,b}
T _{EPEA01(0.5m)}	90.3 ^c	4.3 ^{c,d,e}	1.3 ^{b,c}	1.7 ^a	2.3 ^a
T _{EPEA03(0.5m)}	100.0 ^a	0 ^e	0 ^d	0 ^a	0 ^b
Controles positivos					
SL _{FENFANTRENO}	87.5 ^c	5.3 ^{c,d}	2.7 ^a	1.8 ^a	2.7 ^a
SL _{DIESEL1200}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{aDIESEL1200}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{DIESEL3000}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{aDIESEL3000}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{DIESEL5000}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{aDIESEL5000}	100 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0 ^b
SL _{DIESEL8000}	99.3 ^a	0 ^e	0 ^a	0 ^a	0.7 ^{a,b}
SL _{aDIESEL8000}	98 ^{a,b}	1 ^{d,e}	0 ^a	0 ^a	1 ^{a,b}
SL _{DDT}	91.3 ^c	4.5 ^{c,d}	2.0 ^{a,b}	1.3 ^a	0.8 ^{a,b}
SL _{aDDT}	93 ^{b,c}	5.3 ^{c,d}	0.5 ^{c,d}	0.3 ^a	0.8 ^{a,b}
SL _{ENDOSULFÁN}	6 ^d	93.7 ^{a,b}	0 ^d	0.2 ^a	0.2 ^b
SL _{aENDOSULFÁN}	10.7 ^d	89.3 ^b	0 ^d	0 ^a	0 ^b
SL _{CLORDANO}	6 ^d	94 ^a	0 ^d	0 ^a	0 ^b
SL _{aCLORDANO}	6.7 ^d	93.3 ^{a,b}	0 ^d	0 ^a	0 ^b
Controles negativos					
SL	89.2 ^c	7.7 ^c	0.8 ^{b,c,d}	0.8 ^a	1.5 ^{a,b}
SL _a	91.7 ^c	6.2 ^c	1.0 ^{b,c,d}	0.3 ^a	0.8 ^{a,b}

Los valores corresponden a la media, n=3 ($\alpha=0.05$). Literales iguales (a, b, c, d) dentro de un mismo bloque (cada fase) indican que no hay diferencias estadísticamente significativas, según prueba de Tukey.

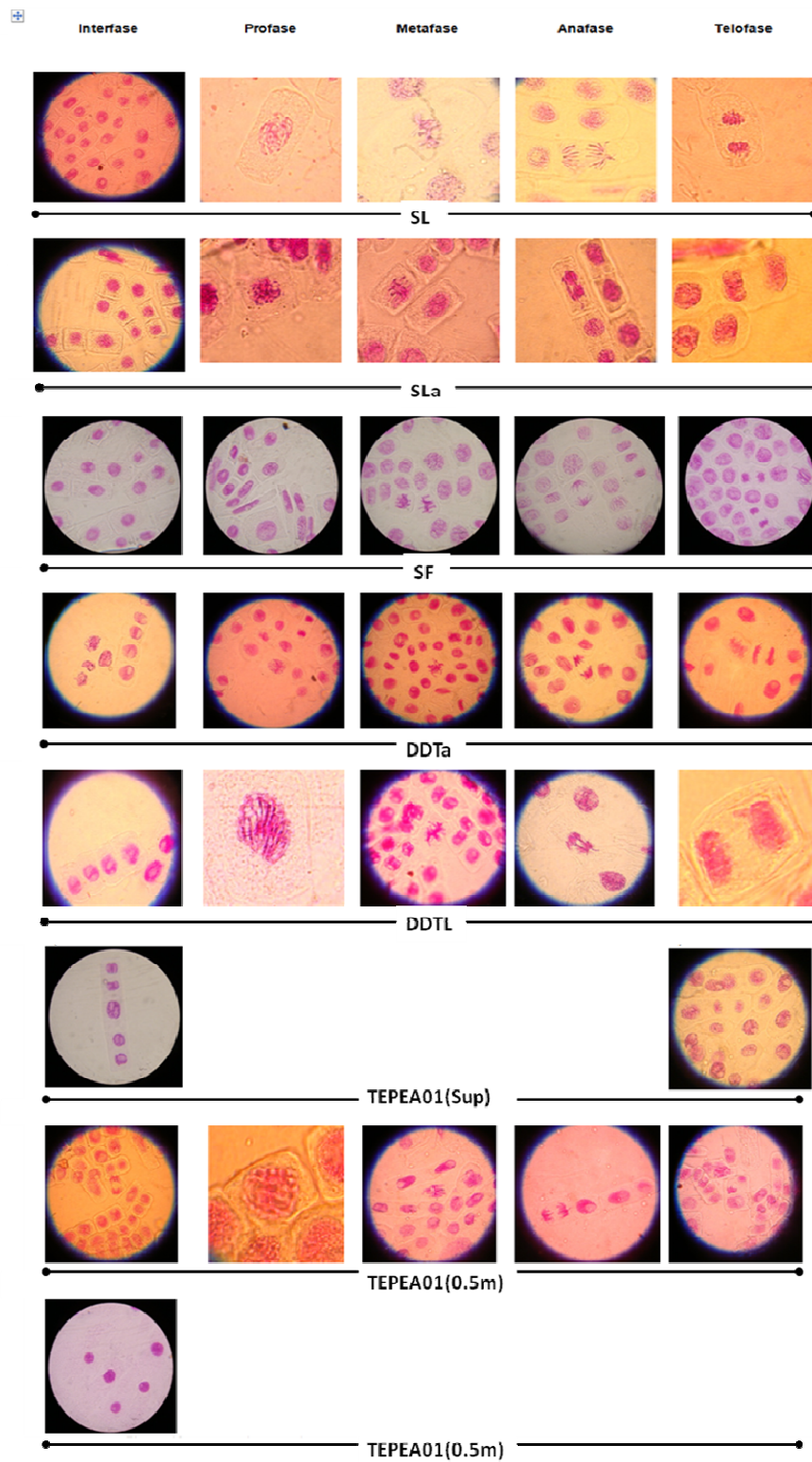


Figura 21. Fases mitóticas en ápices radiculares de cebolla *Allium cepa* L. expuestas a las diferentes muestras de suelos, controles y suelo de Tepeaca, Puebla

En cuanto a las aberraciones mitóticas, estas se observaron en muestras expuestas a fenantreno, DDT y en la muestra TEPEA01(0.5m). De acuerdo a Pereira *et al* (2009) estas aberraciones se pueden clasificar como cromosomas rezagados y reenviados (**Fig. 22a,d,i**), estekinesis (**Fig. 22b,f,j**), puentes anafásicos (**Fig. 22d**) y se observó una aberración no documentada de una deformación de los cromosomas durante la metafase (**Fig. 22c,e,g,h**).

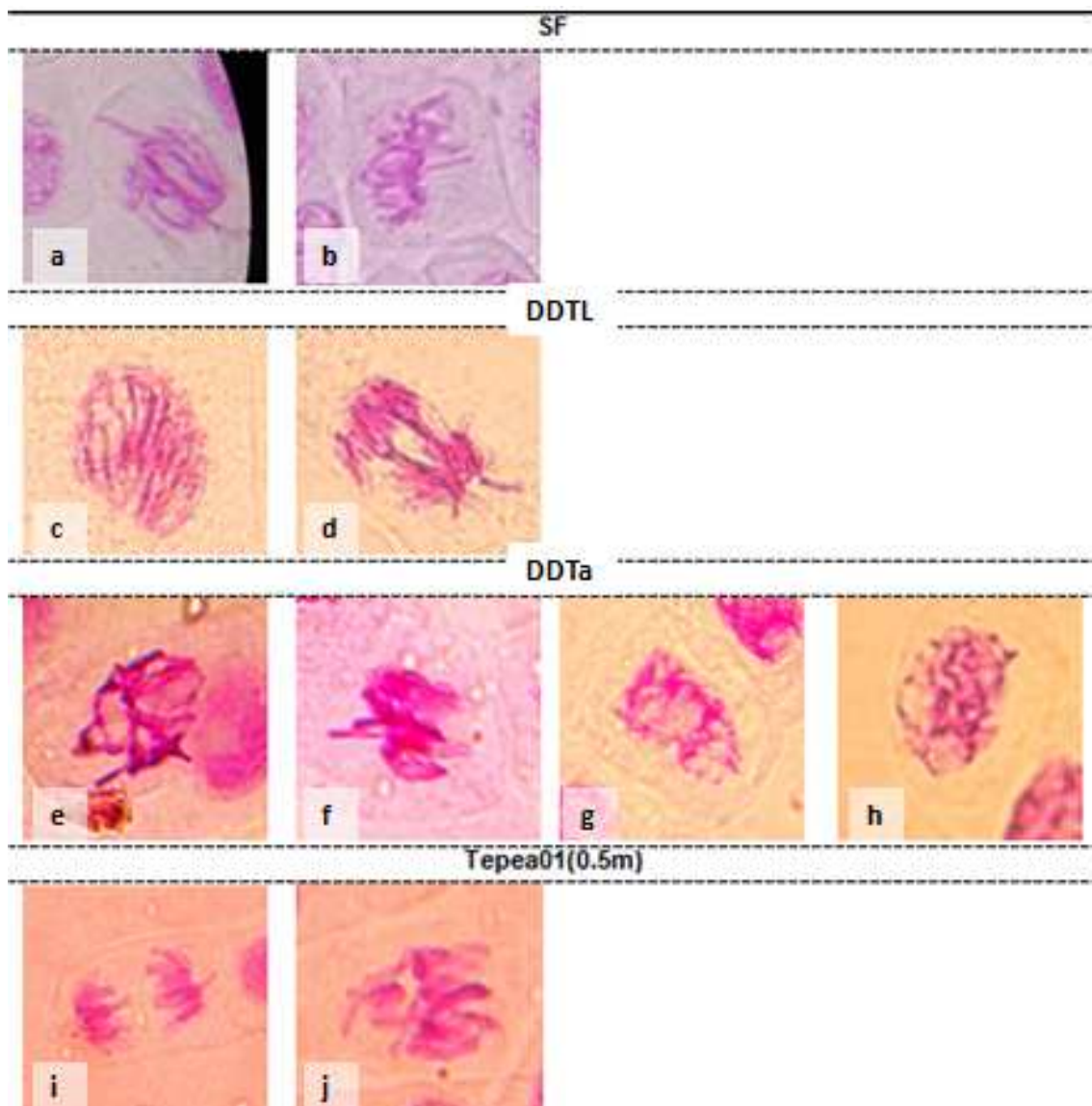


Figura 22. Aberraciones mitóticas en ápices radiculares de cebolla *Allium cepa* L. expuestas a fenantreno, DDT y muestra de suelo de Tepeaca, Puebla

CONCLUSIONES

En el proceso de remediación con dos contaminantes diferentes, la degradación de los hidrocarburos y plaguicidas no presentaron ningún efecto inhibitorio entre ambos. Además de que se observó que la bioestimulación de los microorganismos nativos del suelo agrícola favoreciendo la reducción de los contaminantes.

En el análisis de las variables utilizadas en el diseño Plackett-Burman se observó que algunas variables afectan positivamente la degradación de hidrocarburos y otras que afectan positivamente la remoción de los plaguicidas organoclorados. Para la optimización del proceso de remediación se consideraron el $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y la humedad.

En el diseño factorial para la optimización, se logró determinar la cantidad adecuada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y humedad para promover una mayor remoción de HFM, HFP y plaguicidas OCs. Estos resultados son importantes para realizar el escalamiento de esta tecnología de recuperación de sitios contaminados.

De acuerdo a las pruebas con los microorganismos aislados se concluye que *B. pumillus* y *M. guilliermondii* y los 5 hongos filamentosos son capaces de degradar hidrocarburos y plaguicidas. Por lo que se demuestra que la bioaumentación con dichos microorganismos representa una alternativa viable para la remediación de suelos agrícolas impactados, pero cada microorganismo aislado puede afectar al sistema de manera diferente.

En las pruebas de fitotoxicidad se observó que la muestra de suelo de Tepeca que presentaba una mayor contaminación de HFM y OCs, presentó un efecto negativo en la germinación, crecimiento radicular e índice de germinación para la semilla de lechuga, en comparación con las otras muestras que presentaban una menor concentración de contaminantes.

En las pruebas de citotoxicidad en cebolla se observó que muestras contaminadas con HFM y OCs afectan la división celular y crecimiento de las raíces en esta especie. En los controles positivos el diesel inhibió poco el crecimiento radicular, mientras que el endosulfán y clordano inhibieron por completo el crecimiento radicular. Por otra parte, se observaron aberraciones

mitóticas en la anafase y metafase en las células de raíces de cebolla expuestas a DDT y fenantreno.

La tecnología de Cultivo Sólido utilizando grano de café, paja, biofertilizantes, humedad, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 y micronutrientes, favoreció la biodegradación de ambos contaminantes (plaguicidas e hidrocarburos) de manera conjunta. Estos resultados indican el potencial de esta tecnología verde como alternativa para la biorremediación de suelos a nivel de campo.

LITERATURA CITADA

- Acevedo, F., Pizzul, L., Castillo, M. P., Cuevas R. y Diez, M. C. 2011. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the chilean white-rot fungus *Anthracophyllum discolor*. *J. Hazard. Mater.*, 185: 212-219.
- Acuña A., Pucci, O. y Pucci, G. 2008. Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de la Patagonia Argentina. *Ecosistemas*, 17: 85-93.
- Admassu, W. y Korus. R. A. 1996. Engineering of bioremediation processes: needs and limitations. En: Crawford, R. L. y Crawford, D. L. 1996. *Bioremediation principles and applications*. Cambridge University Press. United Kingdom. 13-34 pp.
- Ahmad, F., Iqbal, S., Anwar, S., Afzal, M., Islam, E., Mustafa, T., Khan, Q. M. 2012. Enhanced remediation of chlorpyrifos from soil using ryegrass (*Lolium multiflorum*) and chlorpyrifos-degrading bacterium *Bacillus pumilus* C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 237-238: 110– 115.
- Aksu, Z. 2005. Application of biosorption for the removal of organic pollutants: a review. *Process Biochemistry*, 40: 997-102.
- Albert, L. A. y Benítez, J. A. 1996. Impacto ambiental de los plaguicidas en los ecosistemas costeros. En: Botello, A. V., Rojas-Galaviz, J. L., Benítez, J. A. y Zárate-Lomelí, D. (Eds.). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*. EPOMEX Serie Científica 5. Universidad Autónoma de Campeche. México: 107-123 pp.
- Anwar, S., Liaquat, F., Khan, Q. M., Khalid, Z. M., y Iqbal, S. 2009. Biodegradation of chlorpyrifos and its hydrolysis product 3,5,6-trichloro-2-pyridinol by *Bacillus pumilus* strain C2A1. *Journal of Hazardous Materials*, 168: 400-405.
- Atlas, R. M., 1981. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: An environmental perspective. *Microbial. Rev.*, 45(1):180-209.
- Barbash, J. E. 2005. The geochemistry of pesticides. En: Lollar, B. S. (Ed.). *Environmental Geochemistry*, Vol. IX of Treatise on Geochemistry. Elsevier-Pergamon, Oxford, UK: 541-573 pp.
- Barbério, A., Voltolini, J. C. y Mello, M. L. S. 2011. Standardization of bulbs and root sample sizes for the *Allium cepa* test. *Ecotoxicology*, 20: 927- 935.
- Barragán-Huerta, B.E., Costa- Pérez, C., Peralta-Cruz, J., Barrera-Cortés, J., Esparza-García, F. y Rodríguez-Vázquez, R. 2007. Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 59(3): 239-244.
- Bergsten-Torralba, L. R., Nishikawa, M. M., Baptista, D. F., Magalhães, D. P. y da Silva, M. 2009. Decolourization of different textile dyes by *Penicillium simplicissimum* and toxicity evaluation after fungal treatment. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40: 808-817.
- Bernal, C. M. P. 2004. Fertilidad y contaminación de los suelos agrícolas con aplicación al cultivo de la vid. España http://www.haro.org/pdf/resumen_bernal.pdf [Consulta: 14 de agosto de 2011].
- Betancur-Corredor, B., Pino, N. J., Cardona, S. y Peñuela, G. A. 2015. Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of environmental sciences (China)*, 28: 101-9.

- Bhalerao, T. S. 2013. Combined Bioaugmentation and Biostimulation - To Cleanup Endosulfan Contaminated Soil. *Asian Journal of Applied Sciences*, 1(05): 163-170.
- Boonchan, S., Britz, M. L. y Stanley, G. A. 2000. Degradation and mineralization of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cocultures. *Appl. Environ. Microbiol*, 66: 1007-1019.
- Castillo, R. F., 2005. *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar. Madrid, España. 614 pp.
- Ce-Hui, M., Quan-Ying, C., Hai-Qin, L., Qiao-Yun, Z., Shi-Rong, T. y Yue-Chun, Z. 2008. Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soils. *Chemosphere*, 73(1): 120-125.
- Chávez-Gómez, B., Quintero, R., Esparza-García, F., Mesta-Howard, A., de la Serna, F. J. Z. D., Hernández-Rodríguez, C., Gillen, T., Poggi-Varaldo, H., Barrera-Cortés, J. y Rodríguez-Vázquez, R., 2003. Removal of phenanthrene from soil by co-cultures of bacteria and fungi pregrown on sugarcane bagasse pith. *Bioresource Technology*, 89: 177-183.
- Chemlal, R., Tassist, A., Drouiche, M., Lounici, H., Drouiche, N., y Mameri, N. 2012. Microbiological aspects study of bioremediation of diesel-contaminated soils by biopile technique. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 75: 201-206.
- Cho, Y., Kwon, O., Soccol, R. C., Bethoney, C. M. y Rhee G. 2001. Microbial PCB dechlorination in degraded sediments and the effect of the moisture. *Chemosphere*, 43: 1119-1126.
- Choi, S. D., Hong, H. B. y Chang, Y. S. 2003. Adsorption of halogenated aromatic pollutants by a protein released from *Bacillus pumilus*, *Water Research*, 37: 4004-4010.
- CICOPLAFEST, 2004. *Catálogo Oficial de Plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas*. México, D.F. 624 pp.
- Coda, R., Rizzello, C. G., Di Cagno, R., Trani, A., Cardinali, G. y Gobbetti, M. 2013. Antifungal activity of *Meyerozyma guilliermondii*: identification of active compounds synthesized during dough fermentation and their effect on long-term storage of wheat bread. *Food Microbiol*, 33(2): 243-51.
- Costa, S. P., Angelim, A. L., de Queiroz, M. D. F. V. y Melo, V. M. M. 2014. Vegetative cells of *Bacillus pumilus* entrapped in chitosan beads as a product for hydrocarbon biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.*, 87: 122-127.
- Díaz- Baéz M. C., Ronco A. y Pica- Granados, Y. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con bulbos de cebolla (*Allium cepa*), mediante la evaluación de la inhibición del crecimiento promedio de raíces. *En: Ramírez- Romero P. y Mendoza-Cantú A. (Eds.) Ensayos Toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo*. México, D.F.: INE-SEMARNAT. 414 pp.
- Duarte, E. A. A., Lacerda, G. V. Jr, de Oliveira, T. A. S., Brendel, M., Loguercio, L. L. y Cascardo, J. C. 2013. Bioprospection of bacteria and yeasts from Atlantic Rainforest soil capable of growing in crude-glycerol residues. *Genetics and Molecular Research*, 12: 4422-4433.
- Dzul-Puc, J., Esparza-García, F., Barajas-Aceves, M. y Rodríguez-Vázquez, R., 2004. Benzo[a]pyrene removal from soil by *Phanerochaete chrysosporium* grown on sugarcane bagasse and pine sawdust. *Chemosphere*, 58: 1-7.

- Einax, J., Heinz, W., Zwanziger, W. y Geib, S. 1997. *Chemometrics in environmental analysis*. Editorial VHC-Wiley, Republica Federal de Alemania. 381 pp.
- Ekundayo, F. O. y Osunla C. A. 2013. Phytase activity of fungi from oil polluted soils and their ability to degrade bonnylight crude oil. *African Journal of Biotechnology*, 12(36): 5540-5548.
- EPA 1664A. Method n-Hexane Extractable Material (HEM; Oil and Grease) and Silica Gel Treated n-Hexane Extractable Material (SGT-HEM; Non-Polar Material) by Extraction and Gravimetry. <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/upload/Method-1664-Revision-B-n-Hexane-Extractable-Material-HEM-Oil-and-Grease-and-Silica-Gel-Treated-n-Hexane-Extractable-Material-SGT-HEM-Non-polar-Material-by-Extraction-and-Gravimetry.pdf>
- EPA 3546. Method Microwave extraction <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3546.pdf>
- EPA 8015C. Method nonhalogenated organics by gas chromatography (FID) <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8015c.pdf>
- EPA 8081B. Method organochlorine pesticides by gas chromatography (ECD) <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/8081b.pdf>
- EPA 9071B. Method n-hexane extractable material (hem) for sludge, sediment, and solid samples <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/9071b.pdf>
- Fantroussi, S, E. I. y Agathos, S, N. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.*, 8:268-275.
- Fernández, L. C., Rojas, N., Roldán, T., Ramírez, M., Zegarra, H., Uribe, R., Reyes, R., Flores, D. y Arce, J. 2006. *Manual de técnicas de análisis de suelo aplicados a la remediación de sitios contaminados*. Instituto Nacional de Ecología, México. 180 pp.
- Fernández-Sánchez, J., Rodríguez-Vázquez, R., Ruiz-Aguilar, G. y Álvarez, P. 2001. PCB biodegradation in age contaminated soil: Interactions between exogenous *Phanerochaete chrysosporium* and indigenous microorganisms. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*. 36: 1145-1162.
- Fiskesjö, G., 1989. *Invitox protocol no. 8 Allium test*. En: G. Fiskesjö (Ed.). Russel and Burch House, Nottingham. 102 pp.
- Franz, A., Burgstaller, W. y Schinner, F. 1991. Leaching with *Penicillium simplicissimum*: influence of metals and buffers on proton extrusion and citric acid production. *Appl. Environ. Microbiol*, 57: 769-774.
- Galán-Huertos, E., Gómez-Ariza, J. L., Bellinfante-Crocci, N. y Aparicio-Fernández, P. 2003. *Contaminación de suelos por compuestos orgánicos*. Informe final. Sevilla, España. 185 pp.
- García, R. V., 2011. *Sólo ocho hectáreas fueron afectadas por derrame: SDR*. San Martín Texmelucan. El Herald de Puebla. http://www.heraldodepuebla.com.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=24619:solo-ocho-hectareas-fueron--afectadas-por-derrame-sdr&catid=54:general&Itemid=26 [Consulta: 09 de febrero de 2011].
- Ge, Y., Zhang, J., Zhang, L., Yang, M. y He, J. 2008. Long-term Fertilization Regimes Affect Bacterial Community Structure and Diversity of an Agricultural Soil in Northern China. *J. Soils Sediments*, 8(1): 43-50.

- Gloud, W. D. 1990. Biological control of plant root disease by bacteria. *En: Nakas, J.P. y Hagedorn, C. (Eds.). Biotechnology of Plant-Microbe Interactions.* McGraw-Hill, New York, 287-372 pp.
- González-Farías, F., 2003. Pesticides in the coastal zone of Mexico. *En: Taylor, M. D., Klaine, S. J., Carvalho, F. P., Barcelo, D. y J. Everaarts (Eds.) Pesticide Residues in Coastal Tropical Ecosystems: Distribution, fate and effects.* Taylor y Francis, Nueva York. 311-337pp.
- Goulart G. G., Coutinho, J. O. P. A., Monteiro, A. S., Siqueira, E. P. y Santos, V. L. 2014. Isolation and Characterization of Gasoline-Degrading Yeasts from Refined Oil-Contaminated Residues. *J. Bioremed. Biodeg*, 5:214.
- Goswami, S., Vig, K. y Singh, D.K. 2009. Biodegradation of alpha and beta endosulfan by *Aspergillus sydoni*. *Chemosphere*, 75: 883-888.
- Granström, T., Lindberg, P., Nummela, J., Jokela, J. y Leisola, M. 2002. Biodegradation of VOCs from printing press air by an on-site pilot plant bioscrubber and laboratory scale continuous yeast cultures. *Biodegradation*, 13:155-162.
- Henry, J. G. y Heinke, G. W. 1999. *Ingeniería Ambiental*. México. Segunda edición. Pearson Education. 778 pp.
- Hernández, M., 2010. *Derrame de petróleo por toma clandestina: PEMEX.* http://www.pueblaonline.com.mx/index.php?option=com_k2&view=item&id=4312:controlan-la-fuga-de-petr%C3%B3leo-y-ahora-empieza-evaluaci%C3%B3n-de-da%C3%B1os&Itemid=128 [Consulta: 10 de febrero de 2011].
- Hinchee, R. E y Ong, S. K. 1992. A rapid in situ respiration test for measuring aerobic biodegradation rates of hydrocarbons in soil. *J Air Waste Manage Assoc.*, 42(10): 1305-1312.
- Hodgson, E. y Levi, P. L. 2001. Metabolism of Pesticides. *En: R. Krieger (Ed). Handbook of Pesticide Toxicology.* Vol. 1. Academic Press, Nueva York. 531-548 pp.
- Hussain, S., Arshad, M., Saleem, M. y Khalid, A. 2007. Biodegradation of a- and b-endosulfan by soil bacteria. *Biodegradation*, 18:731-740.
- INEGI, 2011. Aspectos geográficos de Puebla: Agricultura y vegetación. http://mapserver.inegi.gob.mx/geografia/espanol/estados/pue/agr_veget.cfm?c=1215&e=21&CFID=2375197&CFTOKEN=10529460 [Consulta: 16 de febrero de 2011].
- Islas-García, A., Vega-Loyo, L., Aguilar-López, R., Xoconostle-Cázares, B. y Rodríguez-Vázquez, R. 2015. Evaluation of hydrocarbons and organochlorine pesticides and their tolerant microorganisms from an agricultural soil to define its bioremediation feasibility, *Journal of Environmental Science and Health, Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 50(2): 99-108, DOI: 10.1080/03601234.2015.975605
- Jin-Shao, Y., Yin, H., Qiang, J., Peng, H., Hua-Ming, Q. y Zhang, Na. 2011. Biodegradation of anthracene by *Aspergillus fumigatus*. *Journal of hazardous materials*, 185(1): 174-81.
- Juwarkar, A., Singh, S. y Mudhoo, A. 2010. A comprehensive overview of elements in bioremediation. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.*, 9: 215-288.
- Kadali, K. K., Simons, K. L., Skuza, P. P., Moore, R. B. y Ball, A. S. 2012. A complementary approach to identifying and assessing the remediation potential of hydrocarbonoclastic bacteria. *J. Microbiol. Methods.*, 88: 348-355.

- Kafilzadeh, F., Moslem, E. y Yaghoob, T. 2015. Isolation and identification of endosulfan-degrading bacteria and evaluation of their bioremediation in Kor River, Iran. *Osong public health and research perspectives*, 6(1): 39-46.
- Klavins, M., Eglite, L. y Zicmanis, A. 2006. Immobilized humic substances as sorbents. *Chemosphere*, 62: 1500-1506.
- Kodešová R, Kočárek, M., Kodeš, V., Drábek, O., Kozák, J. y Hejtmánková K. 2011. Pesticide adsorption in relation to soil properties and soil type distribution in regional scale. *J. Hazard. Mater.*, 186(1): 540-550.
- Kumar, M., Lakshmi, C. V. y Khanna, S. 2008. Biodegradation and bioremediation of endosulfan contaminated soil. *Bioresour. Technol.*, 99: 3116-3122.
- Kumar, M. y Philip, L. 2006. Adsorption and desorption characteristics of hydrophobic pesticide endosulfan in four Indian soils. *Chemosphere*, 62(7): 1064-1077.
- Launen, L., Pinto, L., Wiebe, C., Kiehlmann, E. y Moore, M. 1995. The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi. *Can. J. Microbiol.*, 41: 477-488.
- Launen, L. A., Dutta, J., Turpeinen, R., Eastep, M. E., Dorn, R., Buggs, V. H., Leonard, J.W. y Häggblom, M.M. 2008. Characterization of the indigenous PAH-degrading bacteria of *Spartina* dominated salt marshes in the New York/New Jersey Harbor. *Biodegradation*, 19: 347-363.
- Lee, K. y Merlin, F. X. 1999. Bioremediation of oil on shoreline environments: development of techniques and guidelines, *Pure Appl. Chem.*, 71(1): 161-171.
- Lee, T. H., Byun, I. G., Kim Y. O., Hwang I. S. y Park T. J. 2006. Monitoring biodegradation of diesel fuel in Bioventing processes using in situ respiration rate. *Water Science and Technology*, 53(4-5): 263-272.
- Levin, M. y Gealt, M. 1997. *Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos*. McGraw-Hill. Madrid, España. 153 pp.
- Li, D. X. 1995. Continuous bioventing monitoring using a new sensor technology. En: Hinchee, R.E., Douglas, G.S. y Ong, S.K. (Eds). *Monitoring and Verification of Bioremediation*, Battelle Press: Columbus, OH., 115-126 pp.
- Maroto, A. E. y Rogel, J. M. 2001. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. Geocisa. División de protección ambiental de suelos España. http://aguas.igme.es/igme/publica/con_recu_acuiferos/028.pdf [Consulta: 05 de abril de 2011].
- Martín, C., Aldo González, A. y Blanco, M. 2004. Tratamientos biológicos de suelos contaminados: contaminación por hidrocarburos. Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. *Revista Iberoamericana Microbiología*, 21: 103-120.
- Marr, J., Kremer, S., Sterner, O. y Anke, H. 1996. Transformation and mineralization of halophenols by *Penicillium simplicissimum* SK9117. *Biodegradation*, 7:165-171.
- Meyers, P. A y Ishiwatari, R. 1993. Lacustrine organic geochemistry-an overview of indicators of organic matter sources and diagenesis in lake sediments. *Organ. Geochem.*, 20: 867-900.
- Mo, C. H., Caj, Q. Y., Li, H. Q., Zeng, Q. Y., Tang, S. R. y Zhao, Y. C. 2008. Potential of different species for use in removal of DDT from the contaminated soils. *Chemosphere*, 73(1):120-125.

- Montgomery, D. C., 2011. *Diseño y análisis de experimentos*. Segunda Edición. Editorial Limusa Wiley México, D.F. 686 pp.
- Muhammad, A., Tatheer, A.N., Maria, K., Faisal, R., Abdul, H. y Safia, A. 2011. Detection of the organophosphate degrading gene *opdA* in the newly isolated bacterial strain *Bacillus pumilus* W1. *Ann. Microbiol.*, 4: 152-158.
- Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications for biosurfactants. *Environmental Pollution*, 133: 183–198.
- Nakayan, P., Hammed, S., Singh, L. S, Young, M. H. y Hung, Y. 2013. Phosphate-solubilizing soil yeast *Meyerozyma guilliermondii* CC1 improves maize (*Zea mays* L.) productivity and minimizes requisite chemical fertilization. *Plant and Soil.*, 373: 301-315.
- Navarro, P., Moral, H., Gómez, L. y Mataix, K. 1995. *Residuos Orgánicos y Agricultura*. Universidad de Alicante. España. 155 pp.
- Norma Oficial Mexicana, 2003. *NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012*. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación.
- Novotný, C., Rawal, B., Bhatt, M., Patel, M., Šašek, V. y Molitoris, H. P. 2003. Screening of fungal strains for remediation of water and soil contaminated with synthetic dyes. *En: Šašek, V., Glaser, J. A. y Baveye, P. (Eds.). The utilization of bioremediation to reduce soil contamination: problems and solution*. Kluwer Academic Publishers, Amsterdam, The Netherlands. 143-148 pp.
- OEIDRUS Puebla, 2011. Oficina estatal de información para el desarrollo rural sustentable Puebla. Anuario estadístico de producción agrícola 2008. <http://www.oeidrus-puebla.gob.mx/> [Consulta: 21 de febrero de 2011].
- Ortíz, I., Velasco, A., Le Borgne, S. y Revah, S. 2013. Biodegradation of DDT by stimulation of indigenous microbial populations in soil with cosubstrates. *Biodegradation*, 24(2): 215-225.
- Ortiz, J. E., García, M. J. y Rodríguez, J.L., 2003. Biomarcadores y su utilidad en la evaluación de la biodegradación del petróleo. *Industria y Minería*, 351: 41-45.
- Pacheco, M. L., Peña-Méndez, E. M. y Havel, J. 2003. Supramolecular interactions of humic acids with organic and inorganic xenobiotics studied by capillary electrophoresis. *Chemosphere*, 51: 91-108.
- Pandey, A., Soccol, C., Nigam, P. y Soccol, V. 2000. Biotechnological potential of agroindustrial residues: Sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, 74: 69–80.
- Pankrantz, T. M. 2001. *Environmental Engineering Dictionary and Directory*. CRC Press, Boca Raton, FL. 335 pp.
- Pao-Wen, G. L, Tsung-Chain, C., Liang-Ming, W., Chun-Hsuan, K., Po-Tseng, P. y Sheng-Shung, C. 2011. Bioremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soil: Effects of strategies and microbial community shift. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 65: 1119-1127.
- Pereira, F., Vilanova, C., Pereira, L., Braga, A., Delleon, H., Pavanin, L. y Silveira, E. 2009. Cytotoxic and genotoxic effects of cis- Tetraammine (oxalato) Rutenium (III) Dithionate on the root meristem cells of *Allium cepa*. *Biol. Trace. Elem. Res.*, 128: 258-268.
- Pérez-Armendáriz, B., Loera-Corral, O., Fernández-Linares, L., Esparza- García, F. y Rodríguez-Vázquez, R. 2004. Biostimulation of microorganisms from sugarcane

- bagasse pith for the removal of weathered hydrocarbon from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 38: 373-377.
- Pesakovic, M., Karaklaji-Stajica, Z., Milenkovicb, S. y Mitrovica, O. 2013. Biofertilizer affecting yield related characteristics of strawberry (*Fragaria×ananassa* Duch.) and soil micro-organisms. *Scientia Horticulturae*, 150: 238-243.
- PEMEX, 2011a. Transporte, almacenamiento y distribución. <http://www.pemex.com/index.cfm?action=content§ionID=137&catID=12060> [Consulta: 14 de febrero de 2011].
- PEMEX, 2011b. Combate al mercado ilícito de combustibles. <http://www.pemex.com/index.cfm?action=content§ionid=1&catid=11063> [Consulta 15 de Febrero de 2011].
- Plimmer, J. R. 2001. Chemistry of pesticides. En: R. Krieger (Ed). *Handbook of Pesticide Toxicology*. Vol. 1. Academic Press, Nueva York. 95-107 pp.
- Poblanerías, 2010. Detectan derrame de petróleo entre Acajete y Amozoc. <http://www.poblanerias.com/actualidad/31577-detectan-derrame-de-petroleo-entre-acajete-y-amozoc.html> [Consulta 17 de febrero de 2011].
- Ponce, V. G. y Botello, A. V., 2005. Niveles de hidrocarburos en el Golfo de México. En: Botello, A. V., Rendón-von Osten, J., Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. (Eds.). *Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias*, 2da Edición. Univ. Autón. De Campeche, Univ. Nal. Autón. de México, Instituto de Ecología. México. 269-297 pp.
- Quadri, G., 1994. *Industria y política ambiental*. El Nacional. Sábado 18 de junio, México.
- Qureshi, A., Mohan, M., Kanade, G. S., Kapley, A. y Purohi, H. J. 2008. In situ bioremediation of organochlorine-pesticide-contaminated microcosm soil and evaluation by gene probe. *Pest. Manag. Sci.*, 65: 798-804.
- Reddy, M. V., Devi, M. P., Chandrasekhar, K., Goud, R. K. y Venkata-Mohan, S. 2011. Aerobicremediation of petroleum sludge through soil supplementation: Microbial community analysis. *J. Hazard. Mater.*, 197: 80-87.
- Rengel, Z. 2008. Bioavailability of Phosphorus and Micronutrients in the Soil-Plant-Microbe Continuum. *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, 8: 84-91.
- Rodríguez-Vázquez, R., Roldán-Martín, A. y del Río-Galván, P. 2011. Proceso de biorremediación en cultivo sólido con la adición de granos de café. Patente otorgada No. 291975. Instituto Mexicano de la Propiedad Intelectual.
- Restrepo, I., 1988. *Naturaleza Muerta: Los Plaguicidas en México*. Ediciones Omega, México, D.F. 236 pp.
- Rigas, F., Papadopoulou, K., Dritsa, V. y Doulia, D. 2007. Bioremediation of a soil contaminated by lindano utilizing the fungus *Ganoderma australe* via response surface methodology. *J. Hazard. Mater.*, 140: 325-332.
- Roldán-Martín, A., Calva-Calva, G., Rojas-Avelizapa, N., Díaz-Cervantes, D. y Rodríguez Vázquez, R. 2007. Solid culture amended with small amounts of raw coffee beans for the removal of petroleum hydrocarbon from weathered contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60: 35-39.
- Rodríguez, H, Fraga, R., González, T. y Bashan, Y. 2006. Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth_promoting bacteria. *Plant Soil.*, 287:15-21.

- Sabaté, J., Viñas, M. y Solana, A. M. 2004. Laboratory-scale bioremediation experiments on hydrocarbon-contaminated soils. *Int. Biodeterior. Biodegradation*, 54: 19-25.
- Saucedo-Castañeda, G., Trejo-Hernandez, M., Lonsane, B., Navarro, J., Russos, S., Dufour, D. y Raimbult, M. 1994. On-line automated monitoring and control systems for CO₂ in aerobic and anaerobic solid-state fermentations. *Process Biochemistry*, 29: 13-24.
- Seoanez-Calvo, M., 1996. Ingeniería del Medio Ambiente, Mundi-Prensa Libros S.A. Madrid. 332 pp.
- Setyo, A. P., Mori, T., Putra, S. R. y Kondo, R. 2013. Biotransformation of heptachlor and heptachlor epoxide by white-rot fungus *Pleurotus ostreatus*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 82: 40-44.
- Shahsavari, E., Adetutu, E. M., Anderson, P. A. y Ball, A. S. 2013. Plant residues: a low cost, effective bioremediation treatment for petrogenic hydrocarbon-contaminated soil. *Sci. Total Environ.*, 443: 766-774.
- Shankar J. S., Pandey, V. C. y Singh, D. P. 2011. Efficient soil microorganisms: A new dimension for sustainable agriculture and environmental development. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 140(3-4): 339-53.
- Shazia, I., Uzma, Sadia, G. R. y Talat, A. 2013. Bioremediation of Heavy Metals Using Isolates of Filamentous Fungus *Aspergillus fumigatus* Collected from Polluted Soil of Kasur, Pakistan. *International Research Journal of Biological Sciences*, 2(12): 66-73.
- Shen, D. 1997. Microbial diversity and application of microbial products for agricultural purposes in China. *Agric. Ecosyst. Environ.*, 62: 237-245.
- Sobrero, M. C. y Ronco, A. 2008. Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa L.* En: Romero, P. R. y Cantú, A. M. (Eds.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* SEMARNAT, INE. México: 55-67 pp.
- Stenersen, J., 2004. *Chemical Pesticides. Mode of action and toxicology.* CRC PRESS, Nueva York, USA. 276 pp.
- Syed, J. H., Malik, R.N., Liu, D., Xu, Y., Wang, Y., Li, J., Zhang, G. y Jones, K. C. 2013. Organochlorine pesticides in air and soil and estimated air-soil exchange in Punjab, Pakistan. *Sci. Total Environ.*, 444:491-497.
- Sylvia, D., Fuhrman, J., Hartel, P. y Zuberer, D. 1999. *Principles and Applications of Soil Microbiology.* Prentice Hall, USA. 550 pp.
- Uribe, R. H., 2008. Ensayo de inhibición de la germinación y del alargamiento radicular en semillas de cebolla *Allium cepa* y Soya *Glycine max.* En: Romero, P. R. y Cantú, A. M. (Eds.). *Ensayos toxicológicos para la evaluación de sustancias químicas en agua y suelo. La experiencia en México.* SEMARNAT, INE. México: 285-289 pp.
- Van Hamme, J. D., Singh, A. y Ward, O. P. 2003. Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 67(4):503-549.
- Wong, F., Alegria, H. A. y Bidleman, T. F. 2010. Organochlorine pesticides in soils of Mexico and the potential for soil-air exchange. *Environ. Pollut.*, 158: 749-755.
- Wu, S. C., Caob, Z. H., Lib, Z. G., Cheung, K. C. y Wong M. H. 2005. Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderm*, 125:155-166.

- Xiao, P., Mori, T., Kamei, I. y Kondo, R., 2011. Metabolism of organochlorine pesticide heptachlor and its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to Genus *Phlebia*. *FEMS Microbiology Letters*, 314: 140-146.
- Xie H, Goa, F., Tan, W. y Wang, S. G. 2011. A short term study on the interaction of bacteria, fungi and endosulfan in soil microcosm. *Sci. Total Environ.*, 412-413: 375-379.
- Yamada-Onodera, K. H., Mukumoto, Y., Katsuyaya, Y., Saiganji, A. y Tani, Y. 2001. Degradation of polyethylene by a fungus, *Penicillium simplicissimum* YK. *Polym. Degrad. Stabil.*, 72: 323-327.
- Zhang, K., Hua, X. F., Han, H. L., Wang, J., Miao, C. C., Xu, Y. Y., Huang, Z.D., Zhang, H., Yang, J.M., Jin, W.B., Liu, Y.M. y Liu, Z., 2008. Enhanced bioaugmentation of petroleum- and salt-contaminated soil using wheat straw. *Chemosphere*, 73(9): 1387-1392.