



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA-Iztapalapa
DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

“FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS CON
HIDROCARBUROS POR *Festuca arundinacea*”

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE:
ESPECIALISTA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

IBI. CÁNDIDA MARÍA MARTÍNEZ RAMÍREZ

DIRECTOR:

Dr. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

ABRIL 2010

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	5
2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.....	5
2.1 Hidrocarburos derivados del petróleo	5
2.2 Fitorremediación	7
2.3 Planta fitorremediadora.....	8
2.4 Rizosfera.....	10
2.5 Características fisicoquímicas del suelo	10
3. JUSTIFICACIÓN	12
4. HIPÓTESIS	12
5. OBJETIVOS	12
5.1 OBJETIVO GENERAL.....	13
5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	13
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	13
7. MATERIALES Y MÉTODOS	14
7.1 Hidrocarburos	14
7. 2 Suelo.....	14
7.3 Contaminación del suelo.....	17
7.4 Semillas de <i>Festuca arundinacea</i>	18
7.5 Técnicas de germinación de semillas de <i>Festuca arundinacea</i>	18
7.6 Cultivo.....	20
7.7 Métodos analíticos	20
7.7.1 Biomasa de la planta	20
8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	22
8.1 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo.....	22
8.2 Técnicas de germinación de semillas	23
8.3 Efecto de los hidrocarburos sobre el crecimiento de la planta.....	25
8.4 Efecto de los hidrocarburos sobre la biomasa en la parte aerea y la raíz	26
8.5 Cuantificación de microorganismos en el suelo.....	27
8.6 Remoción de hidrocarburos residuales en el suelo	27
9. CONCLUSIONES.....	28
9. REFERENCIAS.....	29

RESUMEN

En el presente estudio se evaluó la capacidad fitorremediadora de *Festuca arundinacea*, planta perteneciente a la familia de las gramíneas, para remediar suelos contaminados artificialmente con una mezcla de hidrocarburos: un hidrocarburo alifático, hexadecano, y dos hidrocarburos aromáticos policíclicos, fenantreno y pireno. Se evaluaron cuatro técnicas de germinación de semillas de *F. arundinacea*. Una vez obtenido el mejor método de germinación, medio Murashige y Skoog (MS), se germinaron semillas bajo condiciones estériles y se mantuvieron en una cámara de germinación durante 30 días. Las plántulas obtenidas fueron trasplantadas a suelo contaminado con 100 ppm de hexadecano, fenantreno y pireno en una proporción 1:0.5:0.5, respectivamente. El suelo utilizado se colectó de un campo fértil ubicado en una zona del municipio de Hueyapoxtla, Estado de México; donde *F. arundinacea* crece de manera natural, se secó y tamizó. Durante 65 días de cultivo se observó la salud de las plantas en el suelo contaminado en contraste con suelo sin contaminar; se determinó el crecimiento de las plantas expresada como longitud de tallo. Después de 65 días de crecimiento, se determinó la biomasa de la planta, la estimulación de poblaciones microbianas y la remoción de hidrocarburos en el suelo; para tratamientos con planta y sin planta.

Se observó una disminución en la biomasa de las plantas de 68% en la parte aérea y 69% en la biomasa de la raíz en las plantas con suelo contaminado con respecto a las plantas crecidas en el suelo control sin hidrocarburos. Los resultados mostraron que no se observan diferencias significativas en el crecimiento de las plantas con respecto al control. La longitud promedio obtenida en suelo contaminado y sin contaminar es 22 y 44 cm respectivamente. A una concentración de 100 mg MHC/ kg suelo (100ppm) no se observó una diferencia significativa en el crecimiento de los microorganismos de la zona periférica a la rizosfera de las plantas, en los diferentes tratamientos.

Palabras clave: Fitorremediación, *Festuca arundinacea*, hidrocarburos.

1. INTRODUCCIÓN

En los últimos años el constante incremento en los contaminantes ha perturbado sensiblemente al medio ambiente. Algunos de estos contaminantes son los hidrocarburos alifáticos y los hidrocarburos aromáticos policíclicos, estos últimos, son considerados tóxicos y algunos de ellos mutagénicos y/o cancerígenos (Xu y col., 2006). Ante la problemática, ha surgido una técnica biológica que permite el uso de plantas y su asociación con los microorganismos de su rizosfera (López-Martínez y col., 2005) para remediar suelos que han sido dañados por la presencia de compuestos orgánicos como los hidrocarburos. La fitorremediación se favorece si se consideran las propiedades físico-químicas de los contaminantes y el tipo de planta utilizada; debido a que la planta debe mostrar resistencia a los contaminantes y ser capaz de absorber y degradar dichos contaminantes orgánicos (López-Martínez y col., 2005).

Tomando en cuenta los factores anteriores se utiliza ampliamente la familia de las gramíneas (Gawronski y Gawronska, 2007). *Festuca arundinacea* es una gramínea perteneciente a la familia de las poaceae, su distribución y crecimiento por todo el mundo la hacen una candidata ideal para cultivos en México en suelos contaminados con hidrocarburos. En este trabajo se evaluó la capacidad de *F. arundinacea* en asociación con los microorganismos del suelo para fitorremediar suelos artificialmente contaminados con una mezcla de hidrocarburos.

2. REVISIÓN BIBLIOGRAFICA

2.1 Hidrocarburos derivados del petróleo

El petróleo es un producto natural que se formó en el transcurso de millones de años debido a la transformación anaeróbica de compuestos orgánicos complejos provenientes de plantas y animales en putrefacción. El petróleo está compuesto principalmente por una mezcla de hidrocarburos alifáticos y

aromáticos (Morrison y Boyd, 1998). Los hidrocarburos alifáticos son compuestos orgánicos de cadena abierta, como es el caso del hexadecano que es una molécula de 16 átomos de carbono, mientras que los hidrocarburos aromáticos son los compuestos que presentan propiedades químicas similares a las del benceno como el naftaleno, antraceno y fenantreno, entre otros; sin embargo, a medida que aumentan la cantidad de anillos bencénicos fusionados, reciben el nombre de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Sims y Overcash, 1983).

Los HAP son compuestos producto de la combustión incompleta de la materia orgánica, como carbón, petróleo y tabaco; se caracterizan por ser hidrofóbicos por lo que son insolubles en agua, generalmente esta hidrofobicidad aumenta con el incremento en el número de anillos fusionados (Morrison y Boyd, 1998; Sims y Overcash, 1983); algunos de ellos se les ha catalogado como mutagénicos y/o cancerígenos (Xu y col., 2006) y son contaminantes tóxicos que se acumulan en el ambiente. Algunos suelos agrícolas muestran alteraciones en sus propiedades físicas, químicas y biológicas causadas por la contaminación con hidrocarburos. Tal es caso del pireno y fenantreno, mostrados en la Figura 1 (Juhasz y Naidu, 2000).



Figura 1. Estructura del pireno y fenantreno

La limpieza de un suelo contaminado con hidrocarburos es una tarea con muchas dificultades. En la actualidad se conoce un gran número de técnicas *ex situ* e *in situ* empleadas como alternativas de remediación de suelos contaminados con hidrocarburos, tales como la excavación, incineración, lavado de suelo, entre otras, costosas en la mayoría de los casos (Susarla y col., 2002). Las plantas pueden ayudar a limpiar o a estabilizar un

contaminante en el suelo si la concentración no es tóxica para la planta (Cunningham y col., 1996).

2.2 Fitorremediación

La fitorremediación es el uso de plantas para remover diferentes compuestos del ambiente que pueden provenir del petróleo, compuestos aromáticos en los suelos o compuestos volátiles en el aire. La acción de las plantas puede incluir la degradación, adsorción, acumulación y volatilización de compuestos (Newman y Reynold, 2004).

En la Tabla 1 se muestran los mecanismos principales implicados en la fitorremediación: fitoextracción, fitodegradación, fitoestabilización, fitoestimulación, rizodegradación y fitovolatilización, así como una descripción breve de los procesos involucrados para cada uno de ellos (López-Martínez y col., 2005).

Tabla 1. Descripción de los mecanismos de Fitorremediación

TIPO	PROCESO INVOLUCRADO
Fitoextracción	La planta absorbe al contaminante. El contaminante no puede degradarse totalmente, por lo tanto se acumula en la planta.
Fitodegradación	La planta (enzimas y cofactores) degradan y/o transforman al contaminante. Ejemplos de enzimas son peroxidasas, monoxigenasas, nitroreductasas, nitrilasas y fosfatasas.
Fitoestabilización	La planta reduce la movilidad o migración de los compuestos en el suelo. Modifica las condiciones del suelo (por ejemplo pH y humedad) debido a la interacción rizosfera-sustrato.
Fitoestimulación	La planta produce exudados radiculares que promueven el desarrollo de microorganismos degradadores tales como bacterias y hongos.
Rizodegradación	Los microorganismos en la rizosfera transforman y degradan a los contaminantes.
Fitovolatilización	Las plantas absorben por sus tejidos a los contaminantes y los transforman a su forma volátil. Entonces son liberados a la atmósfera mediante la transpiración.

La fitorremediación requiere primeramente de la selección de las plantas para ello es necesario que cumplan con las siguientes características: (i) capaces de absorber y degradar contaminantes orgánicos; (ii) excretar exudados para estimular la multiplicación de microorganismos degradadores y la secreción de enzimas que participen en la transformación de los contaminantes; (iii) resistencia contra los contaminantes, es decir el crecimiento y metabolismo de las plantas no puede verse afectado por la presencia de los contaminantes; (iv) un sistema de raíz fibroso; (v) aclimatación a las condiciones ambientales del sitio que se pretende limpiar (López-Martínez y col., 2005).

El éxito de la fitorremediación no sólo depende de las capacidades de las plantas sino también de las interacciones que se desarrollan y establecen con los microorganismos asociados a la rizosfera, siempre capaces de absorber, retener o degradar compuestos peligrosos (Karthikeyan y Kulakow, 2003).

Tomando en cuenta los factores anteriores se hace uso en fitorremediación de plantas de la familia de las gramíneas, que han mostrado ser una de las más importantes para la remediación de contaminantes orgánicos como los HAP e hidrocarburos del petróleo. Esta capacidad se podría atribuir a que su crecimiento es intensivo y al extender sus raíces se promueve la colonización de microorganismos en la rizosfera (Gawronski y Gawronska, 2007).

2.3 Planta fitorremediadora

Se ha demostrado que las plantas estimulan la degradación de componentes orgánicos en la región cercana a la rizosfera, debido a la liberación de exudados y enzimas provenientes de las raíces. *Festuca arundinacea* pertenece a la familia de las gramíneas (Poaceae), ver Tabla 2. Es nativa de Europa y Asia y su cultivo se ha promovido por el mundo debido a sus excelentes características agronómicas, utilizándola ampliamente como forraje (Lu y col., 2008).

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *Festuca arundinacea*

CLASIFICACION

Reino	Plantae
División	Magnoliophyta
Clase	Apogonia
Subclase	Commelinidae
Orden	Poales
Familia	Poaceae
Subfamilia	Pooideae
Género	Festuca
Especie	F. arundinacea
Nombre binomial: Festuca arundinacea	

Como se observa en la Figura 2, *F. arundinacea* es una planta perenne de 45 a 180 cm de longitud, sus hojas se extienden 1 cm de ancho, liguladas y con aurículas ciliadas. Posee inflorescencias en forma de panícula, erecta o curvada, de lanceolada a ovada, con largas ramas y espiguillas alargadas, con tres a diez flores. Crece mejor en ambientes frescos y húmedos; sin embargo, no es apta para amplios períodos de frío o calor o falta de humedad por periodos prolongados (Lu y col., 2008). En años recientes ha sido ampliamente utilizada en estudios de fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (Huang y col., 2005; Smith y col., 2005; Fan y col., 2008; Cheema y col., 2010). Reynoso-Cuevas y col. (2008) describen el efecto de una mezcla de HAP y aceite de crudo maya sobre la germinación y crecimiento de cuatro diferentes pastos donde se utilizó a *Festuca arundinacea* como control.



Figura 2. Fotografía de *Festuca arundinacea*

El éxito de la fitorremediación no sólo depende de las capacidades de las plantas sino también de las interacciones que se desarrollan y establecen con los microorganismos asociados a la rizosfera, siempre capaces de absorber, retener o degradar compuestos peligrosos (Karthikeyan y Kulakow, 2003).

2.4 Rizosfera

La rizosfera se define como aquella zona de intensa actividad microbiana alrededor de las raíces cuya influencia estimula el crecimiento y aumenta la densidad de microorganismos respecto al resto del suelo (Madigan y col., 1999). Es bien conocido que las plantas liberan diferentes materiales orgánicos e inorgánicos por las raíces hacia la rizosfera, denominados exudados, estos compuestos incluyen agua, sales y compuestos volátiles tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, nucleótidos, flavonoides, compuestos fenólicos y ciertas enzimas (López-Martínez y col., 2005); a su vez estas sustancias pueden servir como fuente de carbono y nitrógeno para el crecimiento y supervivencia de microorganismos, que sean capaces de degradar y, posiblemente, asimilar contaminantes orgánicos (Cheema y col., 2009). Así, se conoce una gran cantidad de microorganismos, tanto hongos como bacterias, capaces de oxidar HAP de bajo peso molecular como el naftaleno y el fenantreno (Juhasz y Naidu, 2000).

El desarrollo de la interacción planta-microorganismo en la rizosfera contribuye a la remoción y/o estabilización de elementos tóxicos presentes en el suelo, debido a relaciones físicas y químicas que afectan la estructura del suelo y a los organismos que viven en él (Madigan y col., 1999; Reyes, 1996).

2.5 Características fisicoquímicas del suelo

El suelo se compone de partículas minerales de diferente tamaño, que determinan la humedad, drenado, agregación, plasticidad, cohesión, retención de nutrientes y la capacidad de intercambio catiónico (CIC), entre otras

propiedades del suelo (Rubio y Recatalà, 1998). Así, la textura del suelo se relaciona con el tamaño de partículas minerales del suelo y se refiere a la distribución de arena, limo y arcilla que contiene. Esta propiedad influye en la capacidad de retención de agua, el movimiento de flujos de calor, agua y aire que acontecen tanto en el interior como en el exterior del perfil del suelo; además, ayuda a determinar la facilidad de abastecimiento de nutrientes, agua y aire (Horn y col., 1994).

La cantidad de materia orgánica (MO) que contiene el suelo, está ligada a la cantidad, tipo y actividad microbiana; engloba a todos los residuos animales y vegetales en distintos estadios de descomposición y constituye el medio de cultivo para los microorganismos del suelo ya que proporciona una importante fuente de nutrientes. El contenido en materia orgánica del suelo decrece con la profundidad, a excepción de las turberas en que permanece prácticamente constante o en los Podsoles, en los que tiene lugar un segundo horizonte de acumulación húmica a cierta profundidad (Reyes, 1996; Rubio y Recatalà, 1998).

A la mayoría de las especies cultivadas les favorece el pH entre valores de 5.5 a 7.5, pero cada especie y variedad tiene un rango específico donde se desarrolla mejor. La influencia del pH sobre la disponibilidad de los nutrientes para las plantas se ejerce a través de su influencia sobre su solubilidad. La mayoría de los nutrientes son más solubles (y por lo tanto más asimilables) cuanto más ácido es el pH. Sin embargo, si éste es demasiado ácido, además de la toxicidad, las pérdidas de nutrientes por lavado pueden aumentar (Rubio y Recatalà, 1998).

Otras características importantes, y con clara relación con los procesos de degradación, son la profundidad efectiva del suelo (influye en las reservas hídricas, en la tolerancia a la erosión, infiltración), el contenido en carbonatos (influye en la reacción del suelo, estructura y disponibilidad de nutrientes) y la cohesión (muy ligada a los niveles de humedad). También se pueden señalar la permeabilidad, la plasticidad, el drenado interno y la presencia de pedregosidad y afloramientos rocosos (Horn y col., 1994; Rubio y Recatalà, 1998).

El estudio y conocimiento de la conductividad hidráulica, capacidad de retención de agua y drenado, es muy importante debido a la aplicación en el campo de la planificación agrícola, y de la gestión y conservación de suelos (Reyes, 1996).

3. JUSTIFICACIÓN

Los hidrocarburos alifáticos y aromáticos policíclicos se encuentran muy difundidos en la naturaleza y han ocasionado el deterioro del ambiente debido a la acumulación directa o indirecta en suelo, agua y aire; además tienen un impacto importante en la salud humana, por los efectos carcinógenos y/o mutagénicos de los HAP. Como consecuencia, surgen técnicas biológicas de remediación de suelos contaminados, una técnica efectiva y de bajo costo es la fitorremediación que tiene como objetivo degradar compuestos orgánicos por medio de la acción combinada de plantas y microorganismos asociados a su rizosfera (López-Martínez y col., 2005). Las plantas de la familia de las gramíneas han demostrado tolerar la presencia de hidrocarburos tanto en cultivos *in vitro* (Reynoso y col., 2008) como en cultivos en suelo (Smith y col., 2005). *Festuca arundinacea* ha sido ampliamente utilizada en estudios de fitorremediación de suelos contaminados con HAP (Huang y col., 2005; Smith y col., 2005; Fan y col., 2008; Cheema y col., 2010). En este trabajo se evaluó la capacidad de *F. arundinacea* para fitorremediar suelos contaminados artificialmente con una mezcla conocida de hidrocarburos.

4. HIPÓTESIS

Festuca arundinacea en asociación con los microorganismos del suelo mejora su capacidad para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad de *Festuca arundinacea* en asociación con los microorganismos del suelo para fitorremediar suelos artificialmente contaminados con una mezcla de hidrocarburos.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar las características fisicoquímicas y microbiológicas del suelo seleccionado.
- Evaluar diferentes técnicas de germinación de semillas de *Festuca arundinacea*.
- Determinar el efecto de los hidrocarburos en el crecimiento de las plantas.
- Cuantificar las poblaciones microbianas debido a la presencia de *Festuca arundinacea* en suelo contaminado y sin contaminar.
- Cuantificar la concentración residual de hexadecano, fenantreno y pireno en suelo con planta y sin planta.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En la Figura 3 se muestra el desarrollo general de la estrategia experimental de este trabajo. Se colectó suelo de una zona en el Estado de México donde *F. arundinacea* crece de manera natural, se secó y tamizó. Se determinaron las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo y una parte de suelo se contaminó con una mezcla de hexadecano, fenantreno y pireno en concentraciones conocidas. Al mismo tiempo se realizó la selección, desinfestación y germinación de semillas de *F. arundinacea*. Al término de 17 semanas de almacenamiento del suelo con los contaminantes (intemperismo) se transplantaron 5 plántulas (con 30 días de germinación en medio Murashige y Skoog) en 500 g de suelo (contaminado y sin contaminar), por unidad

experimental. Pasados 65 días de cultivo se cosecharon las plantas, se separaron los tallos de las raíces y finalmente, se evaluaron las variables respuesta, como se indica en la Figura 3.

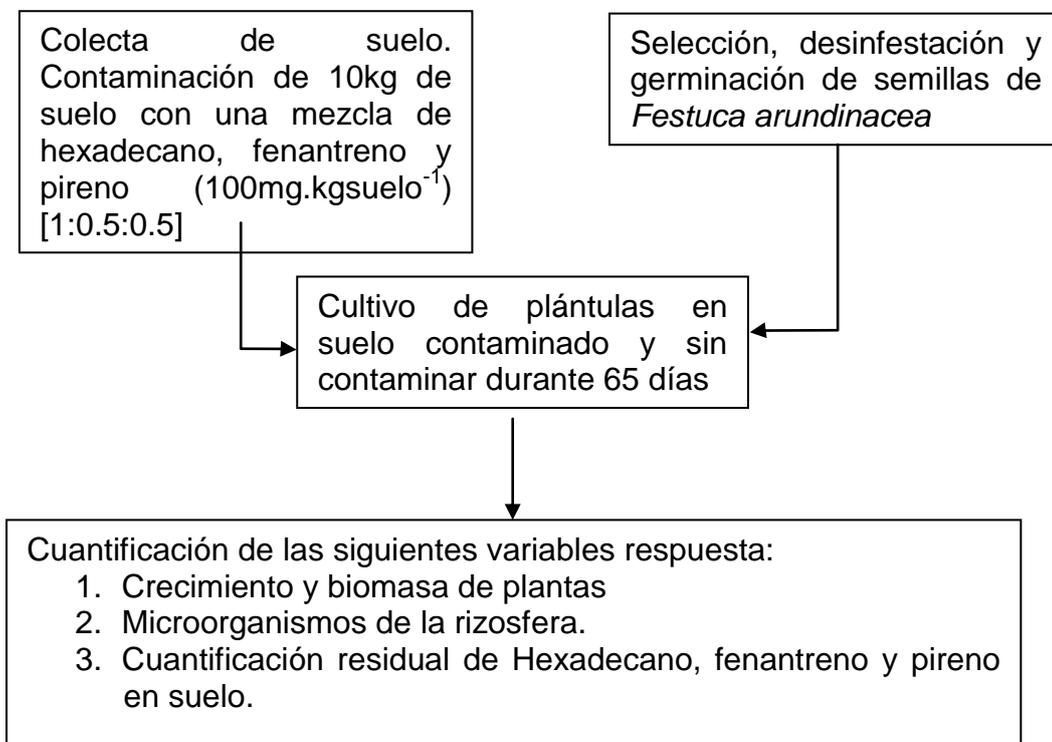


Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Hidrocarburos

Los hidrocarburos en estudio fueron: Hexadecano (HXD), fenantreno (PHE) con una pureza mayor al 96% y pireno (PYR) con una pureza mayor al 98%, fueron adquiridos en la compañía Química Aldrich. Las sustancias se disolvieron en acetona (Mallinckrodt Chemical) antes de incorporarlas al suelo, en una concentración 100 mg de la mezcla de hidrocarburos. kgsuelo^{-1} en una proporción [1:0.5:0.5], respectivamente.

7.2 Suelo

7.2.1 Obtención del suelo

Se colectó suelo de un campo fértil libre de contaminantes ubicado en una zona del municipio de Hueyapoxtla, Estado de México. Se tomó la ubicación geográfica con ayuda del GPS (Global position system) con la respuesta de al menos diez satélites, las coordenadas fueron: 19° 54' 10.6" norte y 99° 05' 16.0" oeste.

Las muestras se colectaron de alrededor de 15 cm de profundidad con ayuda de una pala, posteriormente se transportaron al Laboratorio de Residuos Sólidos del Departamento de Biotecnología en la UAM-I a temperatura ambiente en recipientes de plástico cerrados. El suelo se secó y pasó por un tamiz de 2mm de diámetro para eliminar rocas, ramas y otros materiales de mayor tamaño.

7.2.2 Características fisicoquímicas del suelo

La caracterización del suelo permite conocer la clase textural del suelo, que es una propiedad física importante que se emplea en la clasificación y el uso del suelo. A continuación se describen los métodos para la caracterización del suelo.

Preparación de la muestra: las muestras de suelo fueron extendidas sobre charolas donde se secaron en el invernadero con una temperatura máxima y mínima de 46.6 y 37.9°C respectivamente. Se realizó la homogenización de las partículas del suelo con un tamiz de 2mm de diámetro.

Color del suelo: El color del suelo se determinó por comparación de una muestra de suelo seco y suelo húmedo con las tablas de color de Munsell (Munsell, 1990).

Contenido de humedad: se pesó aproximadamente 3 g de la muestra tamizada y se deshidrató en una termobalanza (MB45, Ohaus) hasta peso constante.

Capacidad de campo (CC): Se pesó una muestra de aproximadamente 60 g en un recipiente con pequeñas perforaciones en la base, se agregó agua destilada hasta obtener la completa saturación del suelo. Después se drenó el exceso de agua por 48 h y se pesó 1 g del suelo húmedo en un crisol previamente tarado y a peso constante. La muestra se colocó en una estufa por 48 h y a 105°C, pasado este tiempo se colocó en un desecador y se volvió a pesar. Se realizó el cálculo de la siguiente manera (Reyes, 1996):

$$HCC\% = \frac{Pesohúmedo - Pesoseco}{Pesoseco} \times 100$$

Capacidad de intercambio catiónico (CIC): La CIC y bases intercambiables (Ca, Mg, Na y K) de un suelo, se determinaron con el uso de una solución de cloruro de calcio (1N, a pH 7.0) con una solución saturante. El método consiste en la saturación de la superficie de intercambio con un catión; el exceso de saturante se lava con alcohol etílico; el extracto obtenido se trata con una solución de cloruro de sodio (1N, pH 7.0). Este parámetro se determinó con base en el método propuesto por Reyes (1996):

$$CIC (meq / 100 g) = \frac{mldeEDTA \times NdeEDTA}{gdesuelo} \times 100$$

Densidad aparente (ρ_A): Se determinó con el método de la probeta: en una balanza analítica (Ohaus) se pesó una probeta de 10 ml, posteriormente se agregó el suelo hasta la marca de 10 ml. Se dejó caer la probeta suavemente sobre una superficie plana, se volvió a adicionar suelo hasta la marca de 10 ml y se pesó. La densidad aparente por este método se calculó con la siguiente expresión:

$$\rho_A = \frac{Probetaconmuestra - Probetavacia}{10ml}$$

Densidad real (ρ_R): Se determinó mediante el método del picnómetro: se pesó un picnómetro con tapón, se introdujeron 5g de suelo y se pesó nuevamente. Se llenó con agua destilada hasta aproximadamente un tercio del volumen del picnómetro. Con movimientos suaves se desalojó el aire contenido en la

muestra y se dejó reposar por 5 minutos sobre la mesa de trabajo, posteriormente se llenó el picnómetro con agua y se pesó.

Espacio poroso (EP): Es la relación entre la densidad aparente (DA) y la densidad real (DR) de un suelo, y se determinó utilizando la siguiente relación (Reyes, 1996):

$$EP(\%) = (1 - \frac{DA}{DR}) \times 100$$

Materia Orgánica (MO): El método para determinar la materia orgánica consistió en la combustión húmeda de la materia orgánica con una mezcla de dicromato y ácido sulfúrico. Después de la reacción se midió colorimétricamente el cromato reducido. Se realizó de acuerdo al método de Walkey-Black (Reyes, 1996).

$$\%MO = \%CO \times 2$$

$$\%CO = \frac{N(B-S)}{gsuelo} \times 0.39$$

pH. Se determinó el pH del suelo mezclando suelo y agua destilada (relación 1:2.5) durante 10 minutos. Pasado el tiempo de agitación se midió el pH de la muestra introduciendo el electrodo del potenciómetro en la solución decantada.

Textura: Este método se basó en cuatro principios: (i) oxidación de la materia orgánica, (ii) dispersión, (iii) agitación y (iv) sedimentación. Se determinó por el método del hidrómetro de Bouyoucus.

7.3 Contaminación del suelo

Al suelo se incorporaron 100 mg/kg de una mezcla de hexadecano, fenantreno y pireno en una proporción (1:0.5:0.5) disueltos en acetona; una vez evaporado el solvente, se mezcló con el suelo no contaminado, posteriormente se tamizó a través de una malla de 2mm para homogeneizarlo. El suelo se colocó en un recipiente de plástico en un cuarto a temperatura ambiente por 17 semanas para asegurar una distribución homogénea de los contaminantes a través de

los poros del suelo en estudio. El suelo control fue tratado de la misma manera pero sin hexadecano, fenantreno y pireno (Cheema y col., 2008).

7.4 Semillas de *Festuca arundinacea*

Las semillas de *F. arundinacea* se adquirieron en la Central de Abastos de la Ciudad de México. Las semillas fueron separadas y conservadas en un cuarto a temperatura ambiente.

Previo a la germinación, las semillas que se encontraban dañadas se removieron a mano. Se realizó una prueba de viabilidad con 1000 semillas, para ello se sumergieron en una solución con Tween-20 a una concentración de 0.4 mg/200 ml de agua destilada, por 20 minutos. Al término se observaron semillas flotando y semillas depositadas en el fondo del vaso, estas últimas corresponden a las semillas viables, por cada 1000 semillas sólo 278 fueron viables. Una vez seleccionadas las semillas, se procedió a retirar la cascarilla que envuelve a la semilla de forma manual, para facilitar su germinación.

7.4.1 Desinfestación de las semillas

Las semillas sin cascarilla fueron introducidas en un sobre de papel filtro, se sumergieron en una solución con detergente de la marca comercial Roma a una concentración de 0.02 g/ml, por 20 minutos con agitación constante, y se lavaron con abundante agua de la llave. Bajo una campana de flujo laminar el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 30 segundos, seguido por una solución de hipoclorito de sodio 10 % (v/v) adicionando con 0.1 ml de Tween-20 por 25 minutos con agitación constante y nuevamente el sobre con las semillas se sumergió en etanol 70% (v/v) durante 1 minuto. El sobre se lavó con 150 ml de agua esterilizada desionizada. El sobre se abrió bajo condiciones estériles y se almacenó en cajas de Petri estériles para su uso posterior.

7.5 Técnicas de germinación de semillas de *Festuca arundinacea*

Para inducir la germinación de semillas de *F. arundinacea* se evaluaron cuatro técnicas de germinación: en agrolita no estéril, agrolita estéril, papel filtro y medio Murashige and Skoog (MS). Cada método fue realizado por triplicado.

7.5.1 Agrolita no estéril

Las semillas viables sin desinfectar se colocaron en tubos de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 15 cm de longitud con 5 g de agrolita no estéril, con un tamaño de partícula mayor a 2.0 y menor a 4.8 mm de diámetro, con un 80% humedad.

7.5.2 Agrolita estéril

Las semillas desinfectadas se colocaron en tubos de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 15 cm de longitud con 5 g de agrolita estéril (15 min, 120°C), con un tamaño de partícula mayor a 2.0 y menor a 4.8 mm de diámetro y 80% humedad.

7.5.3 Papel filtro

Una semilla viable sin desinfectar se colocó en un tubo de vidrio de 2.5 cm de diámetro y 15 cm de longitud con un disco de 2.0 cm de diámetro de papel filtro Whatman No. 3 en el fondo del tubo. Se adicionaron 200µL de agua destilada, para mantener la humedad en el tubo, se colocó la tapa del tubo y se selló con parafilm, se readicionó el mismo volumen de agua a los siete días.

7.5.4 Medio Murashige y Skoog (MS)

Se utilizó el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962), modificado. Se adicionaron 10 g.L⁻¹ de sacarosa, el pH se ajustó con KOH 0.1 N a 5.8 y se agregó 2 g.L⁻¹ de fitagel. Se adicionaron 10 ml de medio MS a cada tubo de cultivo (diámetro 2.5 cm, longitud 15 cm), cerrados y esterilizados (15 min a 120°C). Se colocó una semilla desinfectada por cada tubo.

Las plántulas de cada tratamiento se mantuvieron en una cámara de crecimiento con un fotoperiodo artificial de 16 h a 25°C durante 14 días. La germinación de las semillas se evaluó a los siete días de germinación y el crecimiento de las plántulas a 14 días, utilizando como parámetro la longitud de brote de cada plántula.

7.6 Cultivo

Después de 30 días de la germinación y crecimiento de las plántulas en el medio M-S en condiciones controladas, se trasplantaron a suelo. Se colocaron cinco plántulas por unidad experimental con 500 g de suelo. El suelo contaminado tenía una concentración inicial de 100 mg.kg suelo⁻¹ de una mezcla de hidrocarburos. Se realizaron tres réplicas y se utilizó como control suelo sin contaminantes.

Durante el cultivo, 65 días, se determinó el crecimiento de las plantas, observando siempre su salud. Las plantas fueron regadas de acuerdo a las necesidades de cada una y fertilizadas con una solución de Long Ashton cada dos semanas. Después de 65 días de crecimiento, las plantas fueron cosechadas. Los suelos con planta y sin planta se colectaron por separado, homogenizados y divididos en dos conjuntos de muestras, uno para el análisis químico y otro para el análisis biológico. Las muestras de suelo se guardaron a 4°C antes de su análisis (Cheema y col., 2008).

7.7 Métodos analíticos

7.7.1 Biomasa de la planta

Después de 65 días de crecimiento las plantas fueron cosechadas y separadas en raíces y brotes (Cheema y col., 2009). Estas fueron lavadas por separado y colocadas en papel filtro en una estufa (WTB Binder) a 60°C durante 7 días; pasado este tiempo se determinó el peso seco de cada muestra.

7.7.2 Cuenta Microbiana

Al término de 65 días de cultivo se determinaron las concentraciones de microorganismos en cada tratamiento (Suelo+MHC, Suelo-MHC) con planta y sin planta, se tomaron tres muestras de cada unidad experimental. Se cuantificó por el método de unidades formadoras de colonias, para ello, se utilizó agar soya tripticaseína (AST) para bacterias y agar papa dextrosa (PDA) para hongos. Con 1 g de suelo se obtuvo un extracto acuoso que fue diluido en solución salina al 0.9%, se colocó 0.1 ml de la muestra y se extendió suavemente utilizando un asa de vidrio sobre la superficie del agar contenido en una caja Petri. Las cajas fueron incubadas durante 3 días a 30 °C y la medición fue realizada a 24, 48 y 72 horas.

7.7.3 Extracción de hidrocarburos del suelo

Para extraer los hidrocarburos residuales en el suelo (PHE, PYR y HXD) se colocaron 5g de suelo seco en un tubo con 30 ml de una solución de acetona-diclorometano (1:1, v/v); los tubos fueron cerrados y colocados en el carrusel del horno de microondas (MARS, CEM Xpress) durante 30 minutos a 100°C, con una potencia de 400W. Se realizaron dos lavados de cada muestra con 30 ml de la solución acetona-diclorometano. Las eficiencias de extracción que se obtuvieron para hexadecano, fenantreno y pireno fueron: 104.71 % ± 7.4, 97.56 % ± 0.7 y 98.62 % ± 0.6, respectivamente.

7.7.4 Análisis de HAP

Una vez a temperatura ambiente, el líquido sobrenadante de los tubos del horno de microondas se decantó a un matraz de bola de 100 ml y se evaporó la mezcla acetona: diclorometano en un rotavapor a vacío (Buchi); las muestras a sequedad se aforaron a un volumen final de 10 ml con diclorometano, se filtró y se llevó a un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de flama (Varian) y a una columna Altech de 15 m x 0.25 mm de diámetro, se utilizó helio como gas acarreador con un flujo de 28 ml. min⁻¹. Las condiciones

de operación fueron: temperatura del inyector y columna de 300°C y la del detector de 250°C.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta sección se exponen los resultados relacionados con las propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo, la selección de la mejor técnica de germinación, el efecto de los hidrocarburos en el crecimiento de las plantas, en la biomasa, en las poblaciones microbianas y, finalmente, la remoción de hidrocarburos del suelo.

8.1 Propiedades fisicoquímicas y microbiológicas del suelo

El conocimiento de las características físicas, químicas y biológicas de los suelos, es uno de los aspectos fundamentales que permite determinar la capacidad de uso y el manejo que debe darse al suelo, estos aspectos son importantes porque el conocimiento de la humedad, drenado, agregación, plasticidad, cohesión, retención del agua y nutrimentos del suelo favorecerán el éxito de la fitorremediación.

Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas del suelo

Propiedades fisicoquímicas del suelo			
Arcilla (%)	24.6	Capacidad campo (%)	15.06
Arena (%)	54.8	Espacio poroso (%)	53.74
Limo (%)	25.2	Materia orgánica (%)	4.26
pH	7.53	Carbono orgánico (%)	2.13
Densidad real (g/cm ³)	2.44	Ca ⁺⁺ (meq/100g)	37.1
Densidad relativa (g/cm ³)	1.14	Mg ⁺⁺ (meq/100g)	6.37
Humedad (%)	5.03	Cap. de intercambio catiónico	27.335
Color del suelo	2.5Y 2.5/1	Conductividad (μS/cm)	236
Suelo franco arcillo arenoso			

Los valores obtenidos en la caracterización del suelo, mostrados en la Tabla 3, indican que se trabajó con un suelo franco arcillo arenoso, ligeramente alcalino, rico en materia orgánica (4.26%) que se corrobora con el color negro obtenido en comparación con las tablas de Munsell en condiciones húmedas por medio de su acumulación y formación de humus (Reyes, 1996).

Las características microbiológicas del suelo utilizado se determinaron al inicio del experimento y se obtuvo una concentración de bacterias y hongos de $4.2 \pm 0.5 \times 10^7$ y $4 \pm 0.9 \times 10^5$ UFC/g suelo seco, respectivamente. Estos valores coinciden con los reportados por Cheema y colaboradores en 2009 en donde reportan concentraciones de bacterias y hongos de $3.64 \pm 0.8 \times 10^7$ y $5.74 \pm 0.84 \times 10^4$ UFC/g suelo seco, respectivamente en un suelo franco arenoso, utilizado en el crecimiento de *F. arundinacea*.

8.2 Técnicas de germinación de semillas

Con el objeto de mejorar y estandarizar la germinación de semillas de *F. arundinacea* se evaluaron cuatro diferentes técnicas: agrolita no estéril, agrolita estéril, papel filtro y medio MS. Algunos autores recomiendan el uso de métodos estériles: papel filtro (Lu y col., 2008) y medio MS (Reynoso y col., 2008) que aseguren la germinación de las semillas y eviten una posible contaminación microbiana; mientras que otros autores coinciden en métodos no estériles: agrolita húmeda (Cheema y col., 2010) y papel filtro en caja Petri (Cerabolini y col., 2004) todas las referencias revisadas coinciden en un adecuado manejo de las semillas para obtener una mayor eficiencia en la germinación.

Como se puede observar en la Figura 4, a siete días de germinación en cada una de las técnicas realizadas, la longitud del brote es mayor que la longitud de la raíz lo que indica que la germinación fue exitosa en todas las técnicas ensayadas. Algunos autores coinciden en que la germinación es eficiente cuando el soporte está bien hidratado y una temperatura adecuada para los distintos procesos metabólicos que suceden durante la germinación (Lu y col., 2008; Nonogaki y col., 2010).

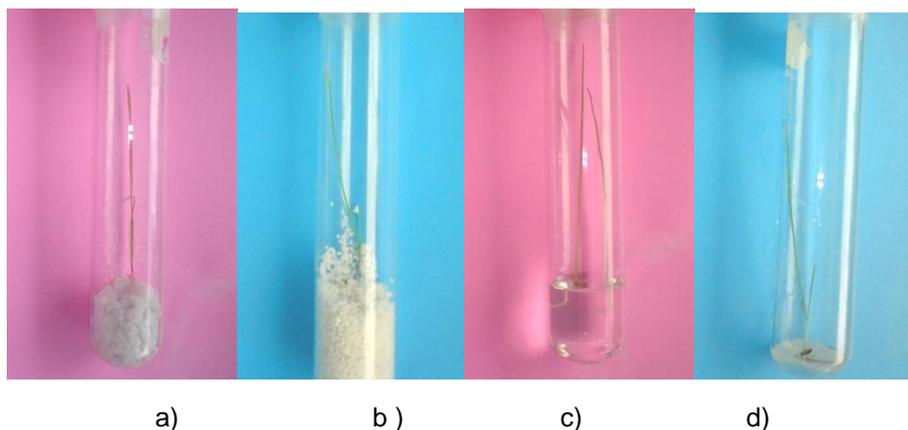


Figura 4. Semillas de *Festuca arundinacea* a 7 días de germinación.

a) agrolita no estéril, b) agrolita estéril, c) Medio MS, d) papel filtro.

Con el objeto de evaluar la mejor técnica de germinación se planteó la matriz de decisión que se detalla en la Tabla 4; se muestran los cuatro métodos de germinación (agrolita estéril, agrolita no estéril, papel filtro y medio MS) y cada método se evalúa con cinco variables (germinación, longitud de los brotes, facilidad para la recuperación de la planta, costo del método por unidad experimental y tiempo de preparación del método). A cada técnica se le asignó una ponderación de acuerdo a su importancia en la recuperación de plántulas, la escala de evaluación es de 0-100, donde cero es el valor mínimo otorgado; como se observa, tanto la germinación como la longitud de brote son las variables más importantes, desde nuestro punto de vista. Las cifras totales son resultado de multiplicar la calificación otorgada a cada variable por la ponderación asignada.

Tabla 4. Criterios y ponderación para elegir el mejor método de germinación.

MATRIZ DE DECISIÓN (Método de germinación)									
Métodos		Agrolita no estéril		Agrolita estéril		Papel filtro		Medio M-S	
Variables	Ponderación	Cal.	Total	Cal.	Total	Cal.	Total	Cal.	Total
Longitud de brotes	35	7	240	8	290	6	195	10	350
Recuperación de la planta	25	7	167	7	167	3	83	10	250
Tiempo preparación	20	10	200	5	100	10	200	5	100
Costo/unidad	20	10	200	10	200	10	200	5	100
Total	100		807		756		678		800

A partir de los resultados mostrados en la Tabla 4, se determinó que el empleo de la agrolita no estéril como método de germinación mejora la germinación, su tiempo de preparación es excelente así como su costo por unidad; sin embargo, pierde puntos frente al medio MS por la longitud de brote y la recuperación de la planta. En el caso del método de agrolita estéril se observa un puntaje similar al método de agrolita no estéril, sólo se ve afectada su calificación por aumentar en los tiempos de preparación. A pesar de que el método de papel filtro es una técnica sencilla, barata y de fácil preparación; la recuperación de la planta disminuye su calificación debido a que la raíz atraviesa el papel filtro impidiendo su recuperación en un cultivo posterior. Según los datos evaluados en cada tratamiento, el mejor método de germinación es el medio MS que aunque es más costoso y utiliza un mayor tiempo de preparación, es el que aporta plántulas más grandes y con una fácil y mejor recuperación de la misma.

8.3 Efecto de los hidrocarburos sobre el crecimiento de la planta

Durante el cultivo de las plantas en suelo contaminado y sin contaminar se observó la salud de las plantas a lo largo de 65 días de cultivo. Para evaluar la salud de las plantas, se determinaron las longitudes del tallo de cada una de las plantas a 30, 40, 50 y 65 días de cultivo, los resultados se muestran en la Figura 5.

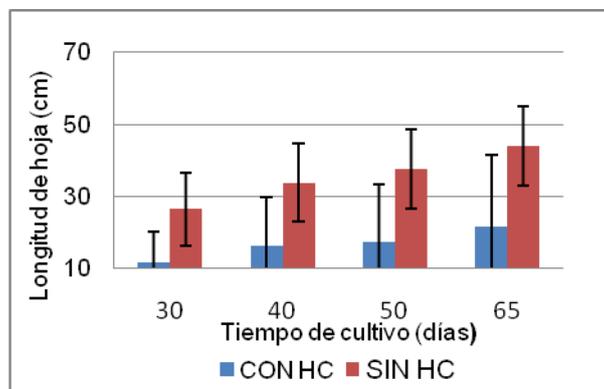


Figura 5. Crecimiento de *F. arundinacea* a 65 días de cultivo en suelo con y sin mezcla de hidrocarburos (MHC)

Los resultados muestran que conforme transcurre el tiempo de cultivo el crecimiento de la longitud del tallo no aumenta (las barras de error no muestran diferencias significativas en la evaluación de esta variable), aunque la presencia de la MHC en el suelo posiblemente influyó de manera negativa en el crecimiento de las plantas. La longitud promedio de las plantas que fueron cultivadas en suelo contaminado y sin contaminar resultó de 22 y 44 cm respectivamente. Reynoso y col. (2008) reportan el crecimiento promedio de 14 cm para *Festuca arundinacea* en condiciones *in vitro* después de 40 días de cultivo, esta diferencia en la longitud de tallo en condiciones *in vitro* y en nuestras unidades experimentales probablemente se deba a los nutrientes y características fisicoquímicas del suelo en cuestión que favorecen la adaptación y el desarrollo de plantas en el suelo (Gan y col., 2009).

8.4 Efecto de los hidrocarburos sobre la biomasa en la parte aérea y la raíz

En la Figura 6 se presentan los resultados correspondientes a la biomasa acumulada en la parte aérea (Fig. 6a) y en las raíces (Fig. 6b). En la Figura 6a se observa una disminución del 68% en la biomasa de la parte aérea de las plantas con suelo contaminado con respecto a las plantas crecidas en el suelo control sin hidrocarburos. En el caso de la raíz, Figura 6b, se observa una disminución en la biomasa de raíz del 69%; este fenómeno puede ser debido a que la presencia de los hidrocarburos disminuye la capacidad del suelo de abastecer de agua y nutrientes a la planta disminuyendo así la biomasa (Cheema y col., 2010).

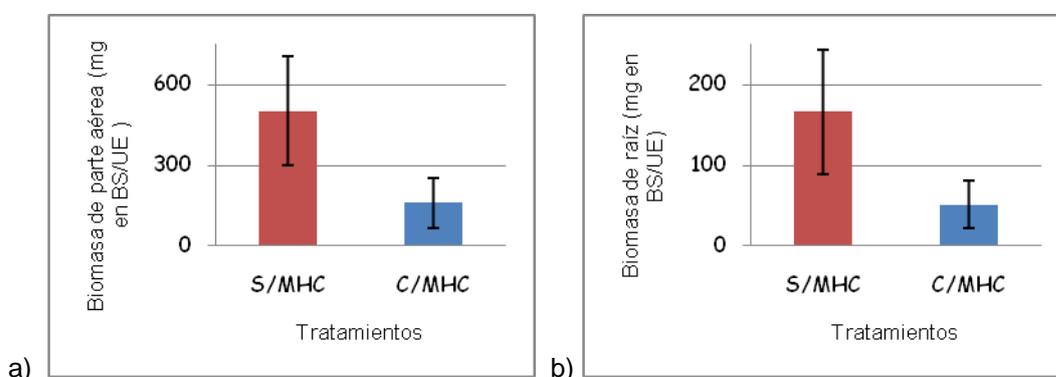


Figura 6. Efecto de los hidrocarburos sobre a) la biomasa en la parte aérea, b) la biomasa de la raíz, después de 65 días de cultivo.

8.5 Cuantificación de microorganismos en el suelo

Al inicio del experimento la concentración de bacterias y hongos fue de $4.2 \pm 0.5 \times 10^7$ y $4 \pm 0.9 \times 10^5$ UFC/g suelo seco, respectivamente. Los resultados en los suelos contaminados y sin contaminar al término del cultivo se muestran en la, Tabla 5. Se observa un aumento en la concentración de microorganismos, con respecto a la concentración encontrada en el suelo inicial, tanto de bacterias como de hongos; esto puede deberse a que las comunidades microbianas son más grandes y más activas en suelos plantados que en suelos no plantados (Mueller y Shann, 2006); además, la raíz de la planta secreta compuestos orgánicos como aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares o enzimas que pueden proveer de fuente de carbono a los microorganismos del suelo, promoviendo así, la colonización de los mismos (Karen y col., 2009).

Tabla 5. Concentración de bacterias y hongos al término de 65 días de cultivo.

	Tratamientos con planta		Tratamientos sin planta	
	C/MHC	S/MHC	C/MHC	S/MHC
HONGOS (1×10^5 UFC/g suelo seco)	1.9 ± 0.93	1.4 ± 0.72	1.8 ± 0.27	1.0 ± 0.31
BACTERIAS (1×10^9 UFC/g suelo seco)	6.6 ± 0.71	7.7 ± 1.8	5.8 ± 2.6	5.1 ± 1.7

Los resultados revelan que no existe diferencia significativa en la presencia de los microorganismos cultivables evaluados en los diferentes tratamientos ensayados. Estos resultados son diferentes a los reportados por Cheema y col. (2009) en donde a una concentración de 200.0 mg de fenantreno. kg suelo^{-1} y 199.3 mg de pireno. kg suelo^{-1} obtienen una concentración de bacterias de 9.89 ± 0.87 y $5.29 \pm 0.17 \times 10^7$ UFC. g suelo seco^{-1} en suelo con planta y sin planta, respectivamente; estas diferencias probablemente sean debidas a las características fisicoquímicas del suelo, mismas que facilitan el abastecimiento de nutrientes a los microorganismos, promoviendo la colonización (Horn y col., 1994).

8.6 Remoción de hidrocarburos residuales en el suelo

Para determinar la remoción de los hidrocarburos en cada unidad experimental a 65 días de cultivo, se realizó la cuantificación residual de los hidrocarburos en el suelo con planta y sin planta. Como se observa en la Figura 7 no existe diferencia significativa en la remoción de hidrocarburos en el suelo con planta y sin planta; esto probablemente sea debido a: i) la concentración inicial de hidrocarburos fue muy baja, por lo que las plantas no fueron capaces de removerlos, ii) el movimiento y la distribución de los hidrocarburos en el suelo afecta la disponibilidad de los mismos y iii) la cantidad de ácidos húmicos del suelo, porque la materia orgánica contenida en el suelo puede reducir la biodisponibilidad de los hidrocarburos debido a los fenómenos de sorción, absorción y adsorción, que propician la formación de residuos persistentes que pueden llegar a ser menos disponibles con el tiempo (Kamath et al, 2004; Leahy y Colwell, 1990; Horn y col., 1994).

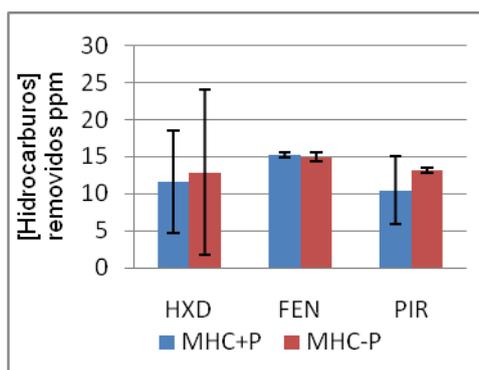


Figura 7. Remoción de hidrocarburos en suelo plantado con *F. arundinacea* a 65 días de cultivo.

9. CONCLUSIONES

El mejor método de germinación de semillas de *F. arundinacea* es el que utiliza medio MS que, aunque es más costoso y utiliza un mayor tiempo de preparación, es el que aporta plántulas más grandes y con mejor recuperación de la misma.

La presencia de los hidrocarburos en el suelo de cultivo disminuye la biomasa de la parte aérea y de la raíz en 68 y 69%, respectivamente con respecto a los controles sin hidrocarburos.

No se observan diferencias significativas en el crecimiento de las plantas. La longitud promedio obtenida en suelo contaminado y sin contaminar es 22 y 44 cm respectivamente.

A una concentración de 100 mg MHC/ kg suelo (100ppm) no se observó una diferencia significativa en el crecimiento de los microorganismos de la zona periférica a la rizosfera de las plantas.

En suelos contaminados con 100 mg MHC/ kg suelo se observó una remoción de hidrocarburos de 24, 60 y 40 % de hexadecano fenantreno y pireno, respectivamente, en suelos plantados mientras que para los suelos sin planta se encontró una remoción de hidrocarburos de 26, 60 y 52 % de hexadecano fenantreno y pireno, respectivamente; sin embargo no se observó una diferencia significativa en la remoción de hidrocarburos en el suelo con planta y sin planta.

9. REFERENCIAS

Atlas, R. M. y Bartha R. (2002). Ecología microbiana y microbiología ambiental., 4ª Addison Presley. 677.

Cerabolini, B., Andreis, R., Ceriani, R. M., Pierce, S. y Raimondi, B. (2004) Seed germination and conservation of endangered species from the Italian Alps: *Physoplexis comosa* and *Primula glaucescens*. *Biological Conservation*. **117**: 351–356.

Cheema, S. A., Khan, M. I., Shen, Ch., Tang, X., Farooq, M., Chen, L., Zhang, Ch y Chen, Y., (2010). Degradation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by single and combined plants cultivation. *Journal of Hazardous Materials*. **177**: 384-389.

Cheema, S. A., Khan, M. I., Tang, X., Zhan, C., Shen, Ch., Malik, Z., Ali, S., Yang, J., Shen, K., Chen, X., y Chen, Y., (2009). Enhancement of

phenanthrene and pyrene degradation in rhizosphere of tall fescue (*Festuca arundinacea*). *Journal of Hazardous Materials*. **166**: 1226-1231.

Escalante-Espinoza, E., Gallegos-Martínez, M.E., Favela-Torres, E. y Gutierrez-Rojas, M. (2005) Improvement of the hydrocarbon phytoremediation rate by *Cyperus laxus* Lam. Inoculated with a microbial consortium in a model system. *Chemosphere*. **59**: 405-413.

Gan, S., Lau, E.V. y H.K. Ng, H.K. (2009). Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. **172**: 532–549.

Gawronski, S. W., y Gawronska, H. (2007). Plant taxonomy for phytoremediation. In: Advanced science and technology for biological decontamination of sites affected by chemical and radiological nuclear agents (Marmioli, N., Samotokin, B., and Marmioli, M. Eds.). *Springer Netherlands*. **75**: 79-88.

Horn, R., Taubner, H., Wuttke, M. y Baumgartl, T. (1994). Soil physical properties related to soil structure. *Soil & Tillage Research*. **30**:187-216.

Karen, E. G., Xiao-Dong, H., Glick, B. R. y Greenberg, B. M. (2009). Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. **176**: 20–30.

Kamath, R., Rentz, J. A., Schnoor, J. L. y Alvarez, P.J.J. (2004). Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils: principles and applications. *Studies in surface Science and catalysis*, 151. Capítulo 16. Pp447-478.

Karthikeyan, R. y Kulakow, P. A. (2003). Soil plant microbe interactions in Phytoremediation. In: *Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology* (Scheper, T. Ed.). *Springer-Verlag Berlin Heidelberg*. **78**: 52-74.

Leahy, J. G. y Colwell, R. R. (1990). Microbial Degradation of Hydrocarbons in the Environment. *Microbiological reviews*. **54**: 305-315.

López-Martínez, S., Gallegos, M. E., Pérez, L. J. Y Gutiérrez-Rojas, M., (2005). Mecanismos de Fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Rev. Int. Contam. Ambient.* **21**: 91-100.

Mueller, K. E. y Shann, J. R. (2006). PAH dissipation in spiked soil: Impacts of bioavailability, microbial activity, and trees. *Chemosphere*. **64**: 1006–1014.

Munsell soil color charts (1990). *Munsell Color Macbeth Division of Kollmorgen Instruments Corporation*. Baltimore, Maryland.

Murashige, T. y Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Lu, H., Shen, J., Jin, X., Hannaway, D.B., Daly, C. y Halbleib, M. D.(2008). Determinating optimal seeding times for tall fescue using germination studies and spatial climate analysis. *Agricultural and forest ,meteorology*. **148**: 931-941

Murashige, T. y Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* **15**: 473-497.

Newman, L.A. y Reynolds, Ch. (2004). Phytodegradation of organic compounds Current Opinion in Biotechnology, **15**: 225–230.

Reyes, Irma. 1996. Fundamentos teórico-prácticos de temas selectos de la ciencia del suelo. Parte I. Editorial Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

Reynoso-Cuevas, L., Gallegos-Martínez, M. E., Cruz-Sosa, F. y Gutiérrez-Rojas, M. (2008). *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant

species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. *Bioresource Technology*. **99**: 6379–6385.

Rubio, J. L., Recatalá, L. (1998) El suelo: un recurso natural amenazado. *Revista Valenciana D' Estudis Autònòmics*. **23**: 329.

Sims, R.C. y Overcash, M.R. (1983). Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems. *Residue Reviews*. **88**: 1-68.

Susarla, S., Medina, V. F., McCutcheon, S. C. (2002) Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination. *Ecological Engineering* **18**: 647–658.

Xu, S.Y., Chen, Y.X., Wu, W.X., Wang, K.X., Lin, Q., Liang, X. Q. (2006) Enhanced dissipation of phenanthrene and pyrene in spiked soils by combined plants cultivation. *Science of the Total Environment*. **363**: 206– 215.