

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA
DOCTORADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



**TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE
Doctora en Ciencias Ambientales**

**“PROPUESTA DE UN MODELO BIOLÓGICO
DE REMEDIACIÓN EN SUELOS AGRÍCOLAS
CONTAMINADOS POR ATRAZINA”**

Presenta: Margarita Islas Pelcastre

Director de Tesis: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra

Mineral de la Reforma, Hidalgo, Junio 2013



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA
DIRECCIÓN

M. en A. Julio César Leines Medécigo
Director de Administración Escolar
PRESENTE

Por este conducto le comunico que el jurado asignado a la pasante, del Doctorado en Ciencias Ambientales, **C. Margarita Islas Pelcastre**, con número de cuenta 052817, quien presenta el trabajo de tesis titulado "**Propuesta de un Modelo Biológico de Remediación en Suelos Agrícolas Contaminados por Atrazina**", después de revisar el trabajo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión del mismo una vez realizadas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado.

PRESIDENTE: Dr. Javier Castro Rosas
SECRETARIO: Dr. Alfredo Madariaga Navarrete
VOCAL: Dr. José Roberto Villagómez Ibarra
SUPLENTE: Dr. Cesar Abelardo González Ramírez

Sin otro particular, reitero a Usted la seguridad de mi atenta consideración,

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo, a 4 de Junio de 2013.


Dr. Orlando Ávila Pezo
Director del ICB



Ciudad Universitaria Carretera Pachuca-Tulancingo
Km. 4.5. s/n Col. Carboneras C.P. 42184
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.
Tel: (771)7172000 ext. 2230 , 2231



Dedico esta tesis a Miguel Ángel, Dante Yair, Cynthia Michelle y Ángel Tonatíuh en agradecimiento por su amor, gran apoyo y comprensión.

Agradecimientos

Gracias Dios, por todo lo que me has permitido realizar

Expreso mi agradecimiento a mi madre, sin ti no podría haber alcanzado esta meta.....

¡Te amo!

*Con cariño agradezco a mi familia (hermanos, sobrinos, tíos, primos, etc.) por su comprensión,
motivación y apoyo en esta etapa de mi vida*

*Especialmente agradezco al Ingeniero José Jesús Espino por su apoyo, comprensión,
orientación y disposición de trabajo.*

A mi comité de asesores por su dedicación y consejos

Al Dr. Alfredo Madariaga por su amabilidad y dedicación constante

Al Dr. Otilio Acevedo por su apoyo, confianza y amistad

*A mis amigos Liz, Jesús, Lucio, José Jesús; Ericka, Idalid, Delia y Lupita por las porras y
pláticas emotivas*

*Agradezco todos los momentos compartidos con mis queridas compañeras y amigas Nadia,
Coco, Silvia, Tina, quienes sin duda me motivaron a seguir siempre adelante*

*Agradezco a mis compañeros y compañeras del ICAp e ICBI por su amable colaboración cada
vez que fue solicitada y por contribuir a amenizar las jornadas de trabajo.*

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO		PÁGINA
	Índice de cuadros	viii
	Índice de figuras	x
	Abreviaturas, acrónimos y símbolos	xii
	RESUMEN	1
	ABSTRACT	2
I	INTRODUCCIÓN	3
	OBJETIVOS	6
	Objetivo General	6
	Objetivos Específicos	6
II	ANTECEDENTES	7
	II.1.- Suelo y plaguicidas.	7
	II.1.1.- Contaminación del suelo por actividades agrícolas.	7
	II.1.2.- Los plaguicidas: Contexto global.	8
	II.1.3.- Plaguicidas en México.	12
	II.1.4.- Factores de evaluación en el comportamiento y destino de los plaguicidas en suelo.	14
	II.1.5.- Propiedades del suelo relacionadas a la degradación de plaguicidas.	16
	II.1.5.1.- Propiedades físicas.	16
	II.1.5.2.- Propiedades químicas.	20
	II.2.- Atrazina en las esferas del ambiente.	23
	II.2.1.- Antecedentes generales de atrazina.	23

II.2.2.-	Atrazina: Propiedades físicas y químicas.	26
II.2.3.-	Destino de atrazina en suelo.	29
II.2.4.	Atrazina: Persistencia, movilidad y adsorción.	31
II.2.5.-	Impacto ambiental de la atrazina.	32
II.2.6.-	Mecanismos de degradación de atrazina en suelo.	39
II.2.7.-	Microorganismos en la biodegradación de atrazina.	43
II.3.-	Biorremediación.	49
II.3.1.-	Biorremediación de suelos <i>in situ</i>	49
II.3.2.-	Fitorremediación y bioaumentación rizosférica.	51
II.3.3.-	Fitorremediación por <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	54
II.4.-	Rizósfera: Interacción suelo, planta y microorganismos.	58
II.5.-	Biorremediación por <i>Rhizobium</i> sp.	64
II.6.-	Biorremediación por <i>Trichoderma</i> sp.	67
III	METODOLOGÍA	73
III.1.-	Localización: Área de estudio.	73
III.2	Muestreo, preparación y conservación de las muestras de suelo.	74
III.3.-	Métodos analíticos físicos y químicos en los suelos experimentales.	76
III.3.1.-	Capacidad de campo.	77
III.3.2.-	Punto de marchitez permanente.	77
III.4.-	Diversidad de microorganismos en la rizósfera	

	del <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	78
III.4.1.-	Cuantificación de bacterias y hongos en la rizósfera.	78
III.4.2.-	Selección e Identificación de cepas.	78
III.4.3.-	Aislamiento e identificación de la cepa bacteriana: <i>Rhizobium</i> sp.	80
III.5.-	Bioensayos de resistencia por inhibición de crecimiento.	82
III.6.-	Producción de biomasa: <i>Rhizobium</i> sp., y <i>Trichoderma</i> sp.	84
III.7.-	Cinética de crecimiento de <i>Rhizobium</i> sp., y <i>Trichoderma</i> sp.	87
III.8.-	Biorremediación de suelo contaminado por atrazina.	87
III.8.1.-	Bioaumentación en laboratorio.	87
III.8.2.-	Fitorremediación y bioaumentación en invernadero.	88
III.9.-	Extracción y cuantificación de atrazina.	92
III.10.-	Análisis estadístico.	95
IV	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	96
IV.1.-	Parámetros físicos y químicos de las muestras de suelo.	96
IV.2.-	Diversidad de microorganismos en la rizósfera del <i>Phaseolus vulgaris</i> L.	100
IV.2.1.-	Cuantificación de bacterias y hongos en la	

	rizósfera.	100
IV.2.2.-	Selección e identificación de cepas bacterianas y fúngicas.	104
IV.2.2.1.-	Identificación de <i>Rhizobium</i> sp., aislado de nódulos de la planta de frijol.	106
IV.2.2.2.-	Identificación del género <i>Trichoderma</i> sp.	112
IV.3.-	Bioensayos de resistencia por inhibición de crecimiento.	114
IV.4.-	Selección de microorganismos con potencial de remoción de atrazina.	118
IV.5.-	Producción de biomasa: <i>Rhizobium</i> sp., y <i>Trichoderma</i> sp.	120
IV.6.-	Cinética de crecimiento de <i>Rhizobium</i> sp., y <i>Trichoderma</i> sp.	121
IV.7.-	Biorremediación de suelo contaminado por atrazina.	123
	a) Bioaumentación: Cuantificación en laboratorio.	123
	b) Fitorremediación y bioaumentación: Cuantificación de atrazina en invernadero.	126
V	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	135
VI	REFERENCIAS	138
VII	ANEXOS	172
1.	Triángulo de textura para calcular capacidad de campo en suelo.	172

2.	Reportes de los resultados de Análisis de Varianza en laboratorio e invernadero por NCSS, 2007.	173
3.	Cromatograma	216

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
II.1 Principales plaguicidas utilizados en México.	12
II.2 Valores de capacidad de intercambio catiónico en suelo.	21
II.3 Valores de materia orgánica en suelo	22
III.4 Valores de pH para suelo.	23
III.5 Diferentes formulaciones y presentaciones de atrazina.	26
III.6 Propiedades físicas y químicas de la atrazina.	28
III.7 Toxicología de la atrazina y sus efectos negativos.	34
III.8 Propiedades físico-químicas de los principales metabolitos en la degradación de atrazina.	42
III.9 Remoción de atrazina en diferentes procesos de biorremediación por microorganismos.	46
III.10 Descripción de los tipos de biorremediación	50
III.11 Descripción algunos mecanismos de fitorremediación.	53
III.12 Exudados de raíz de diferentes plantas y su función en la rizósfera del suelo.	61
III.13 Grupos de microorganismos en suelo de la rizósfera de trigo y suelo sin planta.	62
III.14 Principales grupos de microorganismos en la rizósfera.	63
VI.1 Comparación de medias de las propiedades físicas	

y químicas de los suelos estudiados.	96
VI.2. Propiedades físicas y químicas de la mezcla de suelo.	99
VI.3 Parámetros de humedad en la mezcla de suelo	100
VI.4 Resultados de las observaciones macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas de los géneros bacterianos aislados (parte I).	105
VI.5 Resultados de las observaciones macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas de los géneros bacterianos aislados (parte II).	108
VI.6 Diversidad de microorganismos aislados e identificados por condición de suelo.	110
VI.7 Resultados del % de crecimiento inhibitorio a diferentes concentraciones de atrazina de los géneros identificados.	115
VI.8 Comparación de medias de la remoción de atrazina en suelo a diferentes tratamientos por bioaumentación y días experimentales.	124
VI.9 Resultados de la comparación de medias en la remoción de atrazina en suelo a diferentes tratamientos por fitorremediación y bioaumentación en invernadero.	127
VI.10 Resultados de la biorremediación de suelo contaminado por atrazina en laboratorio e invernadero.	132

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
II.1 Estructura química del herbicida atrazina.	24
II.2 Dinámica de atrazina en el ambiente.	30
II.3 Mecanismos de degradación de atrazina por vías (i) hidrolítico y (ii) oxidativo-hidrolítico, hasta la mineralización en amoníaco y dióxido de carbono.	41
II.4 Mecanismos de biorremediación por fitorremediación.	51
III.1 Localización geográfica de los suelos agrícolas en la región seis del Estado que corresponde al valle de Tulancingo, Hidalgo, México.	73
III.2 Barrena tubular utilizada para la toma de muestra de suelo.	75
III.3 Identificación del género <i>Rhizobium</i> sp., aislado de nódulos de frijol.	82
III.4 Ensayo de resistencia de los microorganismos por crecimiento inhibitorio (CI).	83
III.5 Obtención de la biomasa del <i>Rhizobium</i> sp., en cultivo sumergido.	85
III.6 Obtención de la biomasa del <i>Trichoderma</i> sp., en medio sólido.	86
III.7 Condiciones y materiales utilizados en el experimento en invernadero.	90
III.8 Tratamiento en maceta en invernadero: Toma y preparación de las muestras.	92

III.9	Extracción de atrazina en muestras de suelo y planta.	93
III.10	Cuantificación de atrazina por HPLC. Agilent 1200 [®] , serie infinity.	94
IV.1	Cuenta total de bacterias aerobias (UFC g ⁻¹) de los tres suelos agrícolas del Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Donde C es el suelo de El Capulín, T de Tepantitla y el suelo S de Santana.	102
IV.2	Cuenta total de hongos (UFC g ⁻¹) de los tres suelos agrícolas del Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Donde C es el suelo de eEl Capulín, T de Tepantitla y el suelo S de Santana.	103
IV.3	Microfotografía de un nódulo de frijol, en fresco. Se aprecian organismos en forma de bacilos, con una longitud de 109.85 UM.	107
IV.4	Frecuencia (%) de géneros de bacterias y hongos identificados por condición de suelo.	111
IV.5	Morfología del <i>Trichoderma</i> sp.: a. Aspecto macroscópico; b. Imagen del microcultivo en aumento linear 40x, que muestra conidióforos hialinos; c. Fiálides simples sin producción de conidios; d. Conidióforos con fialosporos (producción de conidios) y e. Estructura morfológica en lactofenol.	113
IV.6	Ensayo de crecimiento inhibitorio (CI) a diferentes concentraciones de atrazina.	116
IV.7	Porcentaje de crecimiento inhibitorio de los	

microorganismos a 10,000 mg L ⁻¹ de atrazina.	117
IV.8 Imagen del ensayo de concentración mínima inhibitoria a 10,000 mg L ⁻¹ de los microorganismos seleccionados (a) <i>Rhizobium</i> sp., y (b) <i>Trichoderma</i> sp.	119
IV.9 Cinética de crecimiento en UFC g ⁻¹ de <i>Trichoderma</i> sp. y <i>Rhizobium</i> sp., en suelo estéril, saturado a capacidad de campo con 1000 mg L ⁻¹ de atrazina y su comportamiento en relación al Blanco y Testigo a los 0, 5, 10 y 15 días de incubación.	122
IV.10 Porcentaje de remoción de atrazina (concentración inicial: 10 mg de atrazina 50 g ⁻¹ de suelo) en suelo, respecto al tiempo de incubación: 5, 10, 20 y 40 días.	125
IV.11 Comparación de las dos concentraciones de atrazina en invernadero en relación a los tratamientos.	128
IV.12 Comparación de tratamientos en invernadero de los dos ensayos en función de los mg de atrazina 50 g ⁻¹ de suelo.	130

ABREVIATURAS , ACRÓNIMOS Y SIMBOLOS

Abreviaturas

atm	Atmosfera
Atz	Atrazina
cm	Centímetro
Cmol	Centimol
CL ₅₀	Concentración letal
Log K _{oc}	Constante de adsorción en sedimentos o suelo
pK	Constante de disociación
pKa	Constante de disociación ácida
pkb	Constante de disociación básica
H	Constante de la ley de Henry
Log K _{ow}	Constante de partición octanol-agua
DEA	Desetilatrazina
DIA	Desisopropilatrazina
DL ₅₀	Dosis letal
g	Gramos
HA	hidroxiatrazina
HPLC	High Performance Liquid Chromatography (Cromatografía líquida de alta resolución)
h	Hora
kPa	Kilo pascal
kg	Kilogramo

L	Litros
m ³	Metros cúbicos
μM	Micro mol
μL	Microlitros
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mm Hg	Milímetros de mercurio
ng	Nanogramos
ppm	Partes por millón
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias

Acrónimos

IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
AMIFAC	Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria AC
CPEHS	Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud
CICLOPLAFEST	Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
COESPLAFEST	Comités Estatales de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas
EPA	Environmental Protection Agency (Agencia de Protección Ambiental)
USEPA	Environmental Protection Agency United States (Agencia de

	Protección Ambiental de los Estados Unidos)
FAO	Food and Agricultural Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)
INE	Instituto Nacional de Ecología
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía
OMS	Organización Mundial de la Salud
PNUMA	Programa de la Organización de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente
SEMARNAT	Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
UMFFASC	Unión Mexicana de Fabricantes y Formulaciones de Agroquímicos
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization (Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura)

Símbolos

NH ₃	Amoniaco
CC	Capacidad de campo
CIA	Capacidad de Intercambio Aniónico
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
CO	Carbono Orgánico
Cw	Clima templado subhúmedo
ρ	Densidad

Ø	Diámetro
CO ₂	Dióxido de carbono
°C	Grados centígrados
N	Normalidad
%	Porcentaje
pH	Potencial de Hidrógeno
PMP	Punto de marchitez permanente

RESUMEN

El objetivo del presente trabajo es exponer un modelo biológico a escala invernadero para biorremediación de suelos contaminados por atrazina y empleando una combinación de fitorremediación por *Phaseolus vulgaris* L. bioaumentación rizosférica por *Trichoderma* sp., y *Rhizobium* sp., nativos. Las cepas se aislaron de suelos rizosféricos de la planta de frijol cultivada en tres sitios agrícolas en el Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Ningún microorganismo mostró crecimiento inhibitorio a concentración de 10,000 mg L⁻¹ del herbicida. Se manejó en invernadero una concentración inicial de 33.3 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo con un inóculo inicial de 1x10⁹ UFC mL⁻¹ de *Rhizobium* sp., 1x10⁵ conidios mL⁻¹ de *Trichoderma* sp. y cuatro tratamientos: Frijol + *Trichoderma* sp. (FT), Frijol *Rhizobium* sp. (FR), Frijol + *Rhizobium* sp. + *Trichoderma* sp. (FRT) y Frijol (F). Los resultados mostraron que se eliminó 25.51 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo (76.63%) mediante el tratamiento FT durante 40 días en invernadero y con diferencias estadísticas ($\alpha=0.050$, Tukey) entre los tratamientos respecto del blanco y testigo (control positivo y negativo). Los resultados indican que el modelo biológico propuesto y la metodología desarrollada funcionan en invernadero y se visualiza que pueden mejorar los procesos nativos existentes en el medio ambiente, aumentar la eficiencia de eliminación de atrazina en suelos agrícolas y minimizar o eliminar la contaminación a otros ecosistemas.

ABSTRACT

The object of the present work is to show a biological model on a hothouse scale for the bioremediation of soils contaminated with atrazine, and employing a combination of phytoremediation by *Phaseolus vulgaris* L. rhizopheric bio-augmentation by *Trichoderma* sp., and *Rhizobium* sp., native. The stumps are isolated from rhizopheric soils of the bean plant cultivated in three agricultural sites in the Valley of Tulancingo, Hidalgo, Mexico. No microorganism showed inhibitory growth at a concentration of 10,000 mg. L⁻¹ of the herbicide. An initial concentration of 33.3 mg. of atrazine 50 g⁻¹ of soil was managed in the hothouse, with a first inoculation of 1 x 10⁹ UFC ML⁻¹ of *Rhizobium* sp., 1 x 10⁵ conidiums mL⁻¹ of *Trichoderma* sp. and four treatments: Bean + *Trichoderma* sp. (FT), *Rhizobium* Bean sp. (FR), Bean + *Rhizobium* sp. + *Trichoderma* sp. (FRT) and Bean.(F). The results showed that 25.51 mg. of atrazine 50g⁻¹ of soil (76.63%) was eliminated by the FT treatment in 40 days in the hothouse, and with statistical differences ($\alpha=0.050$, Tukey) among the treatments in respect to the target and the control (positive and negative control). The results indicate that the proposed biological model and the methodology developed work in a hothouse, and it seems that the present native processes in the environment could be improved, increase efficiency in the elimination of atrazine in agricultural soils, and minimize or eliminate contamination to other ecosystems.

I. INTRODUCCIÓN

El suelo, es un biomaterial complejo y receptivo de los impactos negativos debido a la contaminación por compuestos químicos. Por ejemplo, la contaminación de los suelos agrícolas por el herbicida atrazina, puede ocasionar una alteración a los ciclos biogeoquímicos y a la biodiversidad que en él se desarrolla. Por ello, es necesario aplicar tecnologías amigables para su remediación y/o recuperación.

Algunas alternativas biotecnológicas de bajo costo son los mecanismos de fitorremediación y bioaumentación rizosférica por géneros nativos. Esta tecnología, consiste en una acción combinada entre plantas y poblaciones microbianas autóctonas, con capacidad fisiológica, bioquímica y molecular para absorber, retener, degradar o transformar sustancias contaminantes a otras menos dañinas.

La atrazina (Atz), es un fitosanitario clasificado por su acción biológica como herbicida, es una sustancia química utilizada para matar o inhibir el crecimiento de plantas consideradas como malezas o malas hierbas. En el 2006, la atrazina fue el herbicida de mayor aplicación a nivel mundial, se aplicó 29-34 millones de kg de ingrediente activo por año en suelos agrícolas (Joo *et al.*, 2010). Además, entre el 85 y 100% de los suelos agrícolas en países industrializados son tratados con herbicidas.

En México, la producción anual de herbicidas en 2010 fue de 31,878 toneladas, la cual se incrementó a 33,170 ton. en 2011 (INE, 2012). A nivel nacional, se aplica entre 1-2 kg de ingrediente activo de atrazina por hectárea, ocupando en 1995 el tercer lugar (12.8 %) de los herbicidas aplicados, con una clara tendencia a incrementar su uso a razón del 10% anual (INE, 2007).

La atrazina es un herbicida sistémico, selectivo y residual, es decir, que su efecto persiste por cierto tiempo. Se transporta a las esferas ambientales por procesos de volatilización, lixiviación, difusión, entre otros. Es considerado un contaminante puntual, con efectos negativos reproductivos, en carcinogénesis, teratogenicidad y ecotoxicidad. Evy y Nilanjana (2012) citan también, alteraciones en especies acuáticas, plantas y mamíferos.

La atrazina, por su estructura orgánica, puede experimentar procesos de degradación natural o inducidos. Se conocen dos mecanismos de la degradación de atrazina: (i) hidrolítico y (ii) oxidativo-hidrolítico. Smith *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2008; Sene *et al.*, 2010; Spaczynski *et al.*, 2012 y Dehghani *et al.*, 2013, muestran que la degradación de atrazina puede ser por especies aisladas o consorcios microbianos, en combinación con técnicas de biorremediación como la fitorremediación por la planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

El factor limitante para la mineralización de atrazina, es la ausencia de microorganismos específicos. Sin embargo, las referencias bibliográficas sugieren que la biorremediación rizosférica por cepas nativas de los géneros *Trichoderma* sp., y *Rhizobium* sp., han sido eficientes para lograr la eliminación de atrazina en suelo, más aún, cuando estos microorganismos y plantas se aíslan

de sitios contaminados donde crecen, se adaptan, desarrollan tolerancia y resistencia a estos ambientes de estrés. Por esta razón, son capaces de generar procesos metabólicos, que transforman la estructura química del contaminante, en compuestos más simples.

La presente investigación propone evaluar un modelo biológico de biorremediación de suelos contaminados por atrazina combinando fitorremediación y bioaumentación por microorganismos rizosféricos nativos. La metodología planteó identificar suelos agrícolas en el Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Posteriormente, se aisló e identificó a los géneros nativos *Trichoderma* sp. y *Rhizobium* sp. resistentes a diferentes concentraciones de atrazina.

Se generó la biomasa de las cepas fúngica y bacteriana como inóculo en la bioaumentación y se utilizó planta de frijol en la fitorremediación. Finalmente, se validó y evaluó el modelo biológico a escala laboratorio e invernadero. Con los resultados obtenidos, se puede aumentar la eficiencia de eliminación de atrazina en suelo agrícola y así, minimizar la contaminación hacia otras esferas ambientales.

OBJETIVOS

1. Objetivo general

Evaluar un modelo biológico de biorremediación de suelos contaminados por atrazina, mediante fitorremediación por *Phaseolus vulgaris* L., y bioaumentación por cepas nativas rizosféricas de *Rhizobium* sp. y *Trichoderma* sp. , en invernadero.

2. Objetivos específicos

- I. Aislar e identificar, a nivel de género microorganismos nativos rizosféricos del *Phaseolus vulgaris* L., en suelo agrícola contaminado y sin contaminar con atrazina.
- II. Cuantificar la resistencia de los microorganismos nativos rizosféricos y la tolerancia del *Phaseolus vulgaris* L. a diferentes concentraciones de atrazina.
- III. Validar una metodología en invernadero de remediación en suelo agrícola, contaminado por atrazina del valle de Tulancingo, Hidalgo, México.

II. ANTECEDENTES

II.1. Suelo y plaguicidas

II.1.1. Contaminación de suelo por actividades agrícolas

La explotación del suelo por las actividades agrícolas, es justificada por la demanda de producción de alimentos para la población, la cual se estima en 7 billones en el año 2011 y se proyecta a 9 billones de personas para el 2050 (UN, 2009). La agricultura, demanda que se garantice la productividad en cantidad y calidad en la producción de alimentos. En esta búsqueda de competitividad y rentabilidad alimentaria a escala industrial, se tuvo que modificar de cultivos tradicionales a métodos agrícolas intensivos y extensos con el uso de sustancias químicas como los plaguicidas.

La agricultura intensiva con aplicación de plaguicidas tiene estrecha relación con el medio ambiente y ha convertido esta actividad en una fuente de contaminación y deterioro ambiental a nivel mundial. La pérdida de la biodiversidad de especies de plantas y animales, se atribuye principalmente a la pérdida de hábitat por la invasión humana y expansión de la agricultura. Estudios ambientalistas y ecologistas serios (FAO, 2004; Alletto *et al.*, 2009; Valavanidis y Vlachogianni, 2010), calculan que cerca de 75000 millas cuadradas de tierra cultivable se pierde cada año debido a la desertificación causada por los métodos agrícolas intensivos y extensos.

La agricultura es el mayor usuario de agua dulce a nivel mundial y es un factor de contaminación de recursos hidrológicos superficiales y subterráneos. Es una fuente de contaminación no delimitada por plaguicidas, estos contaminantes considerados como xenobióticos difíciles de monitorear por la cantidad, frecuencia, difusión, condiciones ambientales y de persistencia en los componentes del suelo (Rieger *et al.*, 2004; Alletto *et al.*, 2009).

Por definición, el suelo es un sistema complejo, polifuncional, disperso, abierto, polifacético, estructurado, dinámico en el tiempo y variable en el espacio (Acevedo, 2000). Es un biomaterial necesario para la vida en el planeta, es el más complejo y lo conforman dos componentes: a) la arquitectura abiótica y b) la diversidad biótica (Young y Crawford, 2004). Esto implica que cuando presenta alteraciones, se torna difícil su recuperación.

Lal (2009), refiere que el uso y abuso del suelo en la agricultura impacta: el cambio climático, la calidad del agua, la pobreza rural, la demanda de energía, la seguridad alimentaria, la degradación del sistema y la biodiversidad. Por lo tanto, las investigaciones deben ser dirigidas de forma multidisciplinaria a tratar de mitigar, detener y recuperar este recurso.

II.1.2. Los plaguicidas: Contexto global

Los plaguicidas (también llamados pesticidas, agroquímicos o fitosanitarios), son productos químicos sintéticos que se utilizan en la agricultura para el control de plagas. Son utilizados con la intención de combatir parásitos y enfermedades de las plantas, proteger cultivos de agentes dañinos; no necesariamente parásitos

(malas hierbas, bacteria, hongos, virus, etc.). Buscan mejorar cualitativa y cuantitativamente la producción agrícola (Valavanidis y Vlachogianni, 2010).

El mercado mundial de plaguicidas se ha incrementado sustancialmente de 2.7 mil millones de dólares en 1970, a 32,7 mil millones en 2001. Los principales productores son Estados Unidos (U.S.) con el 34%, seguido por China y los países de la Unión Europea (Francia, Alemania, Reino Unido). A nivel mundial, los de mayor aplicación son: herbicidas (44%), insecticidas (28%) y fungicidas (19%) (Valavanidis y Vlachogianni, 2010).

Los fitosanitarios, se pueden clasificar de tres formas distintas (Galíndez, 2010):

- a) Por su actividad biológica, es la acción del control por tipo de organismo, como: insecticidas, acaricidas, nematocidas, fungicidas, antibióticos, herbicida, avicidas, atrayentes y repelentes.

- b) Por su naturaleza química, de acuerdo a la estructura molecular del compuesto y de los grupos funcionales que la conforman, pueden ser: organoclorados (insecticidas, herbicidas, fungicidas); organofosforados (insecticidas); carbamatos (insecticidas, herbicidas); derivados de urea (herbicidas); compuestos heterocíclicos (herbicidas) y compuestos inorgánicos.

- c) Por su toxicidad, se refiere a la dosis letal media (DL_{50}), que corresponde a la cantidad del plaguicida capaz de causar la muerte al 50% de los individuos, que conforman un lote experimental. Se clasifican como: super tóxicos ($DL_{50} < 5 \text{ mg kg}^{-1}$), extremadamente tóxicos ($DL_{50} = 5-50 \text{ mg kg}^{-1}$), muy

tóxicos ($DL_{50}= 50-500 \text{ mg kg}^{-1}$), moderadamente tóxicos ($DL_{50}=500-5000 \text{ mg kg}^{-1}$), ligeramente tóxicos ($DL_{50}=5-15 \text{ g kg}^{-1}$), prácticamente no tóxico ($DL_{50}=> 15 \text{ g kg}^{-1}$).

No se cuestiona, la importancia de los plaguicidas al controlar plagas y vectores de enfermedades, pero su aplicación indiscriminada, se relaciona a daños y efectos negativos al ser humano, al medio ambiente e inclusive ya generan un costo económico que impacta en la economía global (Cooper *et al.*, 2007; Raymundo *et al.*, 2009). Por ejemplo, en estudios realizados en la Unión Americana mostró que se invirtieron en el 2009, 12 mil millones de dólares por año en atención a los impactos negativos por agroquímicos; 1.1 mil millones para salud pública; 1.5 mil millones por resistencia de plagas a los pesticidas; 1.1 mil millones en pérdidas de cultivo a causa de plaguicidas; 2.2 mil millones perdidas de aves, peces y otros animales y 2.0 mil millones por contaminación de aguas subterráneas (Pimentel, 2009).

Todos los seres vivos en el planeta están expuestos a los plaguicidas de manera directa o indirecta. Algunos plaguicidas son tóxicos potenciales y generan alteraciones al sistema nervioso central, hepático y renal. Se absorben fácilmente por inhalación, ingestión y penetración dérmica. Los efectos nocivos a la salud, están relacionados a la toxicidad del plaguicida, las características físicas-químicas y su afinidad por los sistemas biológicos específicos. Así como, la dosis, ruta de exposición y a los factores del individuo que aumentan la susceptibilidad como edad, sexo, estado reproductivo y estado nutricional (COFEPRIS, 2004; Rondón *et al.*, 2010).

La Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés), a través del Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente (PNUMA) y la Organización Mundial de Salud (OMS), registran entre uno y cinco millones anuales de casos de intoxicaciones agudas por plaguicidas. De los cuales, se estima que ocurren 200 mil muertes (incluidos niños) y el 99% de estos casos ocurren en países en desarrollo de América Latina (FAO, 2004; González *et al.*, 2010).

Hay plaguicidas que pueden ser mutagénicos, teratogénicos y cancerígenos para los animales y el hombre (Rusiecki *et al.*, 2004; Raymundo *et al.*, 2009). Otros estudios, precisan que la exposición crónica, puede causar trastornos reproductivos como disminución del índice de fertilidad, infertilidad en hombres y alteraciones en el sistemas reproductor femenino (Rusiecki *et al.*, 2004; Valavanidis y Vlachogianni, 2010).

Informes de la Organización para la Agricultura y la Alimentación, estiman que de la cantidad de plaguicidas usados en la agricultura sólo el 0.1 % llega a la plaga o planta, mientras que el restante circula en las cinco esferas del medio ambiente (FAO, 2004); contaminando posiblemente el suelo, agua y la biota. Por lo tanto, se hace necesario caracterizar el destino final y la toxicidad no prevista de los plaguicidas; para evaluar con certeza el riesgo asociado a su uso (EPA, 2002; Torres y Capote., 2004; Alletto *et al.*, 2009).

II.1.3. Plaguicidas en México

En el país, no hay un registro preciso de la cantidad de agroquímicos que se consumen, pero el Instituto Nacional de Ecología (INE) reportó en el 2005 que se aplicaban alrededor de 60 mil toneladas anuales, la mayoría importados de empresas transnacionales. Están registrados 490 tipos de plaguicidas, 370 son aplicados para usos agrícolas, 70 de uso urbano y pecuario; el restante se consume de manera industrial, forestal y doméstico (INE, 2007).

La última cifra oficial de la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria AC (AMIFAC), reportan que entre el año de 1995 y 1998, se mantuvo un volumen aproximado de 50, 000 toneladas de plaguicidas formulados y 20, 000 toneladas de los técnicos (ingrediente activo) (cuadro II.1).

Cuadro II.1 Principales plaguicidas utilizados en México.

Nombre	Formulados	Ingrediente Activo
Insecticidas	25,516.70	6,531.44
Herbicidas	15,719.10	6,089.96
Fungicidas	9,124.50	5,342.90
Otros	4,318.70	1,512.99
Total	54,679.00	19,477.29

Fuente: AMIFAC, reportado por INE, 2000

Desafortunadamente, las fuentes de información que se consultaron como son: la Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria AC (AMIFAC) y la Unión Mexicana de Fabricantes y Formuladores de Agroquímicos SC (UMFFASC); en sus páginas oficiales no proporcionan cifras o registros del uso de pesticidas.

Esto limita a organizaciones gubernamentales como los Comités Estatales de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (COESPLAFEST); la Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas (CICLOPLAFEST) y la Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT) a elaborar informes actualizados.

El Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), publicó en la encuesta mensual de la industria manufacturera que el volumen de producción de insecticidas y herbicidas fue de 58,549 toneladas (ton) en el año 2010 y de 61,883 ton para el 2011 (INEGI, 2012). Las cifras no son comparables con lo publicado en el año 2000, sin embargo, se puede estimar que la producción nacional de estos dos plaguicidas es mayor que la aplicada hace 12 años.

A nivel nacional, el uso de plaguicidas se concentra en algunas regiones y cultivos. Los estados con mayor aplicación de agroquímicos son Puebla, Veracruz, Oaxaca Sinaloa, Chiapas, Jalisco, Nayarit, Colima, Sonora, Baja California, Tamaulipas, Michoacán, Tabasco y Estado de México. En estos, se consume aproximadamente el 80 % del total de plaguicidas usados en el país (INE, 2007; González *et al.*, 2010).

Algunos efectos negativos de los plaguicidas en México, son los reportados por Sánchez y Betanzos (2006), describen que en zonas agrícolas del país (Altos de Morelos, Mexicali y Hermosillo) detectaron niveles de plaguicidas tóxicos en trabajadores jornaleros, incluidos niños y mujeres con alteraciones de salud. Además, residuos en niveles no permitidos en sangre, vegetales, animales, agua y leche materna en la población expuesta.

II.1.4. Factores de evaluación en el comportamiento y destino de plaguicidas en suelo

El transporte y destino de los plaguicidas a través del perfil del suelo y los estratos subterráneos, está relacionado con la percolación del agua, las condiciones climáticas y topográficas del terreno donde son aplicados. También, depende del tipo de aplicación del plaguicida; de las propiedades físico-químicas, mineralógicas e hidrofísicas del suelo y de las características propias del plaguicida (Prata, *et al.*, 2003; Juhler *et al.*, 2010).

McGrath *et al.* (2010) y Echave (2012), refieren que los procesos que afectan el desarrollo de los agroquímicos en el suelo se pueden agrupar en:

- i) Procesos de acumulación o adsorción, que dependen de la fracción coloidal del suelo (capacidad de intercambio iónico, cambio de ligando, entre otros).
- ii) Procesos de degradación fisicoquímicos, que engloba la hidrólisis, deshalogenación, desalquilación, hidroxilación, condensación, oxidación, reducción y fotodescomposición.
- iii) Procesos de degradación microbiológicos, llevados a cabo por reacciones: oxidativas, reductivas, de hidrólisis y de ruptura de anillos aromáticos.
- iv) Mecanismos de transporte como la difusión molecular, lixiviación, evaporación.

Otro aspecto importante en los plaguicidas es la persistencia en suelo, es decir, el tiempo que permanece el agroquímico en el suelo con actividad biológica ($T_{1/2}$). La persistencia, depende de la toxicidad, la biodisponibilidad, la velocidad de descomposición y de las características propias de cada suelo. Los factores que determinan el comportamiento de los plaguicidas en el suelo, son las propiedades y características del plaguicida en los siguientes aspectos (Celis *et al.*, 2006; Díaz, 2007; Juhler *et al.*, 2010):

- I) Estructura Química: Si la estructura química es muy estable, es mayor la persistencia (por ejemplo los organoclorados);
- II) Volatilidad: La volatilidad, representa la tendencia del plaguicida a pasar a la fase gaseosa, depende de la presión de vapor y su solubilidad en agua;
- III) El coeficiente de reparto octanol/agua (K_{oa}): Mide la hidrofobicidad (o lipoafinidad) del compuesto y proporciona una estimación de la posible distribución del contaminante en el suelo y agua;
- IV) Solubilidad: La solubilidad, por ser la fase líquida del suelo en una fase acuosa y esto condiciona la dinámica del plaguicida en la fase, además los plaguicidas con mayor carácter contaminante son poco solubles en agua y se relaciona con la adsorción y persistencia;
- V) Otras: La dosis (altas, bajas), la presentación (sólido, emulsión, líquido etc.), el pK_a (comportamiento ácido) y pK_b (comportamiento básico).

II.1.5. Propiedades del suelo relacionadas a la degradación de plaguicidas

Las propiedades del suelo se relacionan con el comportamiento de los plaguicidas y viceversa, a tal grado que se ha modificado y alterado de forma alarmante las propiedades físicas, químicas y biológicas. Esta alteración, es conocida como degradación del suelo, la cual se define como un proceso que rebaja la capacidad actual y potencial del suelo para producir, cuantitativamente, bienes y servicios (FAO-UNESCO, 1980).

Existen diferentes formas y tipos de degradación, pero esta investigación se enfoca solo a la degradación del suelo por contaminación por fitosanitarios. Es una forma de degradación química que provoca la pérdida parcial o total de la productividad del suelo, ocasionan la pérdida de nutrientes, modifican las propiedades fisicoquímicas, deterioro de la estructura, pérdida en la retención de agua, incremento de toxicidad, entre otros.

A continuación, se describe de forma breve las propiedades físicas y químicas del suelo, que deben ser consideradas para evaluar la contaminación del suelo y conocer el estado de fertilidad que guarda con fines de su recuperación.

II.1.5.1. Propiedades físicas

Las fases del suelo

De acuerdo a Ortiz y Ortiz (1988), al suelo se le considera como una mezcla de material mineral (45%), materia orgánica (5%), agua (25%) y aire (25%). Las

proporciones de estos componentes varían de tiempo en tiempo y de lugar a lugar. Está constituido por tres fases: fase sólida, fase líquida y fase gaseosa.

La fase sólida es la más estable, la de mayor representación heterogénea, formada por constituyentes inorgánicos y orgánicos. La más representativa de la fase sólida es la materia orgánica e influye en la génesis y fertilidad del suelo. Confiere el color oscuro, proporciona buena estructura, mejora la capacidad de retención de agua, la temperatura es mayor porque el color oscuro absorbe mayor radiación solar, protege al suelo de la erosión y contaminación debido a la actividad microbiológica (Díaz, 2007).

La fase líquida del suelo, está constituida por agua y las soluciones del suelo. El agua procede de la atmósfera, por infiltraciones laterales, capas freáticas, entre otras. Las acciones del agua en el suelo son la meteorización física, química y translocación de sustancias. La fase líquida circula a través del espacio poroso, queda retenida en los huecos del suelo y compite con la fase gaseosa. El agua en el suelo tiene varios tipos de energías (potencial, gravitacional, cinética, calorífica, química y eléctrica) y su medida se expresa en unidades de potencial (Prado *et al.*, 2007; Raymundo *et al.*, 2009).

Para medir la humedad del suelo, se efectúa por el método de pérdida de peso de muestras húmedas tras la eliminación del agua por secado en estufa a 105°C. Hay distintas formas de medir el potencial hídrico de succión: método de campo (tensiómetro) y el de laboratorio (placa de presión). El contenido de agua en el suelo, se puede determinar desde dos puntos de vista:

- I) De forma física: como higroscópica, capilar no absorbible, capilar absorbible, gravitacional, de flujo lento y de flujo rápido.
- II) Agronómico: reportada como capacidad máxima, capacidad de retención, capacidad de campo, punto de marchitamiento y agua útil.

La fase gaseosa del suelo es poco estudiada, pero la atmósfera en el horizonte superficial del suelo es sumamente importante para la respiración de los microorganismos. Quienes son responsables en gran medida de los procesos de adsorción y degradación de los contaminantes. La composición de la atmósfera del suelo, se verá afectada principalmente por el contenido de agua y de materia orgánica. El agua desplaza el aire y la materia orgánica favorece la actividad biológica, provocando un consumo de oxígeno y por consiguiente condiciones anaerobias (Ortíz y Ortíz, 1988; Rinnan *et al.*, 2007).

La composición media del aire del suelo, varía con la profundidad del suelo y los cambios estacionales, las variaciones locales principalmente son en los contenidos de O₂ y CO₂, por las reacciones que realizan los organismos del suelo: respiración de las plantas, actividad de los microorganismos, los procesos de mineralización (transformación de compuestos orgánicos hasta productos inorgánicos sencillos como NH₃, CO₂, etc.) y de oxidación (Díaz, 2007).

Textura

El término textura, se usa para representar la composición granulométrica cuantitativa del suelo, que se definen de una manera gráfica en un diagrama triangular (Anexo 1), que representa los valores de las tres fracciones principales (arcilla, limo y arena).

Para determinar la textura del suelo Rodríguez y Rodríguez (2002), comentan que es necesario clasificar la proporción de partículas de arcillas (menor 0.002 mm), arenas (0.002-0.05mm) y limo (mayor 0.05-2.00). En el suelo la fracción fina, es la porción más activa en procesos de adsorción e intercambio iónico. Los suelos con mayor proporción de arcilla, generan cargas eléctricas negativas en su mayoría, esto apoya a la retención de nutrientes y de contaminantes como los fitosanitarios. La fracción gruesa en la textura, es importante en aspectos físicos.

Estructura

Se refiere, a la forma de agregación que tienen los elementos minerales y orgánicos del suelo. Los agregados constan de: Esqueleto (arenas y limos gruesos) y coloide edáfico (arcillas y limos finos). Los factores que afectan la estructura, pueden ser residuos sólidos orgánicos que favorecen la agregación. Los inorgánicos que provocan compresión y ocupación del espacio poroso; ambos tipos de residuos pueden contener elementos contaminantes que degradan la calidad del suelo (Acevedo, 2000).

Porosidad

Indica la cantidad de espacio en el suelo que puede ser ocupada por aire o agua. Suelos de textura fina (microporosidad), suelos de textura gruesa (macroporosidad) y suelos agregados (porosidad intermedia). El vertido de aguas residuales a un suelo, puede afectar su porosidad, por el efecto que tienen los cationes y la materia orgánica presentes sobre la estructura del suelo (Etchevers, 1992; Rodríguez y Rodríguez, 2002).

Intercambio de calor

El microclima del suelo, es afectado principalmente por el grado de humedad y las variaciones de la temperatura ambiente, por lo que el intercambio de calor es un proceso constante. A su vez, el intercambio de calor, depende de las variaciones de temperatura, de la conductividad térmica y de la capacidad de retención de calor del suelo. A medida que un suelo recibe agua, va aumentando la difusividad térmica, hasta un punto en que comienza a descender conforme se acerca al grado de saturación (Rinnan *et al.*, 2007).

II.1.5.2. Propiedades químicas

Capacidad de intercambio iónico

Es la capacidad que tiene un suelo para almacenar iones (nutrimentos y contaminantes) y retener humedad. Son cargas eléctricas (principalmente negativas) no compensadas, por lo que pueden atraer cationes e intercambiarlos en la solución del suelo (Aguilera y Martínez, 1990; Cepeda, 2000). Las cargas pueden ser permanentes y variables.

Los iones en los suelos, son retenidos por fenómenos de adsorción reversible, por lo que los iones pueden intercambiarse por otros, formando complejo coloidal o complejo adsorbente. La capacidad para retener cationes, se denomina capacidad de intercambio catiónico (CIC). La capacidad para retener aniones se denomina: capacidad de intercambio aniónico (CIA). Generalmente la CIC es mucho mayor que la CIA en los suelos (Rodríguez y Rodríguez ,2002). En México la Norma Oficial Mexicana 021, establece los valores de capacidad de intercambio catiónico en suelo, como referencia nacional (cuadro II.2).

Cuadro II.2 Valores de capacidad de intercambio catiónico en suelo.

Clase	CIC (Cmol*kg ⁻¹)
Muy alta	>40
Alta	25-40
Media	15-25
Baja	5-15
Muy baja	<5

Fuente: NOM-021-RENACT-2000

Materia orgánica

El contenido de materia orgánica en el suelo, es un indicador de la actividad biológica de los microorganismos. Estos, representan un papel esencial en el reciclaje, circulación, transformación de nutrientes y contaminantes orgánicos (Ben-Hur *et al.*, 2003). Son los responsables de transformar biológicamente los residuos orgánicos en el suelo en elementos minerales solubles, gaseosos (NH₄⁺, CO₂, NH₄, entre otros) o en complejos coloidales como el humus.

Las sustancias húmicas, mejoran las propiedades químicas y fisicoquímicas del suelo, modifican el pH e influyen el estado de dispersión/floculación. La cantidad y distribución de la materia es variable, pero oscila entre 0.5 -10% (cuadro II.3). Se concentra en el horizonte superficial del suelo y disminuye gradualmente con la profundidad.

Cuadro II.3. Valores de materia orgánica en suelo.

Clase	Materia orgánica (%)	Materia orgánica (%)
	Suelos volcánicos	Suelos no volcánicos
Muy bajo	<4.0	<0.5
Bajo	4.1-6.0	0.6-1.5
Medio	6.1-10.9	1.6-3.5
Alto	11.0-16.0	3.6-6.0
Muy alto	>16.1	>6.0

Fuente: NOM-021-RENACT-2000

pH

El pH en el suelo, es una propiedad química que determina el comportamiento y evolución de nutrientes y contaminantes en los diversos perfiles del suelo, en la vegetación y microbiota (Raina *et al.*, 2009). Normalmente, el pH del suelo varía entre 5 y 8.5 (cuadro II.4). El intervalo en que los nutrimentos son más disponibles es de 5.5 a 7.5, pero también a estos intervalos están disponibles los metales tóxicos.

El pH del suelo mide la concentración de iones H^+ en la solución del suelo, está determinando por la composición de la solución y de sus componentes más abundantes; como cationes básicos: Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ y Na^+ y cationes ácidos: H^+ , Al^{+3} , Fe^{+3} , NH_4^+ (Ortíz y Ortíz, 1988).

Cuadro II.4. Valores de pH para suelo.

Clasificación	pH
Fuertemente ácido	<5
Moderadamente ácido	5.1 -6.5
Neutro	6.6 -7.3
Medianamente alcalino	7.4 -8.5
Fuertemente alcalino	>8.5

Fuente: NOM-021-RENACT-2000

II.2. Atrazina en las esferas del ambiente

II.2.1. Antecedentes generales del herbicida atrazina

La atrazina (Atz), es un fitosanitario clasificado por su acción biológica como un herbicida, es una sustancia química utilizada para matar o inhibir, el crecimiento de plantas, consideradas como malezas o malas hierbas. Por su estructura química (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1, 3, 5-triazina), se clasifica, en el grupo de las triazinas que son compuestos nitrogenados heterocíclicos (Figura II.1). Por tipo de herbicida, es sistémico, selectivo y residual, es decir que su efecto persiste por cierto tiempo (Mendoza, 2011).

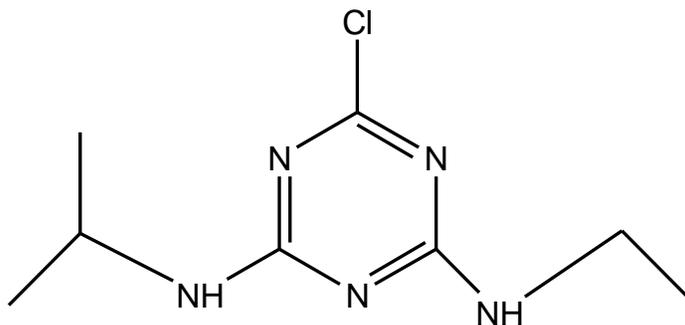


Figura II.1. Estructura química del herbicida atrazina.

Se utiliza, para el control pre y post-emergencia de hoja ancha, perennes y pastos de aplicación anual. Se absorbe, principalmente a través de las raíces, pero también, puede entrar a través del follaje y acumularse en los meristemos apicales y hojas (Cooper *et al.*, 2007).

En el 2006, la atrazina fue el herbicida de mayor aplicación a nivel mundial con 29-34 millones de kg de ingrediente activo por año en suelos agrícolas (Joo *et al.*, 2010). Entre el 85 y 100% de los cultivos (en países industrializados), son tratados con herbicidas. Se aplica en la producción de maíz, sorgo, caña de azúcar, piña, barbecho, praderas, nueces de macadamia, coníferas, huertos, viñedos, silvicultura, flores y pastizales (Rondón *et al.*, 2010).

La Atz fue introducida, a final de los años 50's por la empresa trasnacional Ciba Geigy, conocido actualmente como Syngenta- Novartis. Aunque su uso, se ha prohibido ó restringido en países de la unión europea, en América continúa siendo el herbicida, más utilizado por su bajo costo y su amplio espectro de acción.

En México, la producción anual de herbicidas en 2010 fue de 31,878 toneladas, la cual se incrementó a 33,170 ton., en 2011 (INE, 2012). Se aplica entre 1-2 kg de ingrediente activo por hectárea de este plaguicida, ocupando en 1995, el tercer lugar a nivel nacional (12.8 %) de los herbicidas, con clara tendencia a incrementar su uso a razón del 10% anual (INE, 2007). Como se explicó antes, en el país no existe un registro oficial actualizado de la cantidad de atrazina empleada, pero en la zona centro del país se trataron 376, 561 hectáreas de cultivos de maíz y sorgo con este herbicida (Bayer, 2009).

El nombre comercial es atrazina, pero tiene otros títulos en el mercado incluyendo formulaciones, los más usados son: A361, Aatrex, Aatrex 4L, Aatrex 80W, Aatrex Nine-O, Aktikon, Aetrax PK, Aktinit A, Aktinit PK Argezina, Atazinax, Atranex, Atrasina, Atrazina 50, Atralol A, Atred, Atrex, Candex, Cekuzina-T, Crisatrina, Crisazina, Cyazina, Farmco Atrazina, Fenamin, Fenamina, Fenatrol, G30027, Geigy 30027, Gesaprim, Gesoprim, Griffex, Hungazin, Hungazin PK, Inakor, Oleogesaprim, Primatol, Prmatol A, Primaze, Radazina, Estrazina, Triazina A 1294, Trac 50FL, Vectal SC, Weedex A, Wonuk, Zeazin, Zeazina (CPEHS, 1993).

De acuerdo a las especificaciones de la Organización para la Agricultura y la Alimentación, la atrazina comercial debe ser por lo menos 92% pura, pero la mayoría tiene alrededor del 95% de pureza (FAO, 2004). Las presentaciones pueden ser polvos humectables, gránulos, suspensiones, entre otros (Cuadro II.5).

Cuadro II.5. Diferentes formulaciones y presentaciones de atrazina.

Nombre comercial	% Formulaci3n	Presentaci3n
Uso Agrícola		
Aatrex 4L	43.0	Suspensi3n acuosa
Aatraex 90	90.0	Gránulos dispersables
Atrazina t3cnica	96.0	Polvo t3cnico
Atranex 50 WP	50.0	Polvo humectable
Atrazine 4L	43.0	Soluci3n concentrada acuosa
Atrazina t3cnica	95.0	Sólido t3cnico
Uso Industrial		
Atrazina t3cnica	97.0	Polvo t3cnico
Atrazina t3cnica	95.0	Sólido t3cnico

Fuente: Monsanto, 2002.

Las formulaciones en polvo humectable, contienen de 450 a 800 g de ingrediente activo (i.a.) atrazina/kg (menor si se mezcla con otros plaguicidas) y las formulaciones líquidas, incluyendo los concentrados para suspensi3n es de 40 a 650 g/L.

II.2.2. Atrazina: Propiedades físicas y químicas

La atrazina en estado sólido, es un polvo cristalino incoloro e inodoro. Cuando est3 líquida es blanca y viscosa. Se considera no explosiva bajo ciertas condiciones de almacenamiento y en algunas fichas de identificaci3n reportan que no presenta propiedades oxidativas. Cuando se trata de un producto

formulado hay variaciones ligeras en sus propiedades, por ejemplo en suspensiones acuosas son líquidas, blancas, inodoras y viscosas.

En las propiedades químicas se reporta, un pH entre 6-8 en formulación líquida. La solubilidad en agua, es contradictoria, debido a que es un compuesto ligeramente liposoluble, algunas fichas de identificación la reportan como insoluble; en otras los valores varían por presentación y tipo de formulación. En el cuadro II.6, se reportan las principales, propiedades físicas y químicas de la atrazina.

Cuadro II.6. Propiedades físicas y químicas de la atrazina.

Nombre	Parámetro
Fórmula	C ₈ H ₁₄ ClN ₅
Peso molecular	215.7 g mol ⁻¹
Punto de ebullición	205.0 °C (101 kPa)
Punto de fusión	175.8 °C
Densidad	1.23 g mL ⁻¹ (a 22 °C)
Presión de vapor	2.89x10 ⁻⁷ mm Hg a 25°C.
Coefficiente de partición octanol- agua (Log K_{ow})	2.54-2.7 (a 25 °C)
Coefficiente de adsorción en sedimentos o suelo (Log K_{oc})	2.08-2.1 a 25 °C
Solubilidad en agua	33 mg L ⁻¹ (a pH 7, 22 °C)
Solubilidad en solventes orgánicos	Etil acetato: 24 g L ⁻¹ (a 25 °C) Acetona: 31 g L ⁻¹ (a 25 °C) Diclorometano: 28 g L ⁻¹ (a 25 °C) Etanol: 15g L ⁻¹ (a 25°C) Tolueno: 4.0 g L ⁻¹ (a 25 °C) n-Hexano: 0.11 g L ⁻¹ (a 25 °C) n-Octanol: 8.7 g L ⁻¹ (a 25 °C)
pK	pKb= 12.3 y pKa=1.7
Constante de la Ley de Henry (H)	2.96x10 ⁻⁹ atm m ³ mol ⁻¹ a 25°C.

Fuente: Información integrada de las fichas de seguridad de: Proficol S.A. (2008); Monsanto Argentina (2002); Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (1993); USEPA; Syngenta S.A.

Las constantes fisicoquímicas de la atrazina (presión de vapor; coeficiente de partición; pK y la constante de la ley de Henry), indican que es susceptible a ser absorbida, por las plantas, el suelo, los animales y llegar a hasta el hombre de forma directa o indirecta. La persistencia y la movilidad de la atrazina plantean el posible escenario de su destino en el ambiente. Además, explica por qué puede contaminar aguas freáticas y superficiales. Esto dependerá de las condiciones climáticas, la hidrología del sistema y tipo de cultivo (Rodríguez y Cory, 2005; EPA, 2006).

II.2.3. Destino de atrazina en suelo

En suelo la atrazina, se reparte en sus tres fases (sólida, líquida y gaseosa); la cantidad en cada fase depende de su coeficiente de adsorción y de reparto. En la fase gaseosa la cantidad también depende de la constante de Henry. En suelos sin cubierta vegetal, hay poca capacidad de retención de la atrazina, en este tipo de suelos el herbicida se dispersa en forma de vapores tóxicos a la atmósfera (Echave, 2012).

Smith *et al.* (2005), refieren que la atrazina presente en la superficie del suelo, puede ser disipada por volatilización, es acumulada en la atmósfera, se dispersa globalmente por difusión del aire y se encuentra en forma de vapor. Después por precipitación pluvial, es reintegrada a las otras esferas del medio ambiente (hidrosfera, geosfera, biosfera y antroposfera). En la biosfera la cantidad de atrazina es más disponible para la planta en la solución del suelo (Figura II.2).

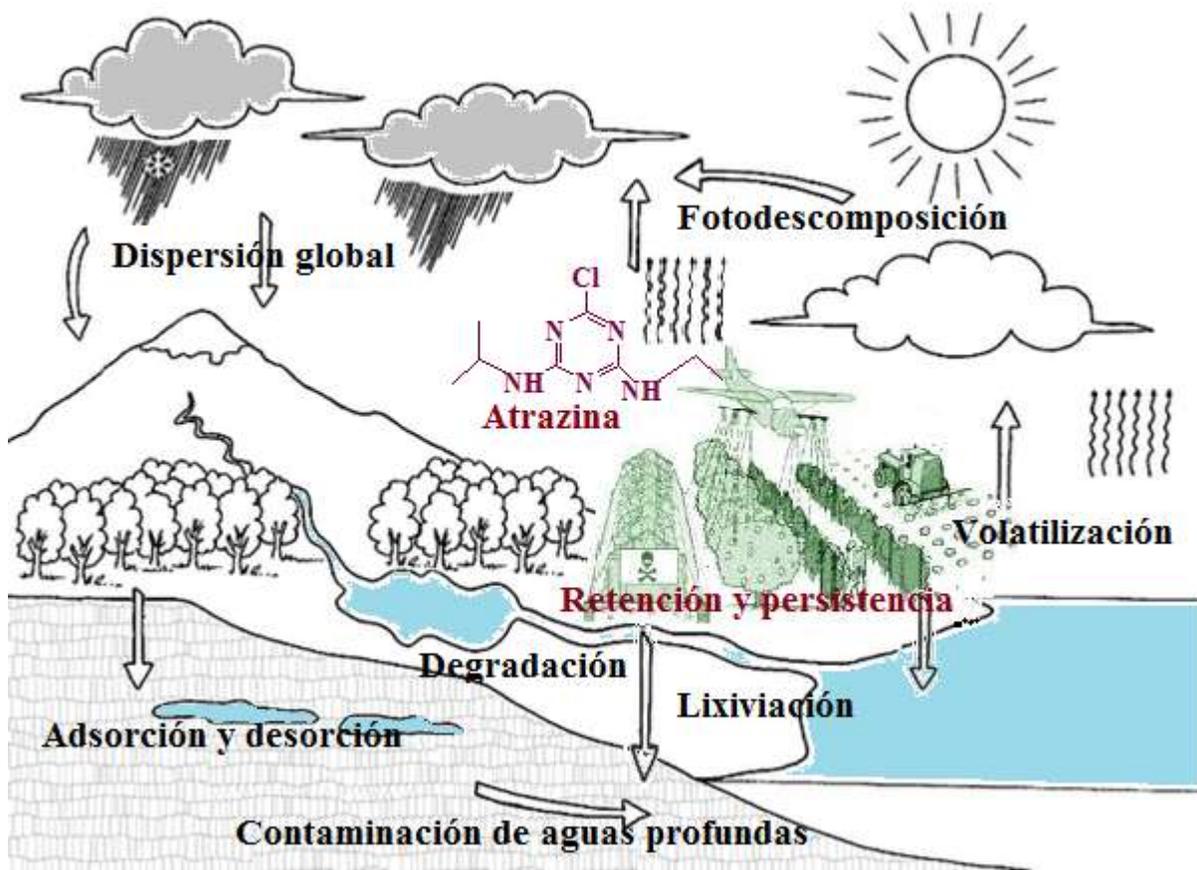


Figura II.2. Dinámica de atrazina en el ambiente.

Fuente: Mendoza, 2011. Adecuado por Islas-Pelcastre, 2013.

La acumulación de atrazina en suelo, no presenta una correlación significativa con la profundidad del suelo, contenido de arcilla y contenido de carbono orgánico. El coeficiente de distribución en suelos con textura fina es de 1.5 a 5.5. Por otro lado, en suelos con textura gruesa, su coeficiente de distribución es de 0.40 a 0.87 (Raymundo, 2008).

El comportamiento de la atrazina en el suelo, está sujeto a los procesos de: lixiviación; adsorción; convección-dispersión (transporte convectivo y

movimiento pasivo); el movimiento de iones disueltos y de la degradación del herbicida (Raymundo *et al.*, 2009).

II.2.4. Atrazina: Persistencia, movilidad y adsorción

No hay datos precisos, sobre la persistencia de la atrazina en el medio ambiente, está depende de la esfera ambiental en la que se encuentre. La Agencia de Protección al Ambiente (EPA, por sus siglas en ingles), reportó que puede tener una vida media de 125 días en suelos arenosos. Por otro lado, Cejudo *et al.* (2009), reportan que la atrazina en suelo persiste de 56 a 245 días, pero que sólo se mineraliza entre el 11 y el 60% del total aplicado. En estudios realizados por el servicio Geológico de U.S. (Estados Unidos, por sus siglas en ingles), reporta la persistencia del herbicida en lagos profundos a por lo menos 10 años (Fromang, 2010; Joo *et al.*, 2010).

La movilidad y degradación de la atrazina, depende de la adsorción de los constituyentes del suelo como son: materia orgánica, textura (minerales de arcilla), pH, contenido de carbono en la solución del suelo y de la cantidad aplicada (Khna y Anjaneyulu, 2005). En suelos aluviales o sedimentos francos y franco arcillosos, reportan una adsorción entre el 50 -80% del aplicado (Kumar y Kumar, 2012).

La atrazina puede presentar una adsorción preferentemente reversible (Kovaios *et al.*, 2006). Boivin *et al.* (2005), y Mordaunt *et al.* (2005), reportaron que aproximadamente un 90% del producto puede llegar a ser desorbido y entre el 10 y 25% del producto, forma residuos no extractables. Al mismo tiempo, la

desorción es igual de significativa. Está determina la cantidad de atrazina que puede llegar a lixiviar y por consiguiente contaminar.

La cantidad de atrazina que queda adsorbida fuertemente al suelo, es la más persistente, debido a que está protegida de los mecanismos de evaporación y degradación química y biológica. Sin embargo, hay menor riesgo de movilidad por lixiviación y por lo tanto, la contaminación de acuíferos profundos puede ser menor (Kumar y Kumar, 2012).

II.2.5. Impacto ambiental de la atrazina

Hasta ahora, se ha mostrado que la atrazina es de los herbicidas más utilizados a nivel mundial y como es su dinámica en el ambiente. Es un hecho que es un contaminante puntual y constante en las esferas ambientales. Se espera que al aplicarse de forma efectiva su regulación, se disminuya su aplicación. Pero, los efectos de su persistencia a largo plazo aún pueden seguir causando impactos ambientales negativos (Filipov *et al.*, 2007).

Toxicidad de la atrazina en los organismos

En aspectos ecotoxicológicos, la atrazina es de ligera a moderadamente tóxica para anfibios, peces y otros organismos acuáticos. Es ligeramente tóxica para lombrices de tierra. Prácticamente no es tóxica en aves y abejas. Por el contrario, para el ganado expuesto por ingestión de alimento contaminado por atrazina, se registra una toxicidad relativamente alta y por aplicación incontrolada, puede causar problemas importantes de fitotoxicidad (Evy y Nilanjana, 2012).

En agua a bajas concentraciones, inhibe el crecimiento de varias especies del fitoplancton. Sin embargo, en la biomasa de las algas se puede mantener por la colonización de especies resistentes al herbicida. La acumulación en peces, afecta el hígado, cerebro y tracto digestivo (Filipov *et al.*, 2007).

Aunque la mayoría de los informes la consideran ligeramente tóxica, puede actuar como disyuntor endócrino (DE), afectando la función reproductiva de los vertebrados (Casas *et al.*, 2008). El cuadro II.7, resume algunos valores de DL₅₀ y de concentración letal (CL), con vías de exposición.

Cuadro II.7. Toxicología de la atrazina y sus efectos negativos.

Tipos de toxicidad	Efectos	Rutas de entrada y valores promedio	Referencia
Toxicidad aguda			
	Baja toxicidad aguda, leve irritante en contacto con la piel.	<p>Ingestión :</p> <p>DL₅₀, oral, conejo y rata: >2000 mg/kg</p> <p>DL₅₀, oral, humano 1000mg/kg</p> <p>Piel:</p> <p>DL₅₀, rata: >5000 mg/kg</p> <p>Inhalación:</p> <p>CL₅₀, inhalación, rata: >5 mg/L (4 horas)</p> <p>NOEL¹ (rata) 10 ppm</p>	<p>Ghosh y Philip, 2006;</p> <p>Wu <i>et al.</i>, 2010</p> <p>RAPAL, 2012</p> <p>Proficol S.A. (2008); Monsanto Argentina (2002); Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (1993).</p> <p>Flores <i>et al.</i>, 2002</p>

Los metabolitos de la atrazina como el DEA y DIA, tienen mayor efecto agudo que la atrazina y son organoclorados y con trazas de urea.

NOEL (rata): 25 mg/kg /día

DL₅₀ 500-500 mg /kg

Toxicidad Crónica

Teratogenicidad

Estudios limitados en humanos

TLV³: Atrazina 5 mg/m³ ; OEL⁴(UK⁵)-
STEL⁶ Atrazina: 10 mg/m³; MAK⁷-
Alemania Atrazina: 2 mg/m³

Ghosh y Philip,
2006;

Wu *et al.*, 2010

RAPAL, 2012

Efectos reproductivos

Afecta diferencialmente la viabilidad de maduración de ovocitos de cerdo (in vitro)

CL₅₀ >500µM

CL₅₀ 239 µM

Pathak y Dikshit,
2011; Casas *et al.*(2008), RAPAL,
2012, Cox C, 2001;
Perry *et al.*, 2000;
Flores *et al.*, 2002;
Joo *et al.*, 2010

Reduce la capacidad de reproducirse, provoca nacimientos prematuros, abortos espontáneos y defectos de nacimiento en seres humanos. Puede también afectar la disminución de espermatozoides y

	aumento de los niveles de infertilidad.		
Mutagenecidad	Estudios limitados en humanos		Ghosh y Philip, 2006; Rodríguez y Cory, 2005; Joo <i>et al.</i> , 2010
Carcinogénesis	Reportan un potencial carcinogénico en animales como tumores mamarios	En ratas hembras Sprague-Dawley, Ninguno observado en ratas machos Sprague-Dawley, ratas o ratones F-344.	Ghosh y Philip, 2006; Wu <i>et al.</i> , 2010 RAPAL, 2012
	Estudios epidemiológicos sobre cáncer y su posible asociación con la atrazina están siendo revisados por la EPA de EE.UU		Sene <i>et al.</i> , 2010
	Se ha asociado a riesgo de varios tipos de cáncer, incluyendo linfoma de Hodgkin, cáncer de mama y de próstata.		
		TLV ³ : Atrazina 5 mg/m ³ ; OEL ⁴ (UK ⁵)-STEL ⁶ Atrazina: 10 mg/m ³ ; MAK ⁷ -	Cox, 2001

Ecotoxicidad	Indirectamente hay cambios en la calidad del agua causadas por su lixiviación:	Alemania Atrazina: 2 mg/m ³	
	Fauna acuática:	Disminución de niveles de oxígeno disuelto y la cubierta vegetal reducida	Ghosh y Philip, 2006;
	Puede causar trastornos endocrino en la feminización de ranas macho	Ranas 0.1mg/L	Kadian <i>et al.</i> , 2008; Lesan & Bhandari, 2004
	Potencial de bioacumulación Se prevé bioacumulación en organismos acuáticos	Pez CL ₅₀ (96 horas) trucha arco iris = 8.8 mg/L Carpa = 76 mg/L Siluro =7.6 mg/L Pez luna =16 mg/L Olima = 4.3 mg/L	Proficol S.A. (2008); Monsanto Argentina (2002); Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (1993).
	Fitotoxicidad: Por aplicaciones no controladas.	<i>Daphnia magna</i> EC ₅₀ (48 horas) = 6.9 mg/ml	

Olomina (*Selenastrum
capricornutum*)

EC₅₀ (72 horas) = 0.06 mg/L

Aves

DL₅₀(48 horas) perdiz = 464 mg
/kg

Pato = 10.000 mg/ kg

Resistencia

Varias malezas han desarrollado resistencia a la atrazina. Por ejemplo, *Chenopodium* y *Amaranthus*, donde se sugiere restricciones sobre el número de aplicaciones que se pueden hacer a los cultivos

Ghosh y
Philip, 2006

NOEL: Nivel sin efecto observable, ²UE: Unión Europea, ³TLV: Umbral del valor limite, ⁴OEL: limite de exposición ocupacional, ⁵Reino Unido, ⁶STEL: limite de exposición a corto plazo, ⁷MAK: Concentración máxima admisible.

Las fuentes de información, sobre la toxicidad son contradictorias y limitadas. Es un plaguicida con posibles efectos negativos en salud humana. La Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a la atrazina como un agrotóxico que no presenta riesgo agudo al usarlo en forma limitada. La agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC,) le asigna categoría, “no clasificable en materia de carcinogénesis en los seres humanos”.

No obstante, el Grupo de Evaluación en Salud Humana de la Agencia de Protección Ambiental en Estados Unidos (USEPA, por sus siglas en inglés) determinaron, que es “posiblemente cancerígeno, para seres humanos”, con limitada evidencia de efecto cancerígeno; por la ausencia de datos en seres humanos.

En estudios del sistema endócrino, se le asigna categoría 1, por existir al menos un estudio que proporciona evidencia de alteración endócrina en un organismo intacto. La exposición a la atrazina puede causar efectos en el sistema nervioso, en hígado, riñón e irritación de ojos. En contactos prologados, se observa sensibilización en la piel. La intoxicación en el hombre es por ingesta de alimentos y por consumo de agua contaminada (Cejudo *et al.*, 2009; Panuwet *et al.*, 2010).

II.2.6. Mecanismos de degradación de atrazina en suelo

La degradación de la atrazina en suelo, inicia cuando se alcanza un equilibrio entre las tres fases. Los procesos de degradación pueden ser fotoquímicos,

químicos y microbiológicos, y dependen de los procesos abióticos y bióticos (Rhine *et al.*, 2003; Cejudo *et al.*, 2009).

Por su estructura orgánica, la atrazina puede experimentar procesos de degradación natural o inducidos. Se conocen dos mecanismos de la degradación de atrazina: (i) hidrolítico y (ii) oxidativo-hidrolítico. En ambos, se incluye la dechlorinación hidrolítica, N-dealquilación, deaminación y rompimiento del anillo. Los metabolitos que se originan de degradación de la molécula son (Figura II.3):

- ✓ Hidroxiatrazina (HA: 4-(etilamino)-6-[(propan-2-isopropil) amino] -1, 3,5-triazina-2-ol),
- ✓ Desetilatrazina (DEA:4-amino-2-cloro-6-etilamino-5-triazina),
- ✓ Desisopropilatrazina (DIA: 6-cloro-2N-etil-2,4- diamina-1,3,5-triazina)
- ✓ y otros productos hidroxilados (Govantes *et al.*, 2009).

Mecanismo Hidrolítico-Oxidativo \longrightarrow

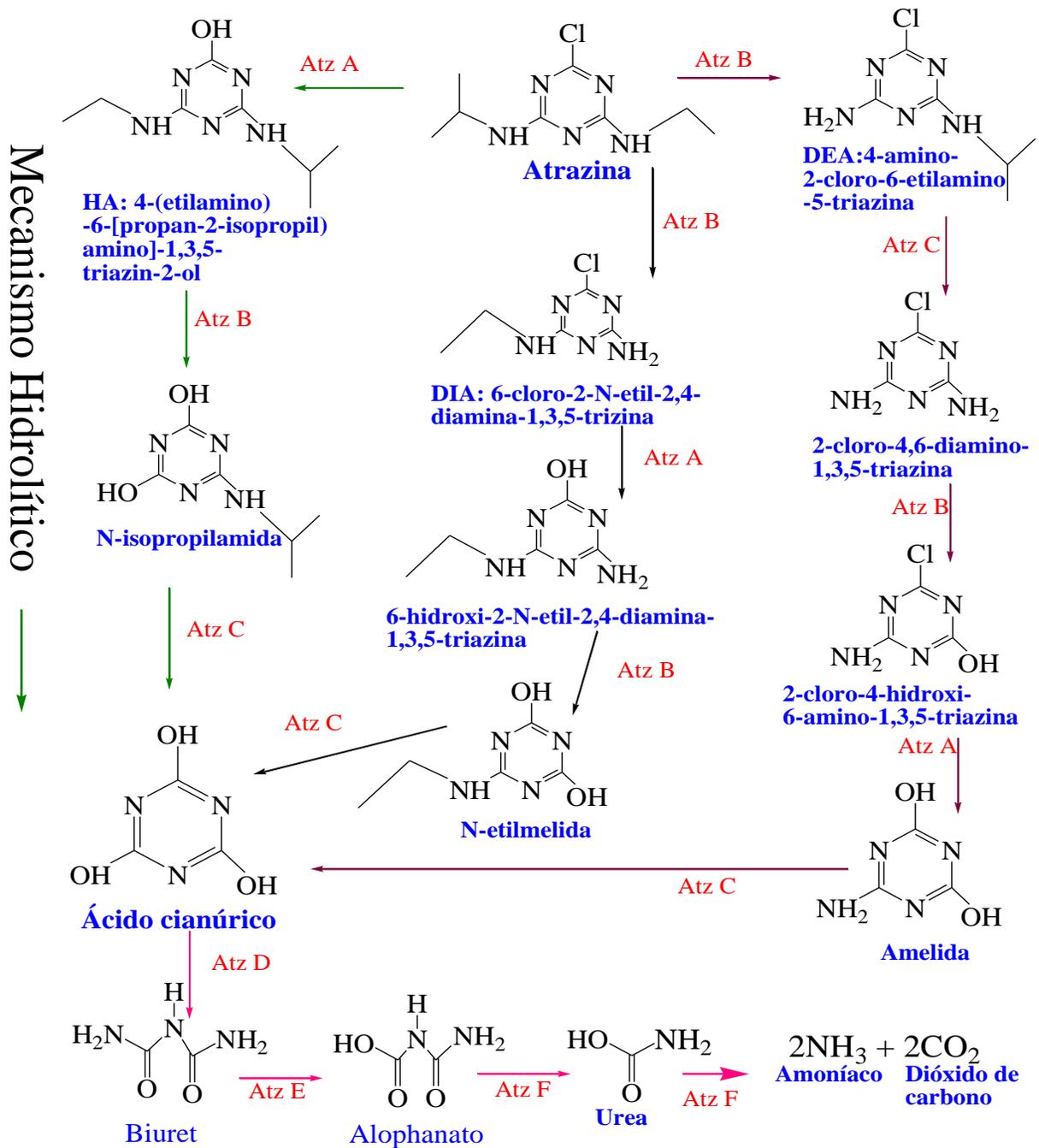


Figura II.3. Mecanismos de degradación de atrazina por vías: (i) hidrolítico y (ii) oxidativo-hidrolítico hasta la mineralización en amoníaco y dióxido de carbono.

Fuente: Modificada de Govantes *et al.*, 2009.

Los productos de degradación DIA y DEA son estructuras que presentan mayor solubilidad en agua, es menor la capacidad de adsorción y por lo tanto, la probabilidad de lixiviación se incrementa hacia los recursos hídricos (Larson *et al.*, 2004). En el cuadro II.8, se presentan las propiedades fisicoquímicas de los principales metabolitos secundarios de la atrazina.

Cuadro II.8. Propiedades físico-químicas de los principales metabolitos en la degradación de atrazina.

Compuesto	Peso Molecular (g/mol)	pK _{aw}	Solubilidad (mg/L)	Log K _{ow}
Hidroxiatrazina	197.2	4.9-5.2	5.9	1.40
Desetilatrazina	187.6	1.3-1.7	3.2	1.52
Desisopropilatrazina	173.6	1.3-1.5	6.7	1.13

Fuente: Papiernik y Spalding, 1998; Biceño, 2009.

El metabolito hidroxiatrazina (HA), presenta baja solubilidad y mayor capacidad de adsorción (aún en suelos con bajo contenido de CO), por consiguiente es mas persistente en ecosistemas acuáticos y terrestres.

La degradación de la atrazina en condiciones anaerobias o aerobias pueden ser descritas como:

(I) Química. Produce hidroxiatrazina y se efectúa, predominantemente en suelos ácidos con las siguientes reacciones:

- Hidrólisis química del anillo en la posición 2, la hidrólisis es rápida en suelos ácidos o básicos, pero lenta en suelos de pH neutro.

- Desalquilación en las posiciones C-4 y C-6.
- Descloración o deshalogenación en la posición C-2, pero está sujeto al contenido de humedad que proporciona la materia orgánica del suelo.
- N-desalquilación con la formación de estructuras secundarias que llevan a cabo una desaminación. Esto estará en función de la presencia de enzimas específicas.
- Ruptura de anillos, se lleva a cabo en la parte final de su degradación pero está sujeta a las condiciones ambientales y a la persistencia del metabolito formado.



(II) Fotoquímica (fotodescomposición). Se lleva a cabo por la luz solar y solo ocurre, sobre la superficie del suelo. En la disipación de la atrazina y sus metabolitos, están relacionados los factores de volatilización, adsorción, absorción que llevan a cabo los organismos en la biota (Ruíz, 2001).

(III) Biológica. La degradación biológica, es el principal mecanismo de remoción de atrazina en suelo. Al igual, que en la degradación química se llevan a cabo las vías hidrolítica y oxidativa-hidrolítica. Lo diferente, es que en los procesos de decloración hidrolítica, N-dealquilación, deaminación y rompimiento del anillo; son llevados a cabo por enzimas, provenientes del metabolismo de los microorganismos (Govantes *et al.*, 2009; Sene *et al.*, 2010).

II.2.7. Microorganismos en la biodegradación de atrazina

El factor limitante para la mineralización de atrazina (Figura II.3) por mecanismos biológicos, es la ausencia de microorganismos específicos y

biotecnologías desarticuladas. Para biorremediación de suelos contaminados, se encontró que hay mayor éxito de remoción del contaminante cuando se combinan mecanismos de bioaumentación y fitorremediación (Spaczynski *et al.*, 2012 y Lin *et al.*, 2008). Específicamente en bioaumentación, se usan microorganismos nativos aislados de la rizósfera de plantas tolerantes, que crecen en sitios perturbados por la presencia de xenobióticos (Sene *et al.*, 2010). Los microorganismos y plantas que crecen y se adaptan a este ambiente de estrés, desarrollan procesos metabólicos que transforman la estructura química del contaminante en compuestos más simples.

Evy y Nilanjana (2012), postularon que el consorcio mixto de los microorganismos *Nocardia sp.* y *Rhizobium sp.*, tienen mayor oportunidad para degradar atrazina, en virtud de la combinación de sus capacidades catabólicas. Pueden degradar atrazina hasta N-isopropilamida, debido a que contienen los genes *atzA*, *atzB* y *atzC*; éste último gen es el responsable de la ruptura del anillo de la atrazina. El mismo estudio reporta a los géneros *Ochrobactrum sp.*, y *Pseudomonas sp.*, que contienen el gen *atzD*, como el responsable del catabolismo de la atrazina hasta ácido cianúrico.

El género *Pseudomonas sp.* (cepa modificada ADP), es una bacteria modelo que ha sido estudiada para tratar de explicar el catabolismo de la atrazina y su relación con los genes responsables de su degradación. Este modelo, estableció que al contar con todos los genes (*atz*: A, B, C, D, E, F y *atzN*), es capaz de regular las actividades enzimáticas y conducir el proceso de degradación de atrazina hasta su mineralización, por lo menos a nivel de laboratorio (Govantes *et al.*, 2009). Sin embargo, aclaran que las cepas que se

modifican y desarrollan en un ambiente de laboratorio no se comportan de manera similar en condiciones de campo (*in vivo*).

El Cuadro II.9., presenta un compendio de algunas investigaciones de biorremediación por microorganismos para remoción de atrazina.

Cuadro II.9. Remoción de atrazina en diferentes procesos de biorremediación por microorganismos.

Tratamiento	Organismo usado	Contaminante	Resultados	Referencia	
Bioaugmentación	Cultivo de células de <i>Arthrobacter</i> sp. cepa GZK-1	280 $\mu\text{g g}^{-1}$ Atrazina en cultivo líquido	Remoción del 88% de atrazina en 14 d.	Getenga <i>et al.</i> , 2009	
Bioaugmentación y bioturbación	<i>Pseudomonas ADP</i> , <i>Chelatobacter heintzii</i> y <i>Lombricus terrestris</i>	30 mg L^{-1} de atrazina	65% de mineralización de atrazina en 28 días e identificación de genes atzA	Monard <i>et al.</i> , 2008	
Reactor continuo (Quimioestado)	en Consorcio: <i>Ochrobactrum</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>CellulomoimSy</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Microbacterium</i> , <i>Rhizobium</i> y <i>Pseudomonas</i>	Taza de remoción volumétrica de: 19.6 $\text{mg L}^{-1}\text{h}^{-1}$ de S-triazina	El consorcio registro el 96% de remoción de s-triazina en 42 días, registrando un aumento de bacterias de $5 \cdot 10^5$ a $3 \cdot 10^8$ UFC ml^{-1}	Mondragón <i>et al.</i> , 2008	
Consorcio fúngico	<i>Aspergillus</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Fusarium</i> , <i>Penicillium</i> y <i>Trichoderma</i>	Atrazina	25- 45 % de mineralización	Sene <i>et al.</i> , 2010	
Biorremediación	Catálisis enzimática	Enzima OpdA y gen trzN	258 mg atrazina	13 mg atrazina $\text{s}^{-1}\text{mg}^{-1}$ trzN	Scott <i>et al.</i> , 2010
Fitorremediación	Rizorremediación	Pastos forrajeros: <i>Dactylis glomerata</i> L., <i>Bromus inermis</i> , <i>Festuca</i>	Suelo con Atrazina ($1000 \mu\text{g L}^{-1}$)	Remoción de 55-81% de atz., en 25 d	Lin <i>et al.</i> , 2008

		<i>arundinacea,</i> <i>Phleum pratense</i> L., <i>Panicum virgatum</i> L.			
	Compendio de varias estrategias de fitorremediación	<i>Tulipa generiana</i> L., <i>Helianthus</i> <i>tuberosus,</i> <i>Nicotiana</i> <i>tabaccum,</i> <i>Glycine max,</i> <i>Lolium rigidum,</i> <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana,</i> <i>Vetiveria,</i> <i>Phaseolus,</i>	Herbicidas (atrazina), metales pesados, contaminantes orgánicos	Remoción del contaminante entre el 88- 100% del contaminante	Peralta y Volke, 2012; Spaczyński <i>et</i> <i>al.</i> , 2012 y Abhilash <i>et</i> <i>al.</i> , 2009
Bioestimulación	Aplicación de abonos, adición de nutrientes, modificación de condiciones del suelo	Estimulación de la condiciones del suelo	Atrazina y otros herbicidas	Remoción del 89% de atrazina en 60 días por aplicación de purines	Gopinath y Sims, 2011
	Biosorción fúngica	Consorcio de hongos filamentosos	Atrazina (600 mgL ⁻¹)	Remoción del 96% de atrazina, aun pH de 6, a 30°C en 8 horas	Kumar y Kumar, 2012
Quimiotaxis	Metabolismo de	<i>Pseudomonas</i>	S- triazinas	Identifican los genes	Liu y parales,

	degradación bacteriana	<i>sp.</i> (ADPMB-2) y <i>E. coli</i>		atzDEF, responsables de la degradación de la atrazina	2009
Bioaumentación y bioestimulación	%Mineralización y % biodegradación	<i>Pseudomona</i> ADP y citrato	Atrazina (300 mg L ⁻¹) en 1 semana	a)70% de mineralización con 1 dosis de citrato (107-108 UFC g ⁻¹ de P.ADP) b)98% biodegradación con 4 dosis de 2.4 µg g ⁻¹ de citrato (107-108 UFC g ⁻¹ de P.ADP)	Lima <i>et al.</i> , 2009

II.3. Biorremediación

II.3.1. Biorremediación de suelos *in situ*

La remediación de suelos contaminados es una práctica necesaria, que se realiza por técnicas biológicas, conocidas como biorremediación. En la biorremediación de suelos *in situ*, se pueden adicionar materiales exógenos, estimular o incrementar la población nativa; para acelerar e incrementar el proceso de biodegradación. Se usan plantas, microorganismos o ambos, con la intención de neutralizar sustancias tóxicas, transformándolas, en sustancias menos tóxicas o bien convertirlas en inocuas, para el ambiente y la salud humana (Cheyns *et al.*, 2011; Getenga *et al.*, 2009).

La biorremediación, puede clasificarse de acuerdo al organismo que efectúe la degradación del compuesto xenobiótico. Cuando, se habla de fitorremediación, es el uso de plantas para la remoción de contaminantes de suelo y agua. La bioaumentación, es la adición de microorganismos como hongos, algas, bacterias, etc. El cuadro II.10, refiere algunas características de los tipos de biorremediación existentes.

Cuadro II.10.Descripción de los tipos de biorremediación

Nombre de la biorremediación	Descripción	Referencia
Bioestimulación <i>In situ</i>	Adición de nutrientes (abonos orgánicos, minerales), oxígeno o pueden modificar el pH al suelo para estimular el crecimiento de microorganismos que degraden el contaminante.	Cheyne <i>et al.</i> , 2011; Lladó <i>et al.</i> , 2009.
Bioaumentación <i>In situ</i>	Inoculación de una mezcla enriquecida de microorganismos previamente extraída del mismo suelo. Los microorganismos descomponen a los contaminantes xenobióticos, que pueden transformarlos a moléculas más simples como dióxido de carbono, iones cloruro, agua y biomasa.	Getenga <i>et al.</i> , 2009; Lopera <i>et al.</i> , 2005; Gentry <i>et al.</i> , 2004.
Bioventing <i>In situ</i>	Inyección (o extracción) forzada de aire para incrementar la concentración de oxígeno y estimular la biodegradación.	Monard <i>et al.</i> , 2008.
Bioacumulación <i>In situ</i>	Proceso donde se utilizan microorganismos con la capacidad biológica para acumular contaminantes, para ser eliminados o magnificarlos.	Sánchez y Arguello, 2006.
Biotransformación <i>In situ</i>	En metales cuando en el proceso por cambio de valencia, el metal tiene una forma menos tóxica.	Sene <i>et al.</i> , 2010.
Biocamas ó biopilas <i>Ex situ</i>	Proceso biológico controlado donde los contaminantes orgánicos son biodegradados y mineralizados por microorganismos.	Castillo <i>et al.</i> , 2008; Vásquez <i>et al.</i> , 2010.
Biofiltros <i>Ex situ</i>	Dispositivo (biorreactor) que utiliza microorganismos para eliminar o retener contaminantes de medios acuosos, gaseosos o bien sobre soportes sólidos.	Locke <i>et al.</i> , 2011; Liu y Parales, 2009.
Fitorremediación <i>In situ</i>	Combinación de plantas y comunidades de microorganismos para eliminar, transferir, estabilizar y degradar contaminantes orgánicos e inorgánicos.	Maldonado <i>et al.</i> , 2010; Prasad, 2011.

II.3.2. Fitorremediación y bioaumentación rizosférica

De las diferentes opciones de biorremediación, la fitorremediación ocupa un lugar importante, porque es una tecnología emergente. Basada en la acción combinada de plantas (terrestres o acuáticas) que en algunos casos se combina con comunidades microbianas nativas para remediar el ambiente. En la figura II.4, se describe la mecánica de biorremediación por fitorremediación (Prasad, 2011).

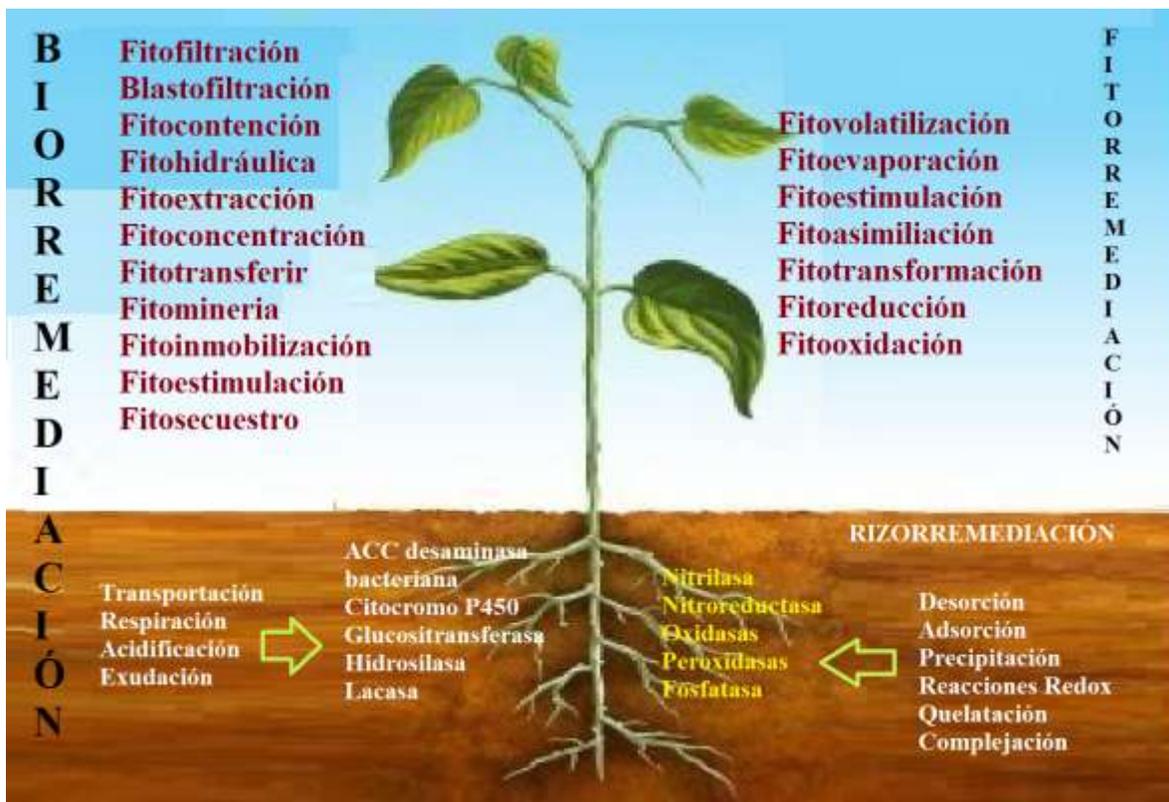


Figura II.4. Mecanismos de biorremediación por fitorremediación.

Fuente: Prasad (2011). Adecuado por Islas-Pelcastre, 2013.

Algunas ventajas en los procesos de fitorremediación propuestos por Peralta y Volke (2012), son:

- (1) es una tecnología de bajo costo;
- (2) posee un impacto regenerativo, es decir, menor impacto ambiental en los sitios donde se aplica;
- (3) se pueden usar especies vegetales, tolerantes a altos niveles de contaminantes; (4) depende de la energía solar y su mantenimiento es mínimo;
- (5) puede aplicarse *in situ*, en grandes áreas;
- (6) evita la destrucción de la estructura del suelo y la contaminación secundaria.

Solo algunos estudios explican a detalle los mecanismos moleculares, bioquímicos y fisiológicos en la fitorremediación. Esto le permite ser un área de oportunidad en líneas de generación y aplicación de conocimientos en diferentes disciplinas (Estrada *et al.*, 2007). En el cuadro (II.11), se describen algunos de los mecanismos más estudiados en fitorremediación.

Cuadro II.11. Descripción de algunos mecanismos de fitorremediación.

Procesos de fitorremediación	Descripción del mecanismo
Fitoestabilización	Disminución de la biodisponibilidad y/o toxicidad del contaminante por su acumulación en raíces, incorporación a lignina o humus en la rizósfera.
Fitoextracción	Extracción del contaminante del suelo por absorción, translocación y acumulación en tejidos aéreos de la planta.
Fitofiltración	Se basa en la utilización de plantas crecidas en cultivos hidropónicos, con raíces de plantas terrestres con alta tasa de crecimiento y área superficial para absorber, concentrar y precipitar contaminantes.
Fitoestimulación:	Cuando las plantas generan los exudados radiculares que estimulan el crecimiento de los microorganismos nativos capaces de degradar compuestos orgánicos xenobióticos.
Fitoestabilización	La planta desarrolla un sistema denso de raíces que reduce la biodisponibilidad y la movilidad de los contaminantes evitando el transporte a capas subterráneas o a la atmósfera.
Fitovolatilización	Absorción, translocación y transformación de contaminantes volátiles a formas menos tóxicas para la planta, para su liberación a la atmósfera.
Fitodegradación	Destrucción de contaminantes orgánicos por su metabolismo (transformación o mineralización en la planta).
Rizorremediación	Metabolismo y/o aumento en la captación o estabilización del contaminante por efecto sinérgico de la asociación planta-microorganismo en la rizósfera

Prasad (2011) y Fuentes y Ferrera (2007), refieren que los procesos de fitorremediación se mejoran con la asociación entre plantas y microorganismos nativos, aislados de la rizósfera de la misma planta (rizorremediación y bioaumentación). Cuando las plantas y los microorganismos rizosféricos son nativos, tolerantes y/o resistentes a los sitios perturbados que se pretenden recuperar, se estima que estos

microorganismos y plantas, están adaptados a este ambiente de estrés y desarrollan mejor los procesos metabólicos de degradación; para transformar la estructura del contaminante en compuestos más simples.

II.3.3. Fitorremediación por *Phaseolus vulgaris* L

Por razones económicas y prácticas, una especie adecuada en fitorremediación, tiene que contar con un mínimo de requisitos adicionales: crecimiento rápido, alta biomasa, raíces profundas y capacidades ecológicas amplias; que le permitan adaptarse a condiciones ambientales de los sitios a recuperar (Sadd *et al.*, 2009).

Cuando se trata de recuperar suelos agrícolas contaminados, lo ideal es buscar una planta que se desarrolle o cultive en el mismo sitio. Es un hecho que las especies de poblaciones silvestres vegetales autóctonas pueden adaptarse y resisten altos niveles de contaminación, comparadas con especies exógenas. En la diversidad vegetal de esos lugares, las plantas desarrollan capacidades bioquímicas, que permiten tolerar y degradar contaminantes xenobióticos.

Especies vegetales como las leguminosas, son candidatas para ser usadas en remediación. Son de importancia en ecosistemas naturales, en agricultura y en el área agroforestal. Su habilidad para fijar nitrógeno en simbiosis con bacterias y hongos en la rizósfera, hace de ellas medios beneficiosos infectivos excelentes para utilizarlas en fitorremediación (Pérez *et al.*, 2011).

Hay variedades de leguminosas como el frijol (*Phaseolus vulgaris*), que han sido estudiadas como planta modelo para fitorremediación de suelos contaminados, por compuestos orgánicos como hidrocarburos, plaguicidas, entre otras. La interacción de esta leguminosa con los microorganismos rizosféricos, puede incrementar la remoción de xenobióticos, debido a que hay un crecimiento de microorganismos, estimulados por los exudados radicales.

Además, algunas variedades de frijol poseen un sistema radical ramificado y profundo que le permite actuar sobre los contaminantes en las capas más profundas del suelo (Vidal, 2012). Este género de planta es muy adaptativo, la abundancia de sus raíces hace posible la mejora de las características fisicoquímicas de suelos deteriorados.

Sangabriel *et al.* (2006), reportaron que la leguminosa *Phaseolus coccineus*, a nivel de invernadero fue capaz de crecer en suelo contaminado con aproximadamente 50,000 mg kg⁻¹ de combustóleo. Después de 90 días, evaluaron su capacidad de tolerancia al hidrocarburo y registraron aumento significativo de la población de bacterias y hongos en la rizósfera.

En un trabajo posterior con la misma especie de planta Ferrera *et al.* (2007), evaluaron la capacidad de la planta en fitorremediación de suelo contaminado con combustóleo (50,000 mg kg⁻¹), al estimularlo con fertilización inorgánica y orgánica. Los resultados mostraron mayor degradación del combustóleo en la rizósfera del *Phaseolus coccineus* cuando se estimula con fertilización. Esta variedad de leguminosa es nativa

de la zona de estudio y resulto tolerante a concentraciones altas del hidrocarburo.

Recientemente, Pérez *et al.* (2011), demostraron la remoción de antraceno en suelo por frijol cultivado en la región agrícola de Acatzingo, Puebla, México. Se trabajó a dos concentraciones (200 y 400 mg kg⁻¹), en condiciones de invernadero (18-25°C) en macetas de 250 g. El proceso se evaluó a los 15 y 30 días de desarrollo de la planta, la cual fue una variedad criolla de la misma región. En el informe registraron que se alcanzó el 84% de remoción a los 30 días. A una concentración de 400 mg kg⁻¹ del hidrocarburo.

Otro aspecto importante en relación a *Phaseolus vulgaris*, es lo que plantea Beattie (2007), que refiere que los mutualismos más estudiados son los bacterianos de plantas. Principalmente los que existen entre los miembros del orden Rhizobiales y miembros de la Leguminosae. Todos los simbiontes de la leguminosa, se clasificaron en el género *Rhizobium* por lo que estos simbiontes, son a menudo denominados genéricamente rizobios y a la simbiosis *Rhizobium*- leguminosa sólo como simbiosis.

La fuerte presión de las plantas por la captación de N₂ favorece a las leguminosas como el frijol, establecer simbiosis con microorganismos del suelo. Las leguminosas, pueden realizar asociaciones simbióticas tanto con bacterias del suelo como con hongos. Existen alrededor de 750 géneros de leguminosas y entre 18,000 a 19,000 de especies; y el 88% de las especies estudiadas, forman nódulos con *Rhizobium* (Law *et al.*, 2007).

En la rizósfera de variedades de frijol, se han aislado bacterias como el *Rhizobium*, que tienen la capacidad de proveer nitrógeno, fósforo y ha demostrado que degrada moléculas recalcitrantes como hidrocarburos y plaguicidas (Pérez *et al.*, 2011). Además, esta leguminosa puede incrementar hasta 10 veces la población rizosférica del sitio a remediar, si se usan especies con adaptación a las condiciones ambientales del lugar y si son tolerantes al contaminante que se pretende degradar (Ferrera *et al.*, 2007).

México, ocupa un lugar privilegiado en el mundo por la diversidad de leguminosas y tiene la mayor diversidad del género *Phaseolus*. Entre los más conocidos, además de *Phaseolus vulgaris* (frijol común), se encuentran otras especies relacionadas como *P. coccineus* (ayocote), *P. acutifolius* (frijol tépari) *P. lunatus* (frijol lima) y otras variedades criollas que se producen en diferentes regiones del país (Quinto *et al.*, 2007).

El frijol común es una planta agrícola anual, intensamente cultivada en México, es uno de los alimentos básicos en la dieta a nivel nacional. En 2009, se cultivó en promedio 1.7 millones de hectáreas de las cuales 13% se desarrolló en condiciones de riego, obteniendo un rendimiento medio anual de 1.63 t ha⁻¹. El 87% restante, se cultivó en condiciones de temporal donde el rendimiento varió de 0.24 a 1.58 t ha⁻¹ (Chávez y Álvarez, 2012).

Sangerman *et al.* (2010), reportan a México como un centro de origen del frijol y cuenta con un vasto acervo de poblaciones silvestres y nativas, estas últimas también conocidas como criollas; sin embargo, hay escasa información sobre sus características físicas y químicas asociadas con la

calidad del grano. Siendo los genotipos nativos parte importante de la riqueza genética de nuestro país. Es necesario contar con su caracterización, lo cual permitiría aprovechar este germoplasma en los programas de genética.

Hay múltiples variedades de frijol que se caracterizan por su tamaño, color, forma y tipo de crecimiento. Se considera que en total existen 70 especies; en México éstas ascienden a 50, destacan cinco especies que se han domesticado *Phaseolus vulgaris* L. (frijol común), *Phaseolus coccineus* L. (frijol ayocote), *Phaseolus lunatus* L. (frijol comba), *Phaseolus dumosus* (frijol gordo) y *Phaseolus acutifolius* Gray (frijol tepari). El estado de Hidalgo, tiene algunos genotipos nativos de frijol y en su mayoría se cultiva para autoconsumo. Las variedades del grano tienen diferentes colores, tamaños y formas. Los genotipos nativos, no están clasificados y reciben nombres locales como acerado, morita, conejito, canario, ojo de cabra, entre otros (Muñoz *et al.*, 2009).

El potencial comercial de las leguminosas en México (sea para consumo humano y/o forrajero), es muy grande y se ha explotado muy poco. Si además, se suma la capacidad que tiene como remediador de suelos, se puede considerar también como un producto mexicano de importancia social, económica y ambiental.

II.4. Rizósfera: Interacción suelo, planta y microorganismos

En biorremediación de suelos por fitorremediación, es importante conocer las interacciones microbianas en la rizósfera de las plantas. Este hábitat es la zona de mayor crecimiento microbiano y se llevan a cabo simbiosis y mutualismos entre bacterias y hongos, que son importantes para la recuperación del suelo (Franché *et al.*, 2009).

Cano (2011), refiere que en la rizósfera, se desarrollan microorganismos con funciones específicas. Hay fijadores de nitrógeno, solubilizadores de fosfatos, promotores del crecimiento vegetal, biocontroladores y especies patógenas; que normalmente, compiten por espacio y por nutrientes. Estas interrelaciones entre microorganismos inciden en la interacción suelo-planta-microorganismos-ambiente y repercuten de forma directa en el crecimiento y desarrollo de las especies vegetales.

La interacción de microorganismos rizosféricos, como hongos formadores de micorrizas arbusculares (AMF), hongos del género *Trichoderma* y bacterias del género *Pseudomonas*. Usualmente catalogados como agentes de control biológico (BCA) y microorganismos promotores del crecimiento vegetal (PGPM). Sin embargo, las interacciones entre los microorganismos son complejas y se pueden presentar tanto efectos sinérgicos que aumenten los beneficios para la planta o por el contrario, efectos antagónicos o simplemente que no ocurra ningún efecto (Haynes *et al.*, 2006).

A nivel de la rizósfera, existen componentes y condiciones físicas y químicas que influyen la diversidad microbiana. Por ejemplo, si el pH en la

rizósfera es mayor a 7, los microorganismos se clasifican como alcalófilos y son acidófilos si se adaptan a pH menores de 7. Esto infiere que una modificación al pH del suelo favorece a diferentes grupos microbianos. Los actinomicetos, proliferan al presentarse condiciones alcalinas. Los hongos, cambian su actividad dependiendo de las condiciones de pH y de su fuente de nitrógeno disponible en su microambiente (Maldonado *et al.*, 2010).

Los exudados radicales, son compuestos químicos que la planta segrega por la raíz. Influyen en la actividad microbiana, afectan la población de microorganismos en el suelo y en la planta. Los compuestos exudados pueden ser carbohidratos (glucosa, fructuosa, xilosa, maltosa), nucleótidos, flavonoides y enzimas. Además, hormonas vegetales, sustancias fluorescentes y estimuladoras del crecimiento. Estos exudados tienen diferentes funciones. El cuadro II.12, muestra algunos compuestos identificados en los exudados de diferentes plantas a nivel de la rizósfera y su función en la interacción tripartita.

Cuadro II.12. Exudados de la raíz de diferentes plantas y su función en la rizósfera del suelo.

Compuestos	Función	Planta
Carbohidratos: Glucosa Fructuosa Xilosa Maltosa	Fuente de carbono y energía.	Chícharo, trigo, fríjol, soya, sorgo, cebada, avena.
Sustancias promotoras del crecimiento: Biotina, tiamina (B ₁), factor M (coenzima M), Niacina, ácido fólico, rivo flavina, etc.	Biosíntesis de ácidos grasos; β -descarboxilaciones, fijación de CO ₂ , metabolismo del carbono, transferencia de grupos metilo, precursores de FMN, FAD en flavoproteínas implicadas en el transporte de electrones.	Lino, arroz, fríjol, trébol, maíz, chícharo, alfalfa, tomate, entre otros.
Ácidos orgánicos: tartárico, oxálico, cítrico, málico, acético, butírico, valérico, propiónico y fumárico.	Promotores de regulación y control del crecimiento y del metabolismo de la planta y los microorganismos.	Trigo, mostaza y sorgo.

Fuente: Fuentes y Ferrera, 2007.

En ciertas circunstancias, la población microbiana que se encuentra en la rizósfera, es sumamente mayor a la que se presenta en el suelo sin la presencia de la planta. Fuentes y Ferrera (2007), en el cuadro II.13, exponen una relación entre microorganismos del suelo de la rizósfera (R) y microorganismos del suelo que están fuera del establecimiento de la planta (S). Una relación entre R/S, indica la influencia de la raíz en la población microbiana.

Cuadro II.13. Grupos de microorganismos en suelo de la rizósfera de trigo y suelo sin planta.

Microorganismos	Suelo de la rizósfera (R).	Suelo sin influencia de la raíz (S)	R/S.
Bacterias	1200 x10 ⁶	56 x10 ⁶	22:1
Actinomicetos	46 x10 ⁶	7 x10 ⁶	7:1
Hongos	12 x10 ⁶	1 x10 ⁵	2:1
Protozoos	24 x10 ⁶	10 x10 ²	2:1

Fuente: Fuentes y Ferrera (2007).

Villareal (2006), comenta que para determinar la población de microorganismos indígenas en suelos en un sitio o zona de estudios, es necesario considerar tres aspectos:

- 1) La diversidad de los microorganismos, la interacciones entre ellos y con su hábitat;
- 2) La diversidad funcional, es la que estima el valor y la variedad de los rasgos adaptativos- funcionales que tienen influencia en los procesos del ecosistema;
- 3) la diversidad genética, que identifica porque los genes y el ADN del microorganismo tiene la capacidad de adaptarse, evolucionar o extinguirse de los ambientes.

En relación a la diversidad de microorganismos nativos en suelos, el cuadro II.14, describe algunas características de los dos grupos principales: bacterias y hongos.

Cuadro II.14. Principales grupos de microorganismos en la rizósfera.

Características	Bacterias	Hongos
Número (células /g suelo)	10^7 - 10^8 (viables) 10^{10} (viables pero no cultivables).	10^5 - 10^6
Biomasa	Las bacterias y actinomicetos tiene biomasa similar	Menor biomasa.
Grado de ramificación	Ligero.	Formas filamentosas extensivas
Micelio aéreo	Ausente	Presente
Crecimiento en cultivo liquido	Si- turbidez.	Si- bolas
Velocidad de crecimiento	Exponencial	Cubica
Pared celular	Muereína, ácido teicoico y lipopolisacarido.	Quitina celulosa
Cuerpos fructífero complejos	Ausente	Complejo
Competitividad con organismos simples	Más competitivo.	Intermediario
Fijación de nitrógeno	Si	No
Aerobias	Aerobias y anaerobias.	Aerobios excepto levaduras.
Estrés por humedad	Tolerancia mínima.	Mayor tolerante
pH optimo	6-8	6-8
pH competitivo	6-8	<5
Competitividad en suelos	Todos los suelos.	Dominante en suelos con pH bajo.

Fuente: Maier y Pepper, 2009.

Para Maier y Pepper (2009), el grupo de microorganismos representados en el Cuadro II.14, son los que dominan la superficie del suelo a nivel del horizonte A (rizósfera). Además, el número de especies presentes es elevado y se conocen solo una parte de ellas, debido a que la mayoría de los microorganismos son viables pero no cultivables.

Finalmente Barriuso, *et al.* (2008), comentan que las fuentes óptimas para el aislamiento de microorganismos en la rizósfera son las poblaciones silvestres o nativas de las plantas. Es complicado predecir los resultados de las interacciones entre plantas y microorganismos benéficos del suelo y más aún, entre las especies de microorganismos. No obstante, las comunidades microbianas asociadas con el sistema de raíces, se consideran clave en el desarrollo de prácticas agrícolas sostenibles.

II.5. Biorremediación por *Rhizobium* sp.

El *Rhizobium* sp., es una bacteria que pertenece a la familia de Rhizobiaceae (división proteobacteria), tiene forma de bacilos de 0.5-0.9 X 1.2-3 μm , con pared celular de bajo porcentaje peptidoglucano. Por lo general, contienen gránulos de poli-*B*-hidroxibutirato que refractan la luz con el microscopio de contraste de fases y pleomorfo en condiciones de crecimiento adversas. La tinción de células indica que son Gram negativas y que carece de esporas. La motilidad se produce por un flagelo polar o subpolar o bien de dos a seis flagelos peritricos (Mishra *et al.*, 2008).

La temperatura óptima de crecimiento de la bacteria es entre 25-30 ° C, con un pH óptimo de 6-7. En su mayoría las cepas de este género, producen polisacáridos extracelulares de consistencia gomosa y viscosa. Las colonias son circulares, convexas, semi translúcido, crece en relieve y es de aspecto mucilaginoso. Se desarrolla exponencialmente entre los 3-5 días en agar levadura manitol. En medio líquido (en caldo agitado), la biomasa es de aspecto lechoso (Krishnan y Benntt, 2007).

El *Rhizobium*, es un género que se encuentra asociado a los nódulos de las raíces de algunas leguminosas como el *Phaseolus vulgaris* L (frijol común). A esta asociación se le denomina simbiosis, la cual es altamente específica en fijar nitrógeno, distribuir y utilizar fuentes de carbono, nitrógeno y energía suministrada por la planta y el suelo en la rizósfera (Quinto *et al.*, 2007).

El género *Rhizobium*, es una bacteria simbiótica capaz de crecer y desarrollarse en suelo contaminados por plaguicidas. Es un género estudiado mayormente con fines agronómicos. Sin embargo, se ha utilizado como inoculante en mecanismos de remediación, debido a que algunas especies de *Rhizobium*, han logrado resistir y degradar sustancias tóxicas como dibenzotiofeno, dinitrotolueno, fenantreno, acenaftileno y herbicidas como la atrazina (González, 2010).

Las investigaciones de Bouquard *et al.* (1997), fue una de las primeras donde muestran que el género *Rhizobium sp.*, fue capaz de biodegradar 30 mg L⁻¹ de atrazina en 8 días. Con una remoción del 92%, además por técnicas moleculares postularon el mecanismo en la dechloración del herbicida.

Por ejemplo, Rai *et al.* (2004), reportaron que en la bioaumentación por *Rhizobium* a especies de *Prosopis juliflora* L., se mejoró significativamente la revegetación de vertederos de cenizas volantes, por enmiendas orgánicas. La bacteria incrementó nutrientes, suministro nitrógeno fijo y mayor disponibilidad de cantidades de Fe, Mn, Cu, Zn y Cr.

Las investigaciones de Smith *et al.* (2005), refieren que en la degradación de atrazina es factible utilizar un cultivo mixto de microorganismos nativos aislados del suelo contaminado. Mostraron por análisis molecular como la cepa de *Rhizobium sp.*, participa en la ruta de biodegradación del herbicida. Los metabolitos que forma (hidroxiatrazina y el N-etilamida) y los genes que participan (atzB y trzD), hasta la degradación de la molécula en ácido cianúrico y urea (Figura II.3).

Posteriormente Mnasri *et al.* (2007), en una investigación a nivel de laboratorio reportan que la inoculación de una cepa nativa de *Rhizobium gallicum* (10^8 UFC mL⁻¹), a la rizósfera de *Phaseolus vulgaris* L., aumento 90% la ocupación del nódulo en la planta, respecto al testigo. El trabajo demostró que cuando el inoculante es de cepas nativas, la bioaumentación es exitosa y mayor a los inoculantes comerciales o a los modificados genéticamente.

Recientemente Chaudhary *et al.* (2011), observaron que a los 10 días de inocular una cepa de *Rhizobium* ($2.6 -5.2 *10^8$ células ml⁻¹) a plantas de leguminosa *Vigna radiata* y *Vigna angularis* L., se incrementó el rendimiento de biomasa en la rizósfera, el contenido de proteína y la nodulación. También, reportaron aumento a la tolerancia y acumulación de metales como el Fe, Zn, Cd, Cu y Cr, en diferentes tejidos de la planta. Los resultados experimentales indican que la cepa de *Rhizobium* puede ser empleada para estimular beneficios ambientales y agrícolas.

En bioaumentación por *Rhizobium*, la revisión de literatura sugiere que primero se inocule directamente la bacteria al suelo y a continuación se

siembre la semilla de la planta. Pero también hay referencias que dictan lo contrario. En ambos casos, se han obtenido resultados muy satisfactorios.

Otra posibilidad para obtener simbiosis efectivas en la biorremediación, consiste en seleccionar las plantas a fin de reducir su especificidad simbiótica, lo que les permitirá asociarse con cepas nativas del suelo. La estrategia sugerida es que las cepas bacterianas sean nativas y cultivables, para que se ocupen de la remediación, sin afectar las poblaciones microbianas de la rizósfera que son beneficiosas para el agroecosistema.

II.6. Biorremediación por *Trichoderma* sp.

El *Trichoderma* es un hongo, que se ubica taxonómicamente en: Reino: Fungi; División: Mycota; Subdivisión: Eumycota; Clase: Hyphomycetes; Orden: Moniliales; Familia: Moniliaceae; y Género: *Trichoderma* (Schuster y Schmoll, 2010)

Las colonias de *Trichoderma* en su inicio tienen color blanco, que se tornan a verde oscuro o amarillento, con esporulación densa. El micelio es ralo en su mayoría, pero visto al microscopio es fino. Los conidióforos son ramificados que se presentan como penachos compactados formando anillos con un sistema de ramas irregular de manera piramidal. Estos terminan en fiálides, donde se forman las esporas asexuales o conidios de gran importancia para la identificación taxonómica a nivel de especies (Moran, 2008).

Los conidios, aseguran las generaciones del hongo durante gran parte del período vegetativo. Son haploides y su pared está compuesta por quitina y glucanos. Además de los conidióforos, estas se pueden producir sobre fiálides que emergen directamente del micelio. La mayoría de las especies de *Trichoderma* presentan clamidosporas, las cuales pueden ser intercalares y en ocasiones terminales. Las clamidosporas toleran condiciones ambientales adversas, son estructuras de sobrevivencia y permiten que el hongo pueda perdurar a través del tiempo (Schuster y Schmoll, 2010; Cano, 2011).

El hongo *Trichoderma*, se encuentran en suelos de todas las zonas climáticas del mundo. Se caracteriza por su rápido crecimiento, asimila una amplia gama de sustratos y genera compuestos antimicrobianos. Algunas cepas son explotadas como agentes de control biológico de patógenos, todo ello mediado por la producción de enzimas especializadas de degradación de pared celular, como: polisacaridasas, celulasas, xilanasas quitinasas, glucosas, entre otras (Rao *et al.*, 2009).

Las especies de *Trichoderma*, se caracterizan por ser hongos saprófitos, que sobreviven en suelos con diferentes cantidades de materia orgánica, pueden ser anaerobios facultativos, lo que les permite mostrar una mayor plasticidad ecológica. Esta plasticidad, se relaciona con la capacidad enzimática que poseen para degradar sustratos. De metabolismo versátil y resistencia a inhibidores microbianos (Matsubara *et al.*, 2005; Schuster y Schmoll, 2010).

Es un simbiote en plantas que habita en la rizósfera, donde compete, desarrolla co-metabolismo, mejora la raíz y lleva a cabo procesos de biorremediación. En esta última, se registra que puede llevar a cabo extracción, remoción y biodegradación de sustancias tóxicas y contaminantes (Tang *et al.*, 2009). Existen diferentes mecanismos enzimáticos, empleados por este género para degradar contaminantes orgánicos persistentes como son los plaguicidas y se analizan los mecanismos genéticos disponibles que expliquen su capacidad de biodegradación (Schuster y Schmoll, 2010).

Es un hongo oportunista, que resiste diferentes tipos de estrés abiótico y cambios en el estado nutricional. Puede regular, los niveles de auxina en la rizósfera y estimular el crecimiento de las plantas, proteger el sistema radical e induce la defensa sistémica frente al ataque de patógenos. Las principales ventajas del *Trichoderma* es la resistencia a concentraciones altas de contaminantes y a su capacidad para crecer a bajos valores de pH. Además, gracias a la extensión de sus hifas, puede alcanzar contaminantes o nutrientes en el suelo, que no son biodisponibles ni biodegradables para otros organismos.

Harman *et al.* (2004), refiere que al inocular plantas con *Trichoderma* se generan efectos positivos como:

- i) Control biológico de enfermedades en plantas causadas por patógenos en la raíz y foliares;
- ii) Inducción de resistencia sistémica en las plantas;
- iii) Cambios en la composición de la microflora de las raíces;
- iv) Mejora la absorción de nutrientes;

- v) Mejora de la solubilidad de los nutrientes del suelo;
- vi) Mayor desarrollo de las raíces y
- vii) Aumento en la formación de pelos radiculares y profundidad en el enraizamiento.

Cocaign *et al.* (2011), citan que especies del género *Trichoderma* son exitosos en biorremediación. Reportaron que Identificaron genes con la enzima nacetiltransferasa arilamina (NAT), en secuencias de su genoma; siendo esta enzima la responsable de metabolizar xenobióticos. En el mismo estudio, reportan al *Trichoderma virens* como responsable en la biotransformación de tres aminas aromáticas (concentración inicial de 250 μM): 90% en bencidina; 55% de 4-isopropilanilina y 42% de 3,4 dicloroanilina.

Maldonado *et al.*, 2010, refieren en su investigación de remediación de suelos contaminados por hidrocarburos totales de petróleo (HTP), que al combinar los mecanismos de fitorremediación (*Brachiaria mutica* y la leguminosa *leucaena (Leucocephala Lam)* y bioaumentación rizosférica por un consorcio microbiano (que incluyó al *Trichoderma* a razón de 40×10^5 UFC mL^{-1}), se alcanzó un 78% de remoción del hidrocarburo. De una concentración inicial de 50, 000 mg K^{-1} de TPH, en 158 días.

En una revisión realizada por Argumedo *et al.* (2009), describen el potencial de *Trichoderma*, como modelo biológico utilizado en biorremediación de sistemas terrestres y acuáticos. Idóneo para recuperar sitios contaminados por plaguicidas, compuestos organoclorados y compuestos organofosforados.

Especies de este género, son capaces de degradar a los plaguicidas organoclorados: DDT, el dieldrín y el endosulfán, que son persistentes en la naturaleza y presentan alta toxicidad. También, documentan que el *Trichoderma Viride* (*T. Viride*) contribuye en la degradación del herbicida triflurina (concentración inicial: 1 mg L⁻¹, 90 % de remoción en 10 días). A la especie de *T. harzianum* lo refieren con la habilidad de utilizar al insecticida organofosforado clorpirifós como fuente de azufre y de fósforo. Inclusive lo registran capaz de degradar glifosato y ácido aminometil fosfórico (Argumedo *et al.*, 2009).

Hoyos *et al.* (2009), identifican al hongo *Trichoderma* con la capacidad de solubilizar metales (manganeso, hierro y cobre), los cuales se ponen biodisponibles y asimilables para las plantas. Otro estudio realizado por Xiao *et al.*, 2011, refieren que para el insecticida heptacloro se han encontrado porcentajes de biodegradación entre 71 y 97% con diferentes hongos del género *Trichoderma*, siendo las reacciones de hidrólisis e hidroxilación las etapas de degradación hasta ahora dilucidadas.

De acuerdo a diferentes autores (Ma *et al.*, 2011; Sene *et al.*, 2010), el uso de *Trichoderma* en biorremediación, se considera sostenible para la recuperación del suelo. Sus mecanismos de degradación de plaguicidas como los herbicidas, son intracelulares, principalmente de origen reductivo y en menor proporción oxidativo. La exploración de los mecanismos del citocromo P450 y de las enzimas de degradación, que dirigen el mecanismo de expresión a nivel molecular, permitirá disponer de una nueva herramienta que brinda esté multifacético hongo.

Los reportes de biodegradación de atrazina por *Trichoderma*, está documentada en varias referencias (Smith *et al.*, 2005; Davidchik *et al.*, 2008; Quinto *et al.*, 2008; Gopinath y Sims, 2011; Ma *et al.*, 2011; Sene *et al.*, 2010 y Govantes *et al.*, 2009). Sin embargo, son escasos los informes sobre su remoción, con cepas de *Trichoderma* nativas rizosféricas (regularmente son cepas exógenas modificadas genéticamente). Aún más escasas son las investigaciones sobre su comportamiento y efectos en remediación de suelos contaminados por atrazina.

Sin embargo, la genómica de este género dicta su potencial biológico en biorremediación para reducir los impactos antropogénicos negativos en las diferentes actividades agrícolas, industriales y urbanas (Rey *et al.*, 2004; Schuster y Shmoll, 2010).

III. METODOLOGÍA

III.1. Localización: área de estudio

El área de estudio fueron zonas agrícolas del Valle de Tulancingo en el Estado de Hidalgo, México. Geográficamente, se localizaron tres suelos agrícolas dos de los suelos, se localizan en el municipio de Cuautepec de Hinojosa y uno en el municipio de Tulancingo de Bravo, ubicados en la región seis del Estado de Hidalgo, México (Figura III.1).



Figura III.1. Localización geográfica de los suelos agrícolas en la región seis del Estado que corresponde al valle de Tulancingo, Hidalgo, México.

Fuente: http://es.wikipedia.org/wiki/Estado_de_Hidalgo#Regiones_geogr.C3.A1ficas

De los suelos agrícolas localizados en el municipio de Cuautepec de Hinojosa, el primero denominado S_{CAP} , se localiza en la comunidad el Capulín, en latitud: $20^{\circ} 0' 23.27''N$, longitud: $98^{\circ} 14' 59.09''O$; el segundo

suelo (S_{TEP}), se ubica en localidad de Tepantitla, en latitud: $20^{\circ} 3' 2.90''N$ y longitud: $98^{\circ} 19' 16.54''O$.

El tercer suelo (S_{SAT}) en estudio, está representado en la localidad de Santana Hueytlalpan municipio de Tulancingo de Bravo, se encuentra en latitud: $20^{\circ} 10' 29.82''N$ y longitud: $98^{\circ} 16' 52.72''O$.

El área de estudio (suelos agrícolas), pertenece al valle de Tulancingo, con un polígono de coordenadas: $20^{\circ} 10' 29''$ latitud norte, $98^{\circ} 16' 52''$ longitud oeste; $19^{\circ} 57' 20''$ latitud norte y $98^{\circ} 15' 59''$ longitud oeste. Predomina un clima templado subhúmedo (Cw). La temperatura media anual es de $14.5^{\circ}C$, máximas de $30^{\circ}C$ en los meses de marzo a julio y de agosto a febrero las mínimas alcanzan hasta los $3^{\circ}C$. El régimen pluvial se puede presentar de marzo a septiembre con un mínimo de 33.3 mm h^{-1} y un máximo de 190.7 mm h^{-1} ; la media oscila entre 500-553 mm por año (Sistema Meteorológico Nacional, 2011; Estación Meteorológica Universitaria, 2009).

III.2. Muestreo, preparación y conservación de las muestras de suelo

La toma de muestra de los suelos en estudio se realizó en tres ocasiones. La profundidad del muestreo fue de 0-25 cm usando una barrena tubular (7 cm de diámetro), se consideró la variabilidad del suelo y no fue necesario la toma de muestra compuesta debido a la uniformidad de los suelos seleccionados (figura III.2).

En cada toma de muestra, se respetaron los procedimientos descritos en el método AS-01 de la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RECNAT-2000) para el transporte, conservación y métodos de análisis microbiológico, físico y químico del suelo.

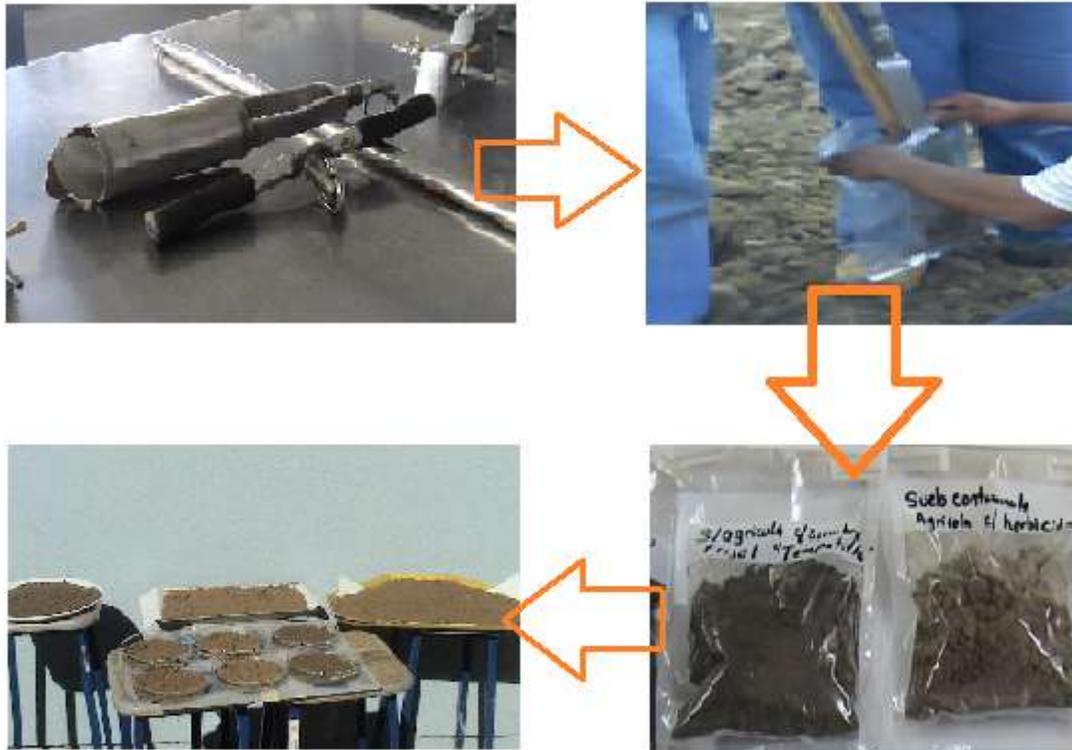


Figura III.2. Barrena tubular usada en la toma de muestra de los suelos.

El suelo para el análisis físico y químico se transportó en bolsas de polipapel de un kilogramo (kg) previamente etiquetada, posteriormente los suelos fueron secados al aire a temperatura ambiente (22-25°C), se cuartearon y tamizaron con un tamiz de malla 32 de 0.5 mm de apertura. Finalmente fueron almacenados en frascos de vidrio para su posterior análisis.

Las muestras del suelo para el análisis microbiológico, fue transportado en bolsas de plástico estéril (Nasco-whirl-pak®) etiquetadas, conservadas en refrigeración y procesadas el mismo día.

Para estimar la diversidad de microorganismos en cada suelo, se llevó un registro estadístico de la cuenta total de bacterias y hongos presentes en cada toma de muestra.

III.3. Métodos analíticos físicos y químicos en los suelos experimentales

En la caracterización del suelo, se determinaron propiedades físicas y químicas por las siguientes normas y métodos:

NOM-021-RECNAT- 2000	Determinación de textura en suelo (AS-09)
NOM-021-RECNAT- 2000	Densidad real por picnómetro (AS-04)
NOM-021-RECNAT- 2000	Humedad del suelo (método AS-05)
método Mehlich, 1948	Capacidad de intercambio catiónico
NOM-021-RECNAT- 2000	Medida de pH (AS-02)
NOM-021-RECNAT- 2000	Carbono orgánico y materia orgánica (AS-09)
método Kjeldahl, 1983	Nitrógeno total

III.3.1. Capacidad de campo

La capacidad de campo, se determinó por el método de la textura por los valores de proporción de arena, limo y arcilla. Se aplicó la ecuación 1, utilizando los coeficientes sugeridos.

$$\text{C.C.} = (\% \text{ arcilla}) a + (\% \text{ de limo}) b + (\% \text{ de arena}) c$$

(Ec.1)

Dónde: a, b, c: son los coeficientes que se determinan para cada región y tipo de suelo. Actualmente en México se utilizan los siguientes valores:

$$\text{C.C.} = (\% \text{ arcilla})(0.555) + (\% \text{ de limo})(0.187) + (\% \text{ de arena})(0.027)..(\text{Ec.2})$$

Se aplicó la ecuación 2, consecutivamente el valor resultante, se interpoló en el triángulo de textura (Anexo 1) y se obtuvo la capacidad de campo en los suelos (Cisneros, 2003).

III.3.2. Punto de marchitez permanente y humedad aprovechable

El punto de marchitez permanente, se determinó por la ecuación 3, utilizándose el valor de la capacidad de campo (CC):

consecutivamente por tres semanas a partir de la toma de muestra de los suelos.

III.4.2. Selección e Identificación de cepas

El criterio de selección e identificación de cepas nativas rizosféricas de bacterias y hongos, fue comparar el crecimiento de las siembras por suelo. Después del tiempo de incubación, se realizó un conteo de células viables, registrando tiempo de crecimiento, frecuencias y coincidencias por suelo.

Las pruebas macroscópicas discriminativas para bacterias aisladas en AES, fueron: aspecto de la colonia; elevación; forma; margen o borde y color. La identificación microscópica se realizó por tinción diferencial Gram.

En hongos, las características morfológicas de identificación de cepas fue color del talo; textura del talo; forma de crecimiento (longitudinal y radial); el número de colonias (individual, dos, tres, etc.); la apreciación de las hifas, aparición, forma y color de conidios.

Las cepas fúngicas se examinaron en micro cultivo por microscopía (método de Riddell, 1950), con el uso de microfotografías, tomadas por un microscopio Motic BA300, objetivos de campo claro y contraste de fase al que se acopló una cámara digital Moticom 480 (software Motic Imágenes Plus 2.0). Después se aplicó la técnica de tinción fija para micro cultivo con azul de lacto fenol (Flores y García, 1995).

La observación macroscópica tanto de hongos y bacterias se realizó en los primeros días de su aislamiento. En hongos su morfología cambia de acuerdo a su ciclo de vida.

Las cepas de microorganismos (hongos y bacterias) coincidentes, fueron purificadas por resiembras consecutivas (estría en superficie). Las bacterias en medio sólido de AES y las cepas de hongos por la técnica de punción de hifas, en PDA y se incubaron a las condiciones descritas anteriormente. Este procedimiento se repitió hasta la purificación de las cepas aisladas. Por último, las cepas puras se conservaron en tubo inclinado para su posterior identificación.

Para identificar el género de las cepas, primero se relacionó la descripción macroscópica y microscópica de cada una y después fueron realizadas las pruebas bioquímicas: ensayos API (bioMérieux®SA), catalasa, oxidasa, movilidad, citrato, urea, gelatina, almidón, entre otros.

En hongos, todas las cepas fueron examinadas en microcultivo por microscopía, usando microfotografías. Las imágenes se relacionaron con los resultados de la tinción azul de lactofenol, referencias bibliográficas y criterios morfológicos (Correa y Peñuela 2002; Barnett y Hunter, 2006).

III.4.3. Aislamiento e identificación de la cepa bacteriana:

Rhizobium sp.

La bacteria *Rhizobium* sp., fue aislada de nódulos de la planta de frijol. Se colectó por suelo experimental 30 plantas en etapa fenológica de

pre floración, se lavaron con abundante agua para retirar el suelo adherido y con pinza estéril se retiraron los nódulos adheridos a la raíz.

Los nódulos fueron clasificados por tamaños (grandes, medianos y chicos) y se colocaron en viales de 10 mL para su limpieza. Primero se lavaron con tres porciones consecutivas de agua estéril (se agrega perlas de vidrio), seguido de dos lavados de una solución al 0.2 % p/v de cloruro de mercurio (HgCl₂) y nuevamente dos lavados con agua estéril. Los nódulos desinfectados y secos, se machacaron para su observación en fresco al microscopio.

Para determinar la viabilidad y presencia de bacterias presentes en los nódulos, se tomó una asada de los nódulos machacados en fresco y se sembró en superficie, por estriado en placas con medio sólido de Agar Manitol-Extracto de Levadura (AML) con rojo congo (10 mL⁻¹ de una solución acuosa 1:400). Las cajas fueron incubadas a 27°C por 5 días. Al término del tiempo de incubación, se tomó por asa diferentes colonias formadas y se resembraron 4 veces más con el mismo procedimiento, para la purificación de las cepas (Figura III.3). Posteriormente, se sembraron en AML con azul de bromotimol a las mismas condiciones y a los crecimientos se les aplicó la prueba de tinción diferencial Gram.

A las cepas desarrolladas en AML, se les realizó pruebas bioquímicas por ensayos API (bioMérieux®SA): catalasa, oxidasa, movilidad, citrato, urea, gelatina, almidón, entre otros. Posteriormente, se compararon las descripciones macroscópica y microscópica con los resultados bioquímicos y se determinó que el género de la cepa aislada del nódulo de frijol fue

Rhizobium sp.



Figura III.3. Identificación del género *Rhizobium* sp., aislado de nódulos de frijol.

III.5. Bioensayos de resistencia por inhibición de crecimiento

La resistencia al herbicida atrazina, se determinó con ensayos de Crecimiento Inhibitorio (CI) a 15 cepas de bacterias (incluyendo al *Rhizobium* sp.), 7 cepas fúngicas y 3 géneros de hongos no identificados utilizando el método cualitativo de difusión en disco (Bauer *et al.*, 1966).

En cajas Petri con medios sólidos de PDA (hongos), AES (bacterias) y AML (*Rhizobium*). Se inocularon las cepas de los géneros identificados mediante la técnica de extensión por superficie. A cada cepa por triplicado, se les colocó discos de papel filtro estéril (0.5 cm de diámetro)

impregnados con 10 μL de solución del estándar de atrazina a diferentes concentraciones: 0, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 5000, 7500 y 10,000 mg L^{-1} (Figura III.4). Cada caja, con su repetición, se incubó en las condiciones previamente descritas para cada tipo de microorganismo. Terminado el tiempo de incubación, se midió la zona de inhibición presente en cada microorganismo.

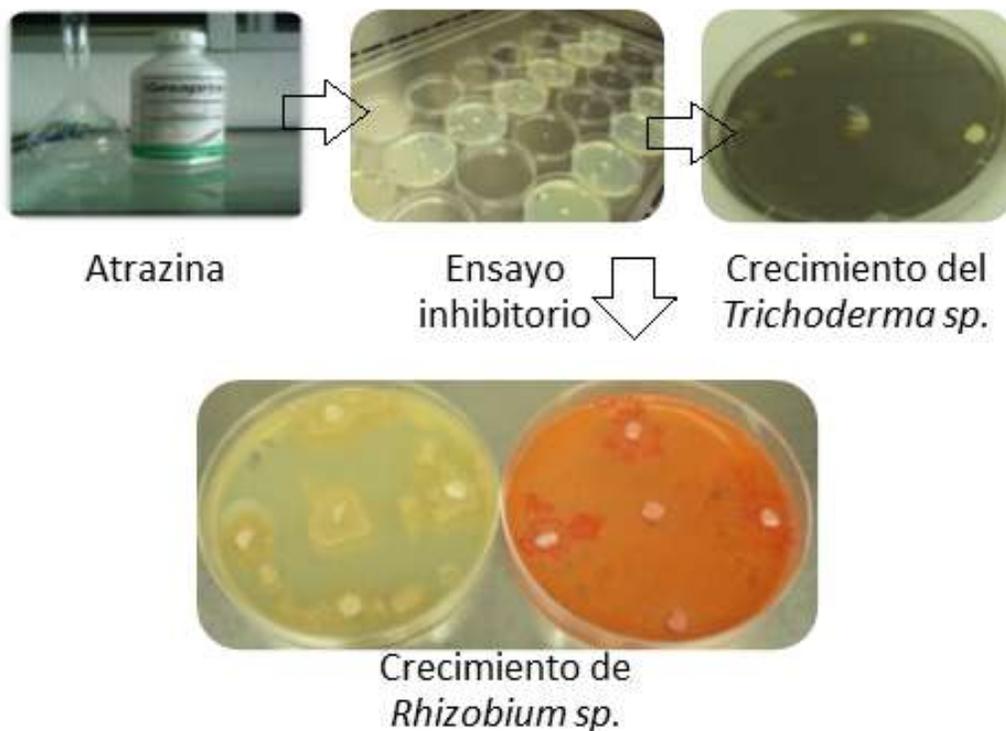


Figura III.4. Ensayo de resistencia de los microorganismos por Crecimiento Inhibitorio (CI).

El porcentaje de inhibición del crecimiento fúngico y bacteriano, se calculó mediante las ecuaciones 5 y 6:

—
(Ec.5)

(Ec.6)

Donde, \varnothing_{atz} representa el diámetro (mm) de crecimiento del microorganismo en los tratamientos expuestos a la atrazina en cada evaluación. \varnothing_b , es el diámetro de crecimiento del microorganismo control negativo en cada evaluación y % CI es el porcentaje de crecimiento inhibitorio.

La velocidad de crecimiento del microorganismo en la inhibición, se calculó con la siguiente ecuación:

—
(Ec.7)

Donde V es la velocidad de crecimiento, \varnothing_C representa el diámetro (mm) de crecimiento del microorganismo (mm) y t es el tiempo de incubación (días).

III.6. Producción de biomasa: *Rhizobium* sp., y *Trichoderma* sp.

***Rhizobium* sp.**

La biomasa del género bacteriano *Rhizobium* sp., se obtuvo por cultivo sumergido, en frasco de cultivo de 250 mL con rosca. Se agregó al frasco

50 mL de medio de Wright (1 L de agua: 0.2 g NaCl; 0.5 g K₂HPO₄; 0.3g MgSO₄·7H₂O; 0.1g CaCO₃; 0.1 g CaSO₄; 10 g Manitol; 0.2g Extracto de levadura), se inoculó con tres asadas de la cepa bacteriana pura y se incubó en una estufa con agitador orbital durante 8 días a 28°C y 150 rpm (Barntead, Lab-line).

La biomasa generada, se transfirió a tubos cónicos de 50 mL con tapón de rosca y se centrifugaron durante 10 minutos a 5000 rpm y 14°C. El sobrenadante, se decantó y la biomasa adherida al tubo se lavó con porciones de 5 mL de agua estéril y nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones. La biomasa de *Rhizobium* sp., fue conservada en frascos de vidrio estériles en refrigeración (Figura III.5).



Figura III.5. Obtención de la biomasa del *Rhizobium* sp., en cultivo sumergido.

Trichoderma sp.

La biomasa de *Trichoderma sp.*, se obtuvo en medio sólido utilizando cajas con medio sólido de PDA sin acidificar. Las cajas con el medio fueron inoculadas con la cepa pura del hongo por propagación (método de punta de hifa) e incubadas a temperatura ambiente a cinco días en oscuridad. Al término de la incubación, el micelio formado en las cajas se extrajo por raspado de la superficie de la placa y tres lavados consecutivos de 5 mL de agua estéril (Guigón *et al.*, 2010). La suspensión de conidios obtenidos, se conservó en frasco estéril en refrigeración (figura III.6). Por último, se cuantificó la viabilidad del inóculo mediante la concentración de esporas en cámara de Neubauer de 0.100 mm (Agamez *et al.*, 2008).



Figura III.6. Obtención de la biomasa del *Trichoderma sp.*, en medio sólido.

III.7. Cinética de crecimiento de *Rhizobium* sp., y *Trichoderma* sp.

En frascos para cultivo de 250 mL con tapón de rosca, se colocó 100g de suelo previamente esterilizado y saturado a capacidad de campo con una solución de atrazina a 100 ppm (Gesaprim 50FW®). Se inocularon 20 frascos con 10 mL de la suspensión de cepas de *Rhizobium* sp., (1×10^8 UFC mL⁻¹ de células viables) y 20 frascos con la suspensión de la cepa de *Trichoderma* sp. (1×10^4 - 1×10^5 conidios mL⁻¹ de solución del micelio). Los frascos fueron almacenados a temperatura ambiente por 15 días. Al primer día de incubación (tiempo 0) y a los 5, 10 y 15 días, se les realizó cuenta total (NOM-112-SSA1-1994) del hongo y la bacteria. Al mismo, se trabajó un blanco (suelo estéril sin atrazina) y un testigo (suelo no estéril, con atrazina), en las mismas condiciones que los microorganismos en estudio.

III.8. Biorremediación de suelo contaminado por atrazina

III.8.1. Bioaumentación en laboratorio

A nivel laboratorio, se utilizó suelo de la localidad de Tepantitla (sin aplicación de plaguicidas), el cual fue secado al aire libre y tamizado en malla 10. Se preparó una mezcla homogénea con el suelo y Agrolita® perlita en proporción 80/20 v/v. En frascos de cultivo con rosca de 250 mL, se colocaron 50 g de la mezcla de suelo y se esterilizaron a 110°C por 45 minutos, 3 días consecutivos. Los frascos con suelo estéril, se saturaron a capacidad de campo de una solución de 500 ppm de atrazina grado técnico (Gesaprim 50FW®).

Se trabajó con cinco unidades experimentales y cinco repeticiones, ordenados de la siguiente forma:

- 1) suelo estéril + atrazina + *Rhizobium* sp.
- 2) Suelo estéril + atrazina + *Trichoderma* sp.
- 3) Suelo estéril + atrazina + mezcla *Rhizobium-Trichoderma*
- 4) Suelo estéril + atrazina (blanco)
- 5) suelo no estéril + atrazina (Testigo)

Cada frasco con sus tres repeticiones fue inoculado con 10 mL de la suspensión del microorganismo (1×10^4 - 1×10^5 UFC mL⁻¹ de *Trichoderma* sp. y 1×10^6 UFC mL⁻¹ de *Rhizobium* sp.) y almacenados por 40 días en condiciones de invernadero. El tratamiento se analizó a los 0, 5, 10, 20 y 40 días. En cada periodo de tiempo, el suelo fue secado al aire libre, tamizado (malla 32 de 0.5 mm de apertura) y se conservó en bolsas de plástico para la extracción del herbicida.

III.8.2. Fitorremediación y bioaumentación en invernadero

Se trabajó en invernadero en un área de 4x4 m², con piso alfombrado, ventilación mecánica por cortinas laterales, adaptado con malla antiafidos y malla sombra de monofilamento al 80% (Figura III.7).

La semilla de frijol se limpió de impurezas. Los granos de semilla, fueron seleccionados con características similares: color, tamaño, aspecto brillante, forma y sin lesiones físicas externas.

Para desinfectar la semilla, se lavó con agua corriente por tres minutos, después se colocó en un frasco con rosca de 250 mL cubriendo toda la semilla con una solución de 1:1000 de cloruro de mercurio (HgCl_2) por cinco minutos. Enseguida, se lavó la semilla con cinco porciones de agua estéril y finalmente se dejó secar sobre papel filtro estéril en campana de flujo laminar.

La germinación de la semilla, se realizó en cajas Petri con medio sólido de Wright (1 Litro de agua: 0.2 g NaCl; 0.5 g K_2HPO_4 ; 0.3g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; 0.1g CaCO_3 ; 0.1 g CaSO_4 ; 10 g Manitol; 0.2g Extracto de levadura; 15 g de Agar-Agar), se colocaron tres semillas por caja y se incubaron a 25 °C por 4 días.

Se utilizó como maceta, bolsa plástica negra de 35x35 cm, con 4.5 kg de suelo estéril (70 unidades experimentales, con el mismo manejo descrito a nivel laboratorio), saturado a capacidad de campo con soluciones de atrazina grado técnico (Gesaprim 50FW®) a dos concentraciones diferentes: 1000 mg L^{-1} (16.6 mg 50 g^{-1} de suelo) y 2000 mg L^{-1} (33.3 mg 50 g^{-1} de suelo).



Figura III.7. Condiciones y materiales utilizados en el experimento en invernadero.

En ambas concentraciones, se trabajó con 35 unidades experimentales, siete tratamientos, cinco repeticiones y el siguiente arreglo de tratamientos:

- 1) Suelo estéril + frijol + *Rhizobium* sp. + atrazina
- 2) Suelo estéril + frijol + *Trichoderma* sp.+ atrazina
- 3) Suelo estéril + frijol + *Rhizobium* sp. + *Trichoderma* sp. + atrazina
- 4) Suelo estéril + frijol + atrazina
- 5) Suelo estéril + atrazina (Blanco)
- 6) Suelo no estéril + atrazina (testigo)
- 7) Suelo no estéril + frijol (testigo de la planta)

En los tratamientos de suelo contaminado a 1000 mg L^{-1} de atrazina, las semillas (pre-germinadas) se plantaron (tres por maceta) al mismo tiempo

que se inocularon las macetas con los microorganismos correspondientes: 33 mL de biomasa del *Rhizobium* sp. (Viabilidad de 1×10^6 UFC mL⁻¹) y 48 ml de la cepa del *Trichoderma* (1×10^4 - 1×10^5 conidios mL⁻¹).

Por otra parte, en los tratamientos con suelo contaminado a 2000 mg L⁻¹ del herbicida, la siembra de la semilla fue 5 días antes de la inoculación de los microorganismos (se trabajó con la misma cantidad de semilla y de inóculo).

Las unidades experimentales a 1000 ppm, se trabajaron por 30 días y las de 2000 ppm a 40 días, tiempo en el cual, se registró la temperatura y humedad relativa en el invernadero con un hidrómetro digital (EXTECH, modelo 445713, figura III.7).

Al término de cada tratamiento, la planta de frijol con su raíz fue retirada de la maceta y colocada en bolsa de papel previamente etiquetada. El suelo de cada unidad experimental, fue secado al aire libre, se homogenizó, tamizó (mismo procedimiento antes descrito) y guardó en bolsas plásticas. De igual forma, la planta ya seca, se trituro y molió en mortero para su posterior análisis (Figura III.8).



Figura III.8. Tratamiento en maceta en invernadero: Toma y preparación de las muestras.

III.9. Extracción y cuantificación de atrazina

El proceso se realizó adaptando lo propuesto por Fragoeiro y Magan (2005).

En tubos cónicos de 50 mL con rosca, se colocaron 5 g de suelo seco y homogenizado, 10 mL de metanol y se agitó orbitalmente a 300 rpm durante 24 h en oscuridad. Al término del tiempo agitación, los tubos se centrifugaron 10 min, 5000 rpm a 14 °C; se filtró el sobrenadante y se colectó en viales de vidrio de 10 mL. El metanol, se evaporó a sequedad a 25°C dentro de una campana de extracción de gases (se colocó piedra volcánica para regular la evaporación) y el residuo fue re suspendido en 5 mL de acetonitrilo grado HPLC (Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución). Finalmente, las muestras se filtraron por una membrana

(Millipore-Nylon®) de 0.45 micras y el líquido filtrado, se recolectó en viales para su análisis por HPLC (Figura III.9).



Figura III.9. Extracción de atrazina en muestras de suelo y planta.

En el análisis de la planta, se utilizó el mismo procedimiento ya descrito. La variante consistió en hacer pasar la muestra por otro filtrado en jeringa, con 1 ml de silica gel, realizando 2 lavados de 5 ml con metanol como eluyente. El filtrado se evaporó hasta sequedad, el residuo se re-suspende en 5 mL de acetonitrilo (grado HPLC) y se pasó por un filtro por una membrana (Millipore-Nylon®) de 0.45 micras (Figura III.9).

Las muestras filtradas tanto de la planta como del suelo, fueron analizadas con un equipo de HPLC Agilent 1200®, serie infinity, detector de arreglo de diodos con una columna Poroshell® 120 EC-C18 4.6 x 50mm 2.7

micron. La condición cromatografía inició en fase móvil 70/30 agua/acetonitrilo (v/v), a un flujo de 0.5 mL min^{-1} e inyección de muestra de 10 microlitros. El tiempo de retención, fue de 2.84 minutos para atrazina con límite de detección de 1 ng mL^{-1} . Las soluciones de trabajo para realizar la curva de calibración de atrazina fueron: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 mg mL^{-1} ; que prepararon a partir de la solución stock de 1 mg mL^{-1} (estándar de atrazina 98%, reactivo analítico) por dilución con acetonitrilo grado HPLC (Figura III.10).



Figura III.10. Cuantificación de atrazina por HPLC. Agilent 1200®, serie infinity.

Los valores obtenidos en HPLC, se ajustaron a la ecuación 8 de la curva estándar:

(Ec.

8)

$$R^2 = 0.987$$

De esta ecuación, se obtuvo la masa retenida de atrazina (**X**), tanto en planta como en suelo. Siendo el balance de masa global para la atrazina en el ensayo:

$$M_{\text{-entrada}} = M_{\text{-retenida}} + M_{\text{-degradada}} \quad (\text{Ec.9})$$

Donde:

M= masa de atrazina,

De la ecuación 10, se estimó los miligramos de atrazina degradada:

$$M_{\text{-degradada}} = M_{\text{-entrada}} - M_{\text{-retenida}} \quad (\text{Ec.10})$$

III.10. Análisis estadístico

El diseño experimental en la caracterización física y química de los suelos, fue completamente al azar. Los tres muestreos tuvieron tres repeticiones. Los datos obtenidos fueron analizados mediante análisis de varianza y la prueba de comparación de medias simple (Tukey: $\alpha=0.05$).

La biodegradación de atrazina en laboratorio, fue un diseño completamente al azar. Los valores obtenidos de los siete tratamientos y sus tres repeticiones se analizaron por análisis de varianza de un solo factor y la prueba de comparación de medias simple por Tukey: $\alpha=0.05$.

El análisis estadístico de todos los datos obtenidos fueron realizados con el programa estadístico Number Cruncher Statistical System (NCSS), versión 2007 y las gráficas en Sygma Plot, versión 11 (2009).

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV. 1. Parámetros físicos y químicos de las muestras de suelo

Los valores de los parámetros físicos y químicos encontrados en las muestras de suelo recolectada en los tres sitios de estudio se reportan en el cuadro IV.1. El pH de acuerdo a la NOM-021-RENACT-2000, está clasificado como moderadamente ácido para dos de los sitios (Capulín y Santana) y neutro para el suelo de Tepantitla. En estos intervalos los nutrimentos son más disponibles, así como los contaminantes en la solución del suelo (Rinnan *et al.*, 2007). A estos intervalos de pH los microorganismos rizosféricos como bacterias y hongos pueden crecer, sin que su población se afecte significativamente.

Cuadro IV.1. Comparación de medias de las propiedades físicas y químicas de los suelos estudiados.

	Suelos agrícolas del Valle de Tulancingo Hidalgo, México			
	Capulín	Tepantitla	Santana	Error Estándar
% Humedad	14.89 _a	15.86 _a	15.20 _b	0.20
pH (1:2 en agua)	6.35 _a	6.69 _a	5.78 _b	0.12
%Nitrógeno Total	0.18 _a	0.24 _b	0.30 _c	0.0094
%Carbono Orgánico	2.86 _a	3.36 _b	4.08 _c	0.012
% Materia Orgánica	4.94 _a	5.79 _b	4.04 _c	0.0086
CIC (Cmol(+)kg ⁻¹)	29.34 _a	59.63 _b	25.46 _c	3.63
Densidad real (g cm ⁻³)	2.38 _a	2.43 _a	2.29 _a	0.11
Textura	Franco arenoso	Franco	Franco	

Para cada línea letras distintas indican diferencia significativa (con $\alpha=0.05$, Tukey)

El nitrógeno total en suelo resultó con valores diferentes para cada sitio en estudio. En la Norma Oficial Mexicana (NOM-021-RENACT-2000), están clasificados en intervalos de alto (0.15-0.25 %) y muy alto (> 0.25).

En relación al contenido de materia orgánica (MO) y carbono orgánico (CO), la norma señala que valores de MO entre 4.1-6.0%, indican un bajo contenido de fertilidad. Contrariamente, para Rodríguez y Rodríguez (2002) la cantidad de materia orgánica y carbono orgánico en clasificación agronómica es alto y muy alto (>3.5%).

Por último, en función de la textura (proporción de las partículas del suelo: Arcilla, Limo y Arena) se clasifican como franco y franco arenoso (NOM-021-RENACT-2000). El suelo que resultó de textura gruesa fue el suelo del Capulín. La principal característica de los suelos franco arenoso, es su baja capacidad para retener nutrimentos y agua.

Los suelos de Santana y Tepantitla, resultaron de textura media por ser franco y son suelos ideales para la producción agrícola, por su amplia capacidad productiva y disponibilidad de agua. Estos suelos podrían considerarse del tipo versitol, por su alta capacidad de intercambio catiónico la cual varía en el rango de 20 a 45 cmol kg⁻¹ (cuadro IV.1).

Las pruebas de comparación de medias (Tukey 0.05) en las propiedades físicas y químicas, mostraron que hay diferencias significativas en el suelo de Santana, en relación a los otros dos suelos. Además, se debe considerar que clasificar estas propiedades no solo son importantes en la génesis y

fertilidad del suelo, también inciden en la capacidad de retención, adsorción y degradación de la atrazina en el suelo (Bridges *et al.* 2008; Raymundo *et al.* 2009).

Con observaciones de las referencias bibliográficas (Monard *et al.*, 2008) y los datos experimentados, se estima que los tres sitios están en intervalos de fertilidad agrícola, pero el suelo de Santana por ser una zona agrícola intensiva (uso de fitosanitarios), podría ser vulnerable a deterioro e impactos ambientales negativos a corto plazo.

Las propiedades de la mezcla de suelo utilizada, en los ensayos en laboratorio (matraz) e invernadero (maceta), se pueden observar en el cuadro IV.2. En él, se observa un incremento mínimo en el pH después de los tratamientos (4.9%), pero considerando la NOM-021-RENACT-2000, esté valor es neutro. El contenido de carbono orgánico y materia orgánica, aumentó a 13.69 % y 13.81 % respectivamente y están dentro del mismo intervalo que el suelo de origen (Tepantitla).

Cuadro IV.2. Propiedades físicas y químicas de la mezcla de suelo.

Parámetro	Suelo Tepantitla	Mezcla de suelo (80:20 v/v), después de los tratamientos
pH (1:2 en agua)	6.69	7.02
% Carbono orgánico	3.36	3.82
% Materia orgánica	5.79	6.59
% Humedad	15.86	34.67
Densidad aparente	1.32	*ND
% Arena	50.2	ND
% Limo	24.9	ND
% Arcilla	24.9	ND

*ND: No Determinada.

El contenido de humedad de la mezcla de suelo es superior al suelo de origen, aumentó a 118.6 %. Esto puede deberse a la Agrolita® utilizada en la mezcla, debido a que es un material inerte que eleva la capacidad de retención de agua disponible. Por otro lado, los valores del cuadro IV.2 son similares a lo reportado por Dehghani *et al.* (2013), para remediación de suelos contaminados por atrazina con clase textural franco a excepción de la materia orgánica, donde el valor es menor en 2.2 unidades.

Los parámetros de humedad en la mezcla de suelo, se engloban en el cuadro IV.3. En aspectos de control agrícola, los datos indican que hay disponibilidad de agua presente en el suelo y se puede hacer un uso óptimo del recurso hídrico para la planta.

Cuadro IV.3. Parámetros de humedad en la mezcla de suelo.

Parámetro	Promedio
Capacidad de campo	19.83 %
Punto de marchitez permanente	11.69 %
Humedad aprovechable	8.14 %
Profundidad de la raíz en la maceta	20 cm

El valor de la capacidad de campo, está en los intervalos referenciados a la clase textural del suelo original (Tepantitla). El punto de marchitez permanente, fue cuatro puntos porcentuales mayores y la humedad aprovechable tres puntos menos a lo reportado para suelos de textura franco. En ambos casos la adición de agrolita influye en los parámetros de humedad de la mezcla.

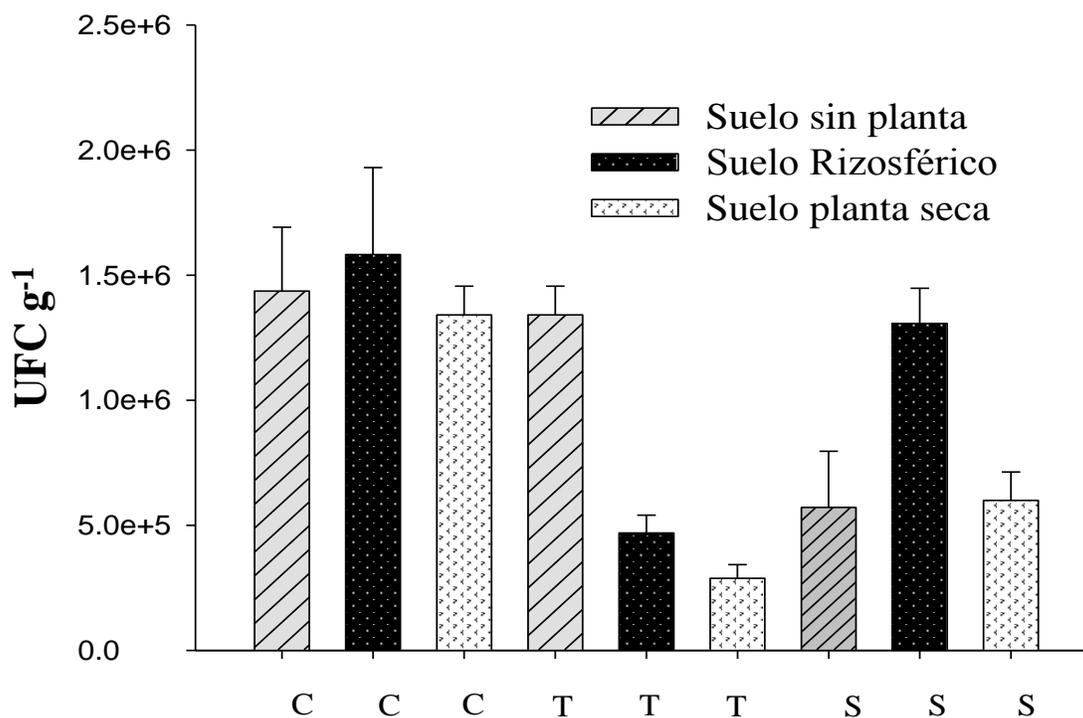
En síntesis, los requerimientos edafológicos de la mezcla de suelo están en intervalos reportados para biorremediación de suelos con mecanismos de fitorremediación y bioaumentación (Cisneros 2003; Monard *et al.*, 2008; Smith *et al.*, 2005; Aceves *et al.*, 2008; Raymundo, 2008).

IV. 2. Diversidad de microorganismos en la rizósfera del *Phaseolus vulgaris* L.

IV.2.1. Cuantificación de bacterias y hongos en la rizósfera

En la figura IV.1, se muestran los resultados del conteo total de bacterias en los tres sitios por condición de suelo. Se obtuvo un intervalo de 1.09×10^5 – 1.5×10^6 UFC g⁻¹ de suelo. En los suelos rizosféricos se encontró mayor población bacteriana y los de menor población fueron los no rizosféricos.

La población bacteriana en el suelo de santana (en las tres condiciones del sitio), está en los mismos intervalos de los suelos considerados como no perturbados por la aplicación de atrazina. La cuenta total de bacterias, es similar a lo reportado por Sangabriel *et al.* (2006), donde suelos a nivel de rizósfera (con cultivo de *Phaseolus coccineus* a dos condiciones de suelo: contaminado con combustóleo y sin contaminar) reportan 1.7×10^6 UFC g⁻¹ de suelo de bacterias totales y observaron incremento en la población de bacterias, después del proceso de fitorremediación por *Phaseolus coccineus*.



Condición de suelo por sitio experimental

Figura IV.1. Cuenta total de bacterias aerobias (UFC g⁻¹) de los tres suelos agrícolas del Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Donde C es el suelo de El Capulín, T de Tepantitla y el suelo S de Santana.

Otras referencias, como la de Maier y Pepper (2009); Calvo *et al.* (2008); Córdova *et al.* (2009); Ferrera *et al.* (2007), citan poblaciones de 10⁵ a 10⁶ UFC g⁻¹ suelo, de bacterias totales en suelos rizosféricos en cultivos de leguminosas para procesos de biorremediación. Comparativamente, los resultados experimentales están dentro de los estimados por estos autores independientemente de la condición del sitio, régimen hídrico, localización geográfica y clase textural.

En relación a los hongos, se observó que la cantidad poblacional (cuenta total) en los suelos en estudio es también mayor en la zona de la rizósfera, en una relación rizósfera/suelo (R/S) de 2:1, en los tres sitios (Figura IV.2): Capulín (C), Tepantitla (T) y Santana (S).

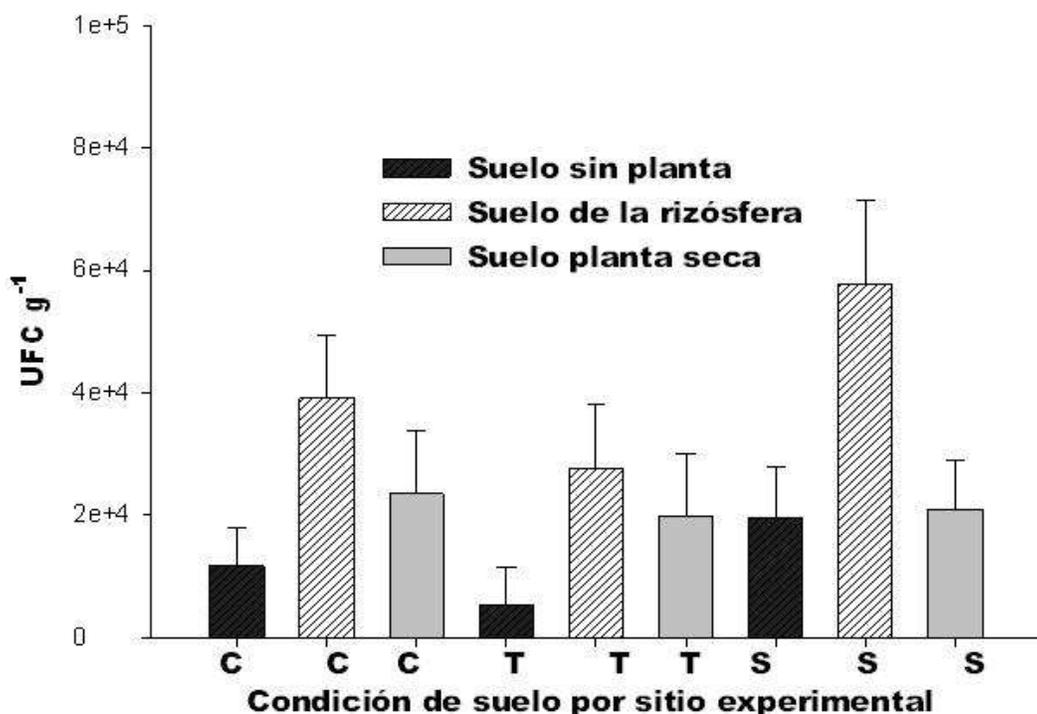


Figura IV.2. Cuenta total de hongos (UFC g⁻¹) de los tres suelos agrícolas del Valle de Tulancingo, Hidalgo, México. Donde C es el suelo de El Capulín, T de Tepantitla y el suelo S de Santana.

La proporción de conidios por gramo de suelo (UFC g⁻¹), se encuentran dentro del rango estimado por Maier y Pepper (2009), siendo está de 10⁵ a 10⁶ UFC g⁻¹ en suelo rizosférico. Calvo *et al.* (2008) y Córdova *et al.* (2009), reportan intervalos de 10³ UFC g⁻¹ de suelo, menores a los encontrados en suelos no rizosféricos en la zona en estudio.

Inclusive, los dos los suelos agrícolas (Capulín y Tepantitla) en régimen hídrico de temporal y sin fertilización inducida, presentaron valores recomendables. Lo que refiere que la diversidad y cantidad de géneros fúngicos reportados son rangos apropiados.

IV.2.2. Selección e Identificación de cepas bacterianas y fúngicas

Las cepas de hongos y bacterias seleccionadas, se aislaron de los suelos rizosféricos de Santana al considerar lo planteado por Robinson (1996), quien relaciona la resistencia genética de los microorganismos de sistemas silvestres con su capacidad de autorregularse y adaptarse a medios contaminados. Los cuadros IV.4 y IV.5, resumen las pruebas realizadas a las cepas de bacterias identificadas a nivel de género.

Cuadro IV.4. Resultados de las observaciones macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas de los géneros bacterianos aislados (parte I).

Género				
	<i>Sphingomonas</i> sp	<i>Micrococcus</i> sp	<i>Serrantia</i> sp	<i>Bacillus</i> sp
Descripción Macroscópica				
	Colonia circular, convexa, margen entire, color naranja	Colonia circular, plana, margen entire, color amarillo, aspecto viscosa	Colonia circular, elevación convexa, margen entire, color: rojiza-café, aspecto viscoso	Colonias de forma circular, en domo margen entire, cremosa, color beige opaco
Descripción Microscópica				
	Bacilos gram -	Cocos gram positivo	Bacilos gram negativo	Bacilos gram negativo
Ensayos bioquímicos				
Movilidad	+	++	+	+
Catalasa	+	+	+	+
Oxidasa	+	-	-	NA
N₀₃	negativo	NA*	+	NA
Triptófano	negativo	NA		NA
O-F de la glucosa	Oxidativo	NA	F	NA
Glucosa	negativo	Positivo	+	NA
Lactosa	NA	+	-	-
Urea	negativo	-	NA	+
Xilosa	NA	+	NA	+
Gelatina	positivo	+	NA	+
Manosa	negativo	+	NA	+
Manitol	negativo	+	+	NA
Maltosa	negativo	+	NA	+
Citrato	negativo	-	NA	-
Almidón	NA	NA	NA	-

*NA = No Aplica.

IV.2.2.1. Identificación de *Rhizobium* sp., aislado de los nódulos de la planta de frijol

Las características fenológicas de la planta de frijol donde se extrajeron los nódulos para aislar la bacteria (*Rhizobium* sp.), resultaron con una media de 3.2 nudos, 3.8 inflorescencias y 11.47 cm de longitud de la raíz del total de plantas seleccionadas. Respecto a los nódulos extraídos por planta promediaron 23 nódulos por raíz periférica de aspecto rosado, tamaños diferentes, diámetro de 0.34 cm y un volumen de 0.10 mL (en vial cónico de 1 mL).

Se encontraron similitudes en las características de la planta y nódulos con lo reportado por Mora *et al.* (2007), sobre efectividad de cepas de *Rhizobium* en diferentes variedades de frijol. Se observó que están dentro del rango de algunas variedades de frijol. Sin embargo, en variedades mejoradas de frijol se reportan cantidades mayores. No obstante, estos autores en el mismo informe, señalan que la efectividad de las cepas no fue significativo en relación a las características fenológicas de las variedades de frijol estudiadas.

La observación al microscopio (figura IV.3) de los nódulos de frijol en fresco, revelaron la existencia de organismos vivos en forma de bacilos de color beige translúcidos y de consistencia mucilaginosa. La longitud del bacilo promedio 109.85 μ m y su tinción en fresco resultó Gram negativo.



Figura IV.3. Nódulo de frijol, en fresco. Se aprecian organismos en forma de bacilos, con una longitud de 109.85 UM.

En la comparación de pruebas bioquímicas y características morfológicas, resultó que la cepa aislada del nódulo de frijol es el género bacteriano *Rhizobium* sp. (cuadro IV. 5, parte II). Resultados similares fueron reportaron por Acosta y Martínez, 2002; Richardson *et al.*, 2004 y Santana, 2007. En estos informes, las cepas de *Rhizobium* se aislaron de nódulos de leguminosas de suelos contaminados por plaguicidas.

Cuadro IV.5. Resultados de las observaciones macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas de los géneros bacterianos aislados (parte II).

Género				
	<i>Erwinia</i> sp.	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Agrobacterium</i> sp.
Descripción Macroscópica				
	Colonia puntiforme, convexa, margen entire, color amarillo claro de aspecto fino	Colonia circular o convexa, borde entire color blanco-beig, semitranslucido aspecto mucilaginoso	Colonia de forma circular, lisa, plana, margen wavy, cremosa, color amarilla brillante	Colonia circular crecimiento elevado, margen labed, color Blanco-beige y viscosa
Descripción Microscopica				
	Bacilos gram negativo	Bacilos gramnegativos	Coco gram positivo	Bacilos gram negativos
Ensayos bioquímicos				
Movilidad	+	+	+	+
Catalasa	-	+	-	+
Oxidasa	NA*	+	NA	+
N0₃	NA	NA	NA	-
Triptófano	NA	+	NA	
O-F de la glucosa	NA	Oxidativo	NA	F
Glucosa	-	-	NA	Positivo
Lactosa	+	+	+	NA
Urea	NA	NA	+	+
Xilosa	NA	NA	+	+
Gelatina	-	NA	+	NA
Manosa	NA	NA	+	A
Manitol	NA	+	+	NA
Maltosa	NA	+	+	NA
Citrato	NA	NA	+	NA
Almidón	NA	NA	-	NA
Medio YMA (azul de bromo timol)	NA	+	NA	-
Test: Hug yleftson	NA	Oxidativo	NA	-

*NA = No Aplica.

Otros resultados similares reportados por: Smith *et al.*, 2005; So y Kyung, 2009; Vásquez *et al.*, 2010; Maldonado *et al.*, 2010; refieren a los géneros de *Sphingomonas* sp.; *Micrococcus* sp.; *Serrantia* sp.; *Bacillus* sp.; *Rhizobium* sp. y *Agrobacterium* sp., como bacterias aisladas del suelo con capacidad de biodegradar contaminantes orgánicos incluyendo al herbicida atrazina.

En las pruebas descriptivas macro, microscópicas y bioquímicas se identificó ocho géneros de bacterias (*Sphingomonas* sp. *Micrococcus* sp. *Serrantia* sp. *Bacillus* sp. *Erwinia* sp. *Rhizobium* sp. *Pediococcus* sp. y *Agrobacterium* sp.). De hongos, se identificó 7 géneros (23 posibles especies) registrados de la siguiente manera: *Alternaria* (uno), *Mucor* (dos), *Clandosporium* (uno), *Fusarium* (tres), *Aspergillus* (uno), *Penicillium* (siete) de *Trichoderma* (cinco) y tres cepas fúngicas no identificadas (Cuadro IV.6).

Capítulo IV: Resultados y discusión

Cuadro IV.6. Diversidad de microorganismos aislados e identificados por condición de suelo.

Género	Suelo sin planta			Suelo de la rizósfera			Suelo con planta seca		
	T	C	S	T	C	S	T	C	S
<i>Sphingomonas</i> sp.	+	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Micrococcus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Serratia</i> sp.	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>Bacillus</i> sp	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Erwinia</i> sp	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhizobium</i> sp	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Pediococcus</i> sp	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Agrobacterium</i> sp	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>Alternaria</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mucor</i> sp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Mucor</i> sp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Clandosporium</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Fusarium</i> sp. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Aspergillus</i> sp.	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Penicillium</i> sp. 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Trichoderma</i> 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No identificada 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No identificada 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
No identificada 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+

Otro punto a resaltar en el cuadro IV.6, refiere que los microorganismos identificados (bacterias y hongos) son rizosféricos, nativos, viables y

cultivables de la planta de frijol que se cultiva en el valle de Tulancingo, Hidalgo, México.

La frecuencia de los microorganismos identificados por condición de suelo, se muestran en la figura IV.4, se destacan los géneros fúngicos y las bacterias *Micrococcus* sp. y *Bacillus* sp., por encontrarse en los tres suelos y en las tres condiciones de muestreo. De esta circunstancia, se deduce que los hongos identificados son autóctonos y persisten a diferentes condiciones del ciclo agrícola de los suelos.

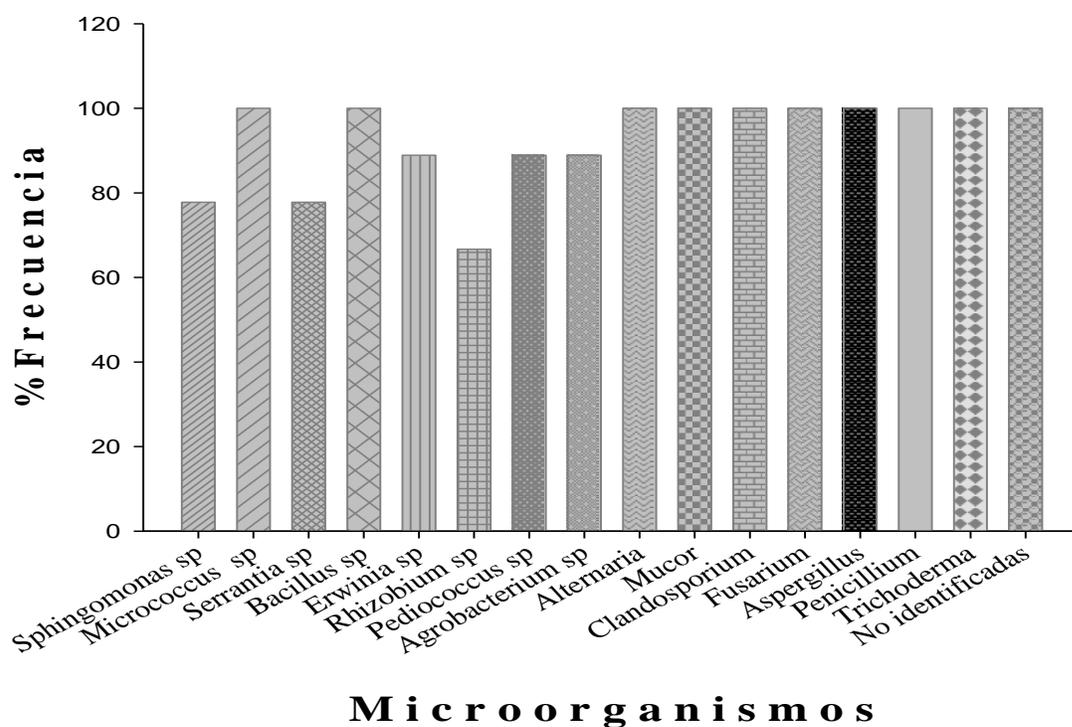


Figura IV.4. Frecuencia (%) de géneros de bacterias y hongos identificados por condición de suelo.

La bacteria de *Rhizobium* sp., presenta menor frecuencia, solo fue identificada en suelo rizosférico y se aisló de los nódulos de la planta de frijol. Por lo tanto la condición del suelo sin planta resultó ser la limitante en las bacterias con menor frecuencia (figura IV.5 y cuadro IV.6).

El comportamiento en los resultados de frecuencia y tipos de géneros fúngicos identificados, se relacionan con investigaciones realizadas por Ibiene *et al.* 2011; Gopi *et al.* 2012; Martinez *et al.* 2012 y Maldonado *et al.* 2010, quienes citan a géneros como *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma* presentes en suelos contaminados por metales, plaguicidas, hidrocarburos entre otros.

IV.2.2.2. Identificación del género *Trichoderma* sp.

La figura IV.5 muestra las características morfológicas observadas en la identificación del género *Trichoderma* sp., las fotografías del microcultivo ilustran que en el micelio hay conidióforos hialinos, ramificados no verticilados, fiálides en grupos con la producción de conidios (fialosporos) hialinos en forma ovoide y en racimos terminales.

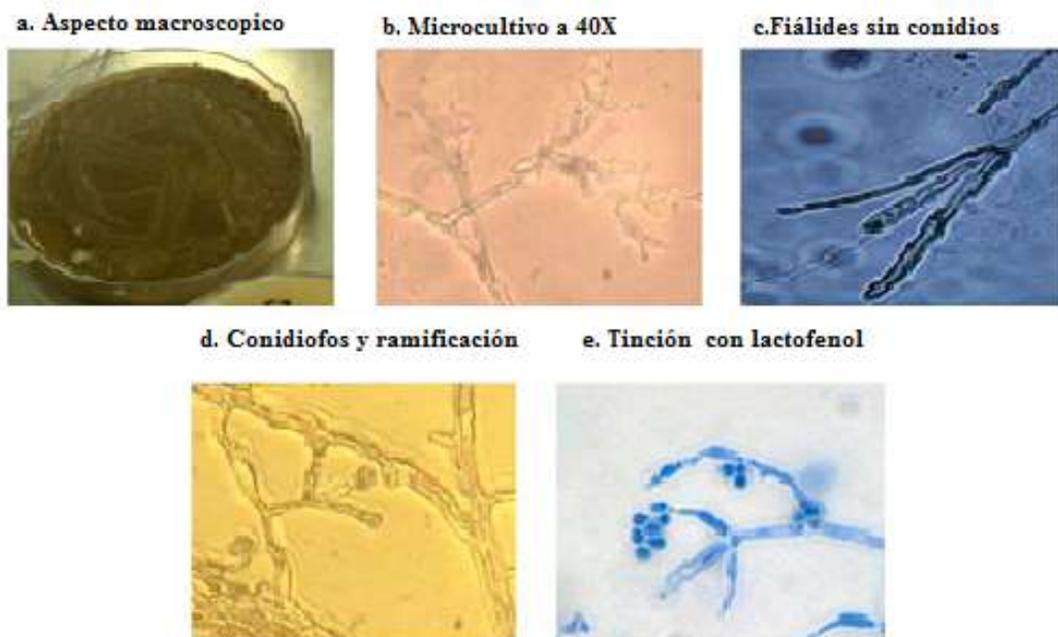


Figura IV.5. Morfología del *Trichoderma* sp.: a. Aspecto macroscópico; b. Imagen del microcultivo en aumento lineal 40x, que muestra conidióforos hialinos; c. Fiálides simples sin producción de conidios; d. Conidioforos con fialosporos (producción de conidios) y e. Estructura morfológica en lactofenol.

Por otro lado, las características macroscópicas de la cepa purificada, reveló que inicialmente crece en círculos pequeños verdes en forma de cojines de conidios y esporas blancas aéreas visibles. Se expande radialmente sobre la superficie de la caja y su aspecto se tornó polvoriento de color verde olivo (figura IV.5.a). Trabajos como los de Guigon *et al.* (2010); Moran (2008); Correa y Peñuela (2002); Barnett y Hunter (2006) y Cruz 2007, reportaron semejanzas en la identificación y características morfológicas del género *Trichoderma* sp.

IV.3 Bioensayos de resistencia por inhibición de crecimiento

La exposición a contaminantes, puede ocasionar la disminución y/o modificación de la población microbiana de los suelos. Sin embargo, en algunos casos los microorganismos permanecen y aumentan exponencialmente. Esto se debe a que el organismo, se desarrolla y adapta a diferentes condiciones.

Los resultados de la concentración inhibitoria (CI) de los microorganismos a diferentes concentraciones de atrazina, se resumen en el cuadro IV.7. Los géneros identificados crecieron sin halo de inhibición en concentraciones de 0-2500 mg L⁻¹ de atrazina.

Bacterias como: *Pediococcus* sp., *Bacillus* sp. *Erwinia* sp., *Sphingomonas* sp., *Micrococcus* sp. Y *Serratia* sp., presentan crecimiento inhibitorio a 5000 mg L⁻¹, y se incrementa a 7500 mg L⁻¹. Finalmente, se inhiben por completo a 10,000 mg L⁻¹ de atrazina.

Se destaca el género *Agrobacterium* con menor porcentaje de crecimiento a 7500 mg L⁻¹. La bacteria *Rhizobium* sp., fue la de menor halo de inhibición en presencia de 10,000 mg L⁻¹ de atrazina.

Los siete géneros fúngicos (23 posibles especies) identificados, no presentaron halos de inhibición de crecimiento de micelio en concentraciones de atrazina de: 0 hasta 10,000 mgL⁻¹, por el método de CI. Este comportamiento es evidencia de que los géneros aislados son resistentes concentraciones altas del agroquímico.

Cuadro IV.7. Resultados del % de crecimiento inhibitorio a diferentes concentraciones de atrazina de los géneros identificados.

Género	Concentración mínima Inhibitoria (mg L ⁻¹)				Tiempo de crecimiento (días)	Velocidad de crecimiento (mm días ⁻¹)
	0-2500	5000	7500	10000		
	% CI*	% CI	% CI	% CI		
<i>Sphingomonas</i> sp	0	8.75	15	100	4	20
<i>Micrococcus</i> sp	0	5	13.75	100	3	26.66
<i>Serratia</i> sp	0	6.25	16.25	100	4	20
<i>Bacillus</i> sp	0	13.75	18.75	100	5	16
<i>Erwinia</i> sp	0	12.5	20	100	3	26.66
<i>Rhizobium</i> sp	0	0	0	2.5	4	11.42
<i>Pediococcus</i> sp	0	16.25	18.75	100	5	16
<i>Agrobacterium</i> sp	0	0	6.25	13.75	6	13.33
<i>Alternaria</i>	0	0	0	0	7	11.42
<i>Mucor</i> sp. 1	0	0	0	0	7	11.42
<i>Mucor</i> sp. 2	0	0	0	0	7	11.42
<i>Clandosporium</i>	0	0	0	0	5	16
<i>Fusarium</i> sp. 1	0	0	0	0	5	16
<i>Fusarium</i> sp. 2	0	0	0	0	5	16
<i>Fusarium</i> sp. 3	0	0	0	0	5	16
<i>Aspergillus</i> sp.	0	0	0	0	6	13.33
<i>Penicillium</i> 1	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> 2	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> 3	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> 4	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> sp.5	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> sp. 6	0	0	0	0	7	11.42
<i>Penicillium</i> sp. 7	0	0	0	0	7	11.42
<i>Trichoderma</i> 1	0	0	0	0	5	16
<i>Trichoderma</i> 2	0	0	0	0	5	16
<i>Trichoderma</i> 3	0	0	0	0	5	16
<i>Trichoderma</i> 4	0	0	0	0	5	16
<i>Trichoderma</i> 5	0	0	0	0	5	16
No identificada 1	0	0	0	0	6	13.33
No identificada 2	0	0	0	0	6	13.33
No identificada 3	0	0	0	0	6	13.33

*%CI: Porcentaje de crecimiento inhibitorio.

Los ensayos por concentración mínima inhibitoria y tipo de microorganismos (Figura IV.6), son altas, en comparación con otras investigaciones (Mondragón *et al.*, 2008; Getenga *et al.*, 2009; Monard *et al.*, 2011; Sene *et al.*, 2010). Las bacterias identificadas, se inhiben en mayor proporción a partir de 5000 mg L⁻¹ de atrazina, a excepción del género *Rhizobium* sp. Por otro lado, los géneros fúngicos no muestran inhibición en su crecimiento a ninguna concentración de atrazina (Figura IV.6).

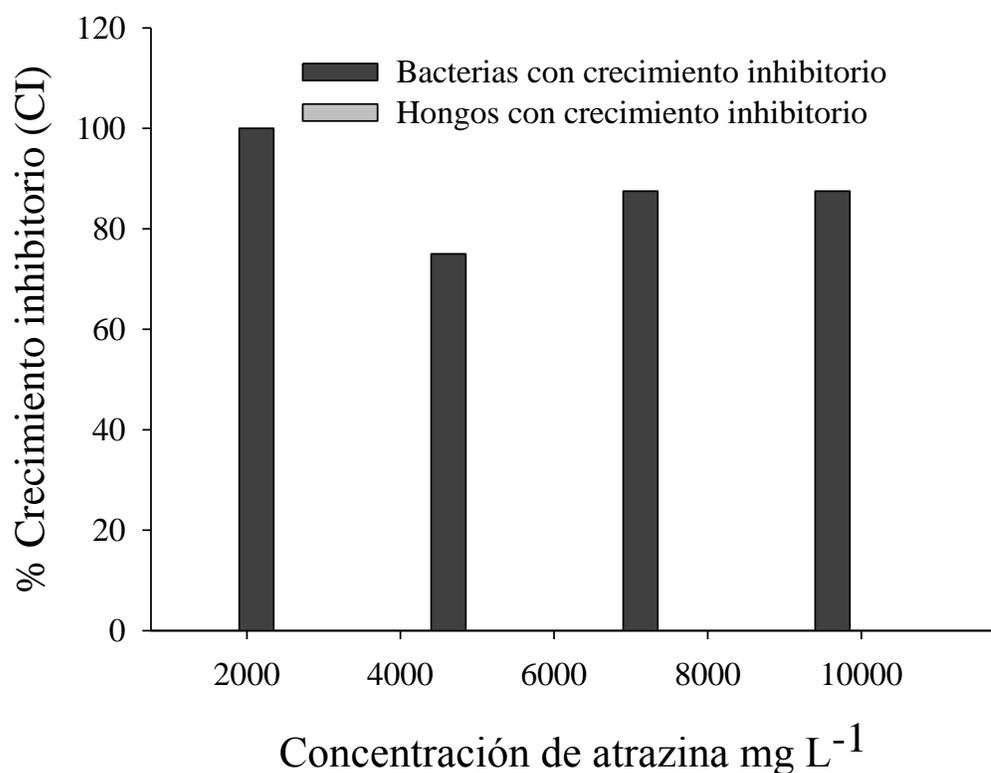


Figura IV.6. Ensayo de crecimiento inhibitorio (CI) a diferentes concentraciones de atrazina.

De los 15 microorganismos identificados, el 74.18 % corresponden a los géneros fúngicos sin inhibición en su crecimiento a 10,000 mg L⁻¹ de atrazina. Sólo el 3.22% de bacterias crecieron a esta concentración y el 22.58 % mostro inhibición de crecimiento (Figura IV.7). Existen pocas referencias que relacionen a estos microorganismos nativos con estos resultados. Regularmente la resistencia y/o tolerancia es inducida por modificación genética (Evy y Nilanjana, 2012, Prasad, 2011).

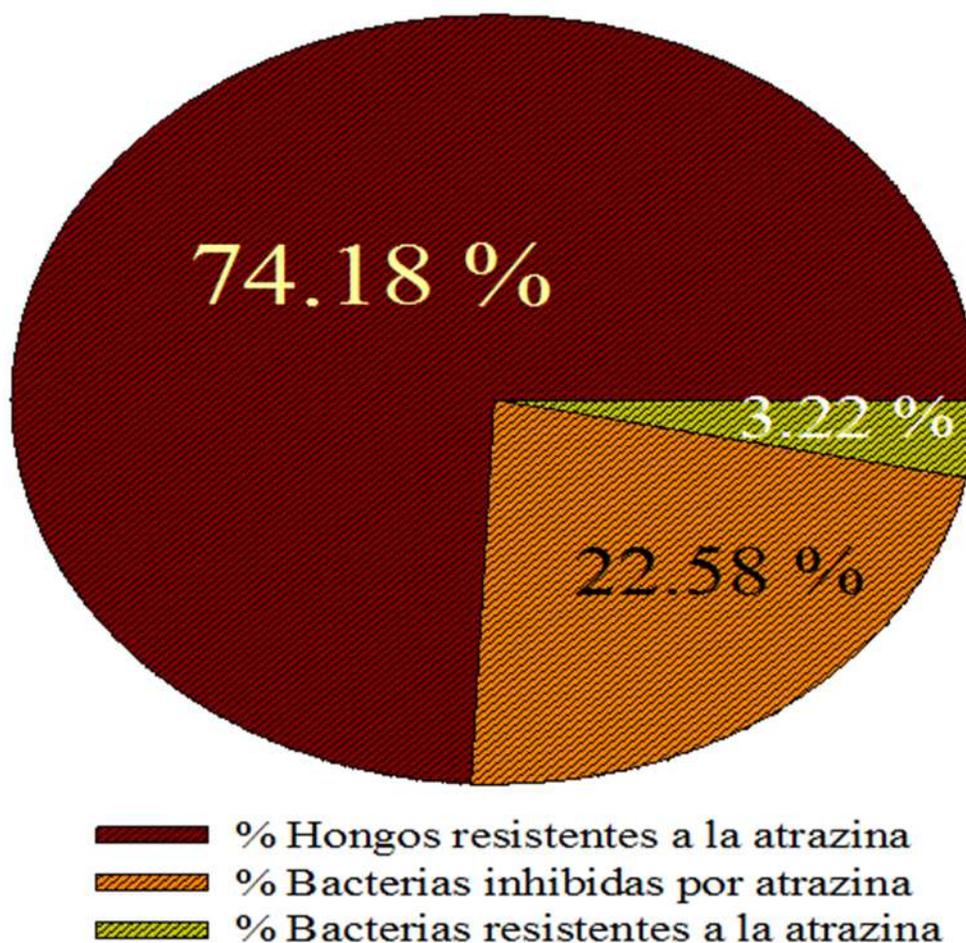


Figura IV.7. Porcentaje de crecimiento inhibitorio de los microorganismos a 10,000 mg L⁻¹ de atrazina.

IV.4. Selección de microorganismos con potencial de remoción de atrazina

Los resultados mostraron que las cepas nativas y rizosféricas de *Rhizobium* sp. y *Trichoderma* sp., son candidatos viables para biorremediación de suelos contaminados por atrazina. Para exhibir lo anterior de manera más clara, se argumentan los siguientes resultados:

El *Rhizobium* sp., fue el único género bacteriano que no mostró crecimiento inhibitorio significativo a 10,000 mg L⁻¹ de atrazina, lo que hace suponer su resistencia al herbicida (figuraIV.8.a). En aspectos agrícolas, la simbiosis *Rhizobium-Phaseolus vulgaris* ha demostrado efectos sinérgicos como promotor del crecimiento vegetal. Además, su uso como inoculante en mecanismos de fitorremediación ha registrado un aumento a la tolerancia y acumulación de contaminantes en la planta (Chaudhary *et al.*, 2011).

Resultados experimentales recientes de Evy y Nilanjana (2012), reportan sus capacidades catabólicas en consorcios mixtos para degradar atrazina. En concordancia con la revisión bibliográfica, esta bacteria tiene mayor oportunidad genética para biodegradar al herbicida y al mismo tiempo brindar beneficios a los suelos agrícolas.

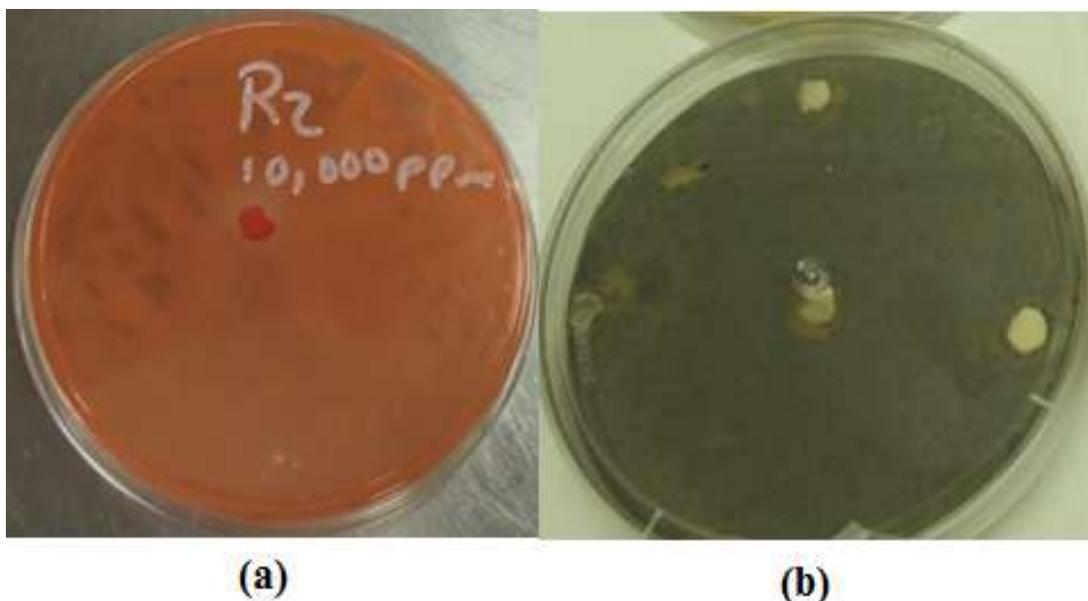


Figura IV.8. Imagen del ensayo de concentración mínima inhibitoria a $10,000 \text{ mg L}^{-1}$ de los microorganismos seleccionados (a) *Rhizobium* sp., y (b) *Trichoderma* sp.

De la misma manera, el género *Trichoderma* sp. fue seleccionado por tener diferentes funciones ambientales. Al igual que todos los hongos identificados creció sin inhibición (figura IV.8. b) a diferentes concentraciones de atrazina ($0-10,000 \text{ mg L}^{-1}$). Es un hongo considerado como agente de control biológico y promotor del crecimiento vegetal. Son pocas las especies que se referencia como patógeno para cultivos agrícolas y es resistente a diferentes contaminantes xenobióticos (incluyendo sustancias explosivas). Tolerante a condiciones físicas y químicas extremas, como cambios de pH, temperatura, intercambio iónico, cambios de estado nutricional, entre otras. Es un simbiote en plantas, desarrolla co-metabolismo y cuenta con mecanismos genéticos para llevar a cabo extracción, remoción y biodegradación de sustancias tóxicas y contaminantes como la atrazina (Schuster y Schmoll, 2010; Hoyos *et al.*, 2009; Harman *et al.*, 2004; Cocaigh *et al.*, 2011).

IV.5. Producción de biomasa: *Rhizobium* sp., y *Trichoderma* sp.

La biomasa del género bacteriano, resulto de 1×10^9 UFC mL⁻¹, en 5 días de incubación a 150 rpm, temperatura de 26.5 °C y un pH de 6.5. La biomasa se observa cuando se presenta turbidez en el medio líquido de extracto de levadura y manitol (incoloro al inicio). La biomasa de la bacteria es de color blanco lechoso y consistencia viscosa. Se obtuvo 0.92 g de biomasa húmeda por 50 mL⁻¹ de cultivo líquido (1.84 %).

Los resultados experimentales, se relacionan con lo publicado por Mnasri *et al.*, 2007; Krishnan y Benntt, 2007 y Chaudhary *et al.*, 2011, refieren que la biomasa de la bacteria varía de 1×10^8 a 5.2×10^8 . Lo diferente, es que la cepa del *Rhizobium* sp., se aisló de otra variedad de leguminosas. Aun así, en los tres casos revisados, la finalidad fue utilizar la bacteria en biorremediación de suelos.

La biomasa del hongo, se realizó a partir de la cepa identificada como T₅ (se identificaron 5 posibles especies de *Trichoderma* sp.: T₁, T₂, T₃, T₄ y T₅). El criterio de elección fue: a) el crecimiento fue uniforme y radial a intervalos de pH de 4.5 a 7.5; b) fue la única cepa que se desarrolló y creció en medio sólido y líquido; c) la consistencia polvosa del micelio fue soluble en agua y d) fue la única cepa que creció con y sin la presencia de luz.

El trabajo mostró que se puede obtener 0.12 g de micelio del *Trichoderma* sp., por cada 78.53 mm² de área con PDA. La biomasa que se formó en

cultivo sumergido no fue posible separarla y purificarla del caldo nutritivo (extracto de papa y dextrosa). Por lo tanto, sólo se utilizó la generada en medio sólido. La viabilidad de la biomasa en suspensión (agua destilada) resultó de 1×10^4 a 1×10^5 conidios mL^{-1} .

Estos resultados coinciden con los obtenidos por Kolombet *et al* (2008), quienes reportan un rendimiento de biomasa de *Trichoderma* de 5×10^4 conidios mL^{-1} . Sin embargo, en el mismo año, Chavez *et al.* (2008), y Agamez *et al.* (2008), citan rendimientos superiores (2.31×10^9 a 45×10^{18} conidios mL^{-1}) en procesos artesanal y semi-industrial donde utilizan diferentes sustratos y condiciones de luz.

IV.6 Cinética de crecimiento de *Rhizobium* sp., y *Trichoderma* sp.

Los resultados de la cinética de crecimiento se observan en la figura IV.9. El comportamiento en la población de los microorganismos no se modifica significativamente del día cero al cinco, pero a partir del quinto día el *Trichoderma* sp., crece exponencialmente al día 10 y paulatinamente durante los 15 días a temperatura ambiente.

La biomasa de *Trichoderma* sp., se incrementó de 1×10^4 a 1.8×10^6 conidios g^{-1} de suelo en 15 días a temperatura ambiente teniendo a la atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno. Se puede estimar que la bioaumentación con el hongo resultó favorable, comparado con el testigo (consorcio microbiano no identificado). Trabajos similares (Maldonado *et al.*, 2010; Vásquez *et al.*, 2010), reportan intervalos de crecimiento entre

$40 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ del mismo género fúngico en presencia de hidrocarburos totales de petróleo en un periodo de tiempo entre 40-158 días.

La población de la bacteria *Rhizobium* sp., disminuye entre el día cinco y diez y se muestra con una tendencia de crecimiento a los 15 días. Los cambios en la cinética del género *Rhizobium* sp., reflejan disminución de 1×10^9 a 1×10^7 UFC g^{-1} , pero al analizar detalladamente, se aprecia la tendencia de crecimiento de la población bacteriana. El intervalo de UFC es menor, al comparar el informe de Chaudhary *et al.* (2011) donde la viabilidad de células fue de $2.6-5.2 \times 10^8$ UFC mL^{-1} en 10 días y con el mismo género de bacteria.

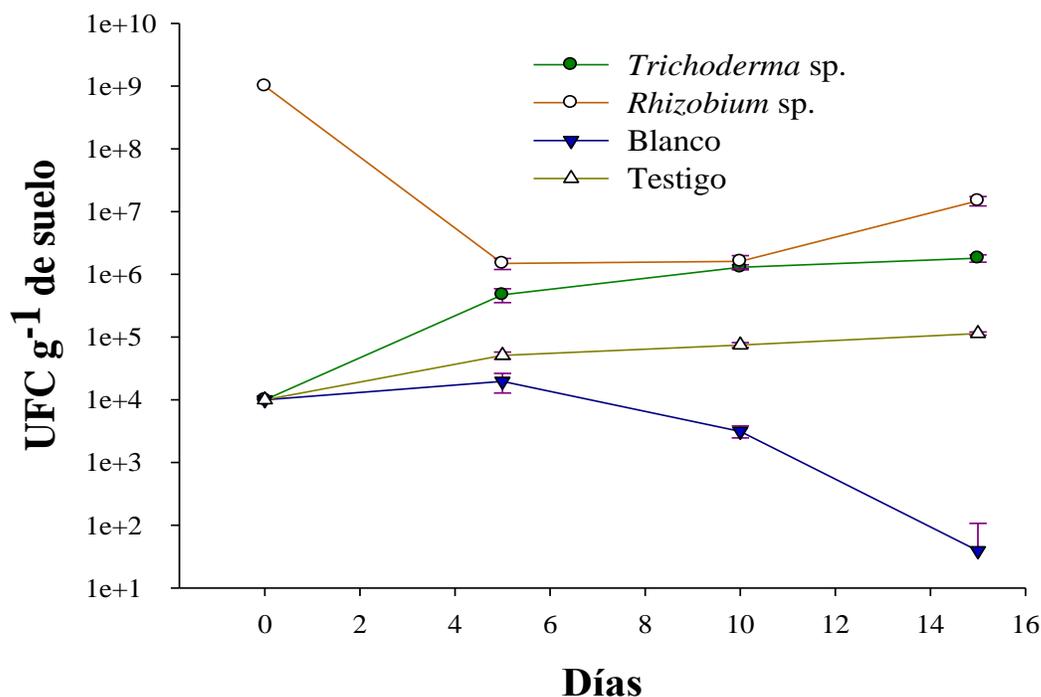


Figura IV.9. Cinética de crecimiento en UFC g^{-1} de *Trichoderma* sp. y *Rhizobium* sp., en suelo estéril, saturado a capacidad de campo por 100 mg L^{-1} de atrazina y su comportamiento en relación al Blanco (suelo estéril) y Testigo (suelo no estéril) a los 0, 5, 10 y 15 días de incubación.

Además, en este mismo estudio se relaciona el incremento de la biomasa de la bacteria con la tolerancia y acumulación de metales en plantas de *Vigna radiata* y *Vigna angularis* L. Por otro lado, Mondragón *et al.* (2008), mencionan que en 42 días incremento la población de un consorcio bacteriano (que incluyó al *Rhizobium* sp.), de 5×10^5 a 3×10^8 UFC mL⁻¹, usando un quimiostato para degradar compuestos s-triazínicos. En ambos casos, los valores indicados son semejante a los resultados experimentales.

Por el contrario, el comportamiento del testigo (suelo no estéril) en menor proporción incrementó su población, no tan significativa comparada con los microorganismos en estudio. Finalmente, el blanco (suelo estéril) evidenció una disminución progresiva de UFC g⁻¹ de suelo.

IV.7 Biorremediación de suelo contaminado por atrazina

- a) Bioaumentación: Cuantificación en laboratorio (500 mg L⁻¹ de atrazina)

El análisis estadístico en los tratamientos de remoción de 10 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo en laboratorio, se detectó diferencias significativas ($\alpha=0.05$) entre los tratamientos a partir del quinto día y hasta los 20 días del ensayo. Al final del experimento (40 días), la cantidad de atrazina eliminada por el género *Trichoderma* sp. (T), fue estadísticamente diferente y mayor comparada con lo alcanzado por el Blanco (B) y el Testigo (Te) en el mismo tiempo (Cuadro IV.8).

La bacteria *Rhizobium* sp., al día 10 del muestreo, promedio mayor degradación, no obstante para el día 20 disminuyó y al final registró un máximo de 8.35 mg 50 g⁻¹ de suelo (417.5677 mg L⁻¹) para el día 40. Esto coloca a la bacteria en segundo lugar de los tratamientos de bioaumentación y a la mezcla *Rhizobium* + *Trichoderma* como tercero.

Cuadro IV.8. Comparación de medias de la remoción de atrazina en suelo a diferentes tratamientos por bioaumentación y días experimentales.

Tratamiento	Atrazina (500 mg L ⁻¹),			
	5 días	10 días	20 días	40 días
<i>Trichoderma</i> sp. (T)	114.9452b	168.5607a	442.3395d	447.1820d
<i>Rhizobium</i> sp. (R)	293.1485c	302.2429c	256.7403c	417.5677c
<i>Rhizobium</i> + <i>Trichoderma</i> (RT)	284.418c	198.7616a	219.523c	403.6424c
Blanco (B)	29.6909b	67.0079b	59.9570b	207.0662b
Testigo (Te)	119.8873a	174.3655a	112.2000a	147.4810 ^a
Error Estándar	±12.8536	±12.8536	±12.8536	±12.8536

Columna de medias con letras distintas difieren estadísticamente ($\alpha=0.050$, Tukey).

Proporcionalmente, como se ve en la figura IV.10. La tendencia marca al *Trichoderma* sp., como el mejor tratamiento respecto al tiempo. Eliminó 447.1 mg L⁻¹ de una concentración inicial de 500 mg L⁻¹ de atrazina, equivalente a 8.9 mg de atrazina 50 g⁻¹ suelo, es decir el 89.4% del herbicida. Se observa que a partir del día 20 hay una diferencia del género fúngico *Trichoderma* sp. ; *Rhizobium* sp., y la mezcla de ambos, respecto al Testigo y Blanco ($\alpha=0.050$, Tukey).

Este comportamiento del *Trichoderma* sp., es diferente a lo reportado por Przybulewska y Sienicka (2008), donde el mismo género mineralizó atrazina (hasta NH_3 y CO_2) de una concentración inicial de $2.5 \text{ mg } 50 \text{ g}^{-1}$ de suelo, la redujo a $1 \times 10^{-3} \text{ mg } 50 \text{ g}^{-1}$ de suelo en 112 días (inóculo inicial: 10^6 - 10^7 UFC g^{-1}). Sin embargo, la concentración inicial de atrazina que se trabajó es 3.5 veces mayor que lo reportado, 2.8 veces menor en tiempo y hay similitud en la cantidad inicial de inóculo.

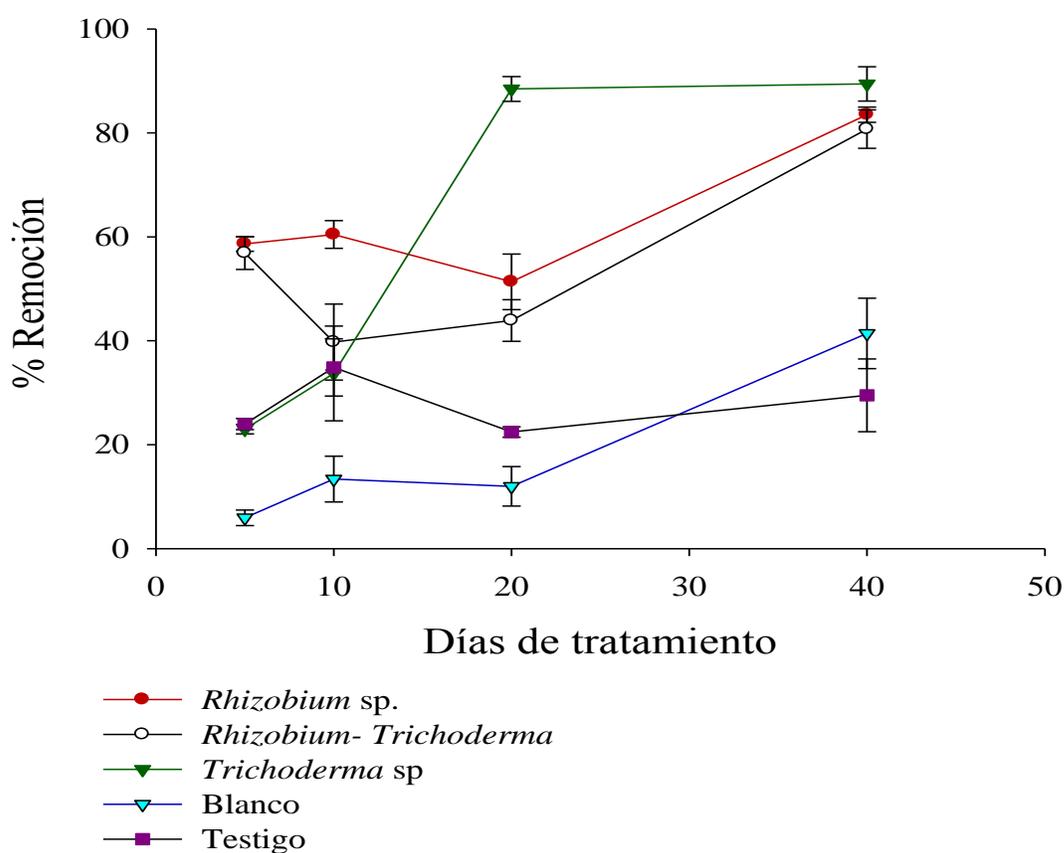


Figura IV.10. Porcentaje de remoción de atrazina (concentración inicial: 10 mg de atrazina 50 g^{-1} de suelo) en suelo, respecto al tiempo de incubación: 5, 10, 20 y 40 días.

Distintas revisiones como la de: Ghopita *et al.*, 2011; Cheyins *et al.*, 20011 y Sene *et al.*, 2010, se comparan con los resultados de remoción de atrazina. En estos trabajos, la biodegradación es por consorcios microbianos o por un solo microorganismo, incluidos los microorganismos propuestos, los intervalos de remoción de atrazina que reportan son entre 25-90% para tiempos de 9 a 60 días; con igual o mayor concentración de atrazina.

b) Fitorremediación y bioaumentación: Cuantificación de atrazina en invernadero

Los resultados de biorremediación en invernadero a las dos concentraciones de suelo contaminado por atrazina, se presentan en el cuadro IV.9. Los datos reflejan tres posibles escenarios de la remoción del atrazina: i) en primer lugar, se encontraron diferencias estadísticas en cuatro tratamientos (FT, FR, FRT y F) respecto al blanco (B) y testigo (Te); ii) el tratamiento de fitorremediación que incluye solo a la planta de frijol (F), eliminó 24.44% y 52.02%, de 16.6 y 33.3 mg de atrazina 50 g^{-1} de suelo respectivamente y iii) la combinación de fitorremediación (planta de frijol) + bioaumentación con *Trichoderma sp.* (FT), fue el mejor tratamiento en remoción del herbicida.

Cuadro IV.9. Resultados de la comparación de medias en la remoción de atrazina en suelo a diferentes tratamientos por fitorremediación y bioaumentación en invernadero.

Tratamiento	Atrazina (mg L ⁻¹),			
	1000	% remoción	2000	% remoción
Frijol+ <i>Trichoderma</i> sp. (FT)	558.5515e	55.85	1532.603e	76.63
Frijol+ <i>Rhizobium</i> sp. (FR)	313.7177d	31.37	1224.677d	61.23
Frijol+ <i>Rhizobium</i> + <i>Trichoderma</i> (FRT)	434.9978c	43.49	1248.323d	62.41
Frijol (F)	244.4174b	24.44	1040.574c	52.02
Blanco (B)	98.9121a	9.89	391.000b	19.55
Testigo (Te)	130.8838a	13.08	885.453a	44.27
Error Estándar	±32.4016		±51.6385	

Columna de medias con letras distintas difieren estadísticamente ($\alpha=0.050$, Tukey).

Los días experimentales entre las dos concentraciones resultaron diferentes. El mayor tiempo se registró a los 40 días en la concentración 2000 mg L⁻¹. Entre los tratamientos: frijol+ *Rhizobium* sp.+ *Trichoderma* sp. (FRT), y el frijol (F), hay cinco días de diferencia. Frijol + *Rhizobium* sp. (FR), 10 días y 15 días en Frijol + *Trichoderma* sp. (FT), respecto al primer experimento. A excepción del blanco (B) y testigo (Te) por ser los puntos de referencia experimental.

La remoción de atrazina en 2000 mg L⁻¹ (33.3 mg de atrazina /50 g de suelo) resultó ser mayor respecto a la de 1000 mgL⁻¹(16.6 mg de atrazina /50 g de suelo), en concentración y tiempo (Figura IV.11). La posible explicación se relaciona a la forma de inoculación de los microorganismos y a la siembra de la semilla. En la metodología, se describió que para el ensayo a 1000 mg L⁻¹, la semilla germinada y el inóculo, fueron incorporados al mismo tiempo. La diferencia en el experimento dos (2000

mg L⁻¹) fue que la siembra de la semilla germinada fue cinco días antes de la inoculación de los microorganismos. Esto podría haber dado ventaja a la planta de frijol para adaptarse y por lo tanto, aumentar la fitorremediación hasta 1040.57 mg L⁻¹ de atrazina (figura IV.11).

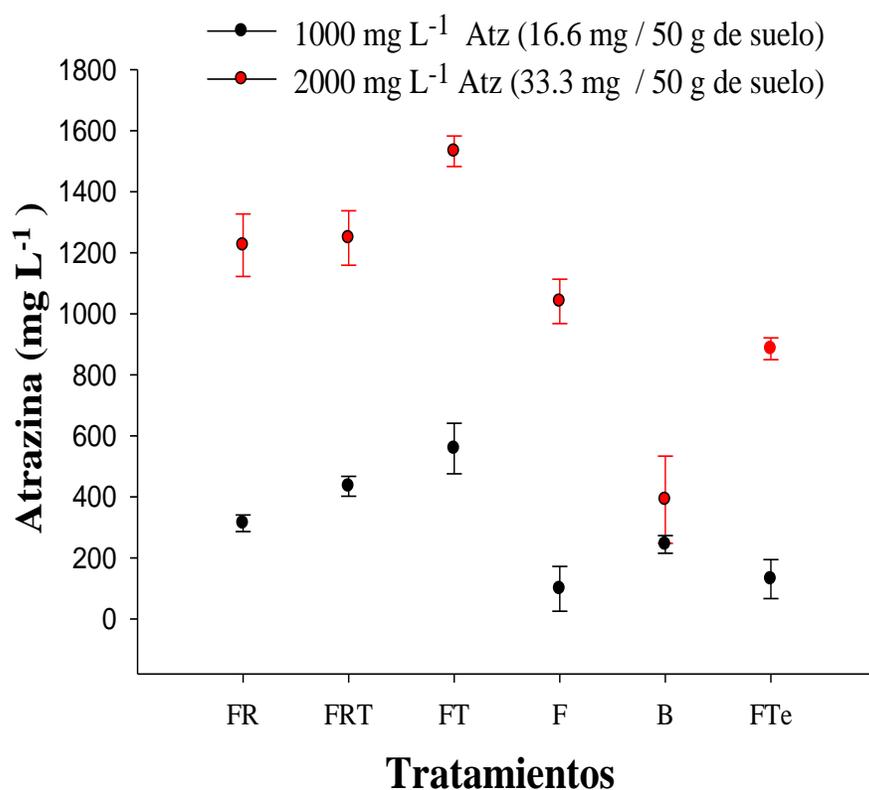
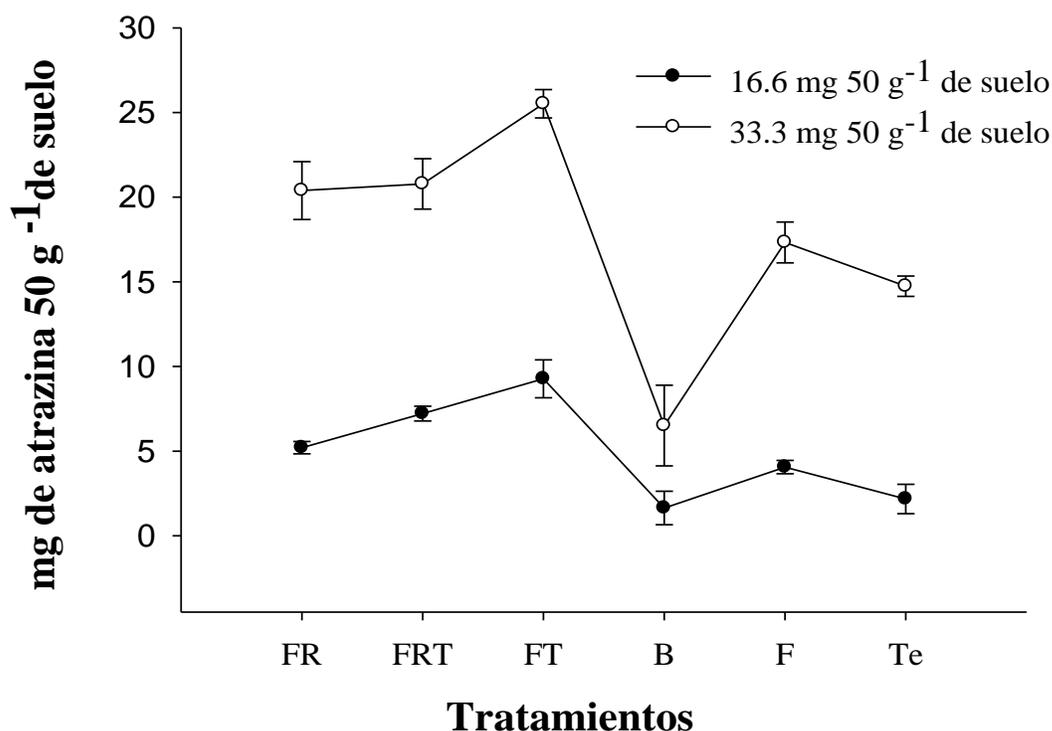


Figura IV.11. Comparación de las dos concentraciones de atrazina en invernadero en relación a los tratamientos.

Es pertinente, destacar que el punto de cambio para interrumpir el experimento en invernadero, fue precisamente el estrés físico que mostró la planta de frijol, es decir los días experimentales resultaron ser limitados por la planta.

El análisis de varianza y la prueba de medias refieren que se incrementó en 25 % más la remoción del herbicida, combinando bioaumentación y fitorremediación (cuadro IV.10 y figura IV.11). La planta de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) puede ser viable, como modelo de planta para fitorremediación de suelos contaminados por atrazina. Además, la bioaumentación con microorganismos rizosféricos, juegan un papel importante en dicha remoción, no solamente como promotores del crecimiento de la planta, al incrementar la disponibilidad nutrientes. También porque aumentan la biodisponibilidad del contaminante, debido a su estructura orgánica.

En el segundo experimento (en invernadero), la combinación de fitorremediación + bioaumentación del tratamiento FT, eliminó 25.51 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo en 40 días. Los tratamientos FR y FRT fueron capaces de remover un promedio de 20 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo cada uno, entre 35 y 40 días experimentales. Solamente, la planta de frijol (F), eliminó 17.32 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo, en 35 días. Finalmente, el blanco (B) 6.5 mg y el testigo (Te) 14.74 mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo, ambos en 40 días de ensayo (Cuadro IV.10 y figura IV.12).



FR= Frijol+*Rhizobium* sp.; FRT= Frijol+*Rhizobium* sp. + *Trichoderma* sp. ;
FT= Frijol + *Trichoderma* sp.; F= Frijol; B= Blanco; Te= Testigo

Figura IV.12. Comparación de tratamientos en invernadero de los dos ensayos en función de los mg de atrazina 50 g⁻¹ de suelo.

Los datos obtenidos, son comparables al reciente trabajo de Dehghani *et al.* (2013), en el difunden una remoción del 60.5 % del herbicida (concentración inicial de 65 mg de atrazina 50 g⁻¹ en suelo) comparado con el 12 % del blanco (sin inóculo), por 30 días. El experimento consistió en bioestimulación de un consorcio microbiano (no identificado), mediante adición de fuentes de carbono y nitrógeno (nitrato de amonio y urea), con una concentración del inóculo de 7.5x10⁵ células g⁻¹ a un pH del suelo de 7.0. De acuerdo con este planteamiento, en el segundo ensayo se tiene una concentración inicial de 33.3 mg atrazina 50 g⁻¹, con una proporción semejante de inóculo, pero una remoción de 76.63 % en el tratamiento FT.

Otra semejanza, son las propiedades físicas del suelo en ambos estudios (Cuadro IV.10).

No obstante que la concentración inicial en invernadero es menor a lo reportado por Dehghani *et al.* (2013), se confirma la pertinencia del proyecto, además, se debe considerar que los microorganismos en estudio no mostraron inhibición de crecimiento en concentración de 250 mg g^{-1} ($10,000 \text{ mg L}^{-1}$) de atrazina. Esto implica, que es posible igualar y aumentar lo reportado. Otro aspecto importante, podría ser el costo que implica la bioestimulación, comparado con el modelo biológico propuesto.

Recapitulando, el cuadro IV.10, sintetiza los resultados de la remediación de suelo contaminado por atrazina a las tres concentraciones experimentales y con el mismo inóculo inicial de $1 \times 10^9 \text{ UFC mL}^{-1}$ de *Rhizobium* sp., y 1×10^5 conidios mL^{-1} de *Trichoderma* sp. Para el primer experimento en matraz (a nivel laboratorio), se trabajó inicialmente con 10 mg de atrazina 50 g^{-1} de suelo. Se alcanzó, a eliminar con bioaumentación por *Trichoderma* sp. (T), 8.94 mg 50 g^{-1} de suelo, por 40 días a 25°C y pH de 7.7.

Cuadro IV.10. Resultados de la biorremediación de suelo contaminado por atrazina en laboratorio e invernadero.

Tratamientos	Atrazina eliminada	Días
Concentración inicial : *10 mg 50 g ⁻¹ de suelo (en laboratorio)		
<i>Trichoderma</i> sp. (T)	8.94	40
<i>Rhizobium</i> sp. (R)	8.35	40
<i>Rhizobium</i> + <i>Trichoderma</i> (RT)	8.07	40
Blanco (B)	4.14	40
Testigo (Te)	2.9	40
Concentración inicial : *16.6 mg 50 g ⁻¹ de suelo (en invernadero**)		
Frijol + <i>Trichoderma</i> sp. (FT)	9.27	25
Frijol + <i>Rhizobium</i> sp. (FR)	5.27	30
Frijol + <i>Rhizobium</i> + <i>Trichoderma</i> (FRT)	7.22	30
Frijol (F)	4.05	25
Blanco (B)	1.64	30
Testigo (Te)	2.1	30
Concentración inicial : *33.3 mg 50 ⁻¹ g de suelo (en invernadero**)		
Frijol + <i>Trichoderma</i> sp. (FT)	25.51	40
Frijol + <i>Rhizobium</i> sp. (FR)	20.39	40
Frijol + <i>Rhizobium</i> + <i>Trichoderma</i> (FRT)	20.78	35
Frijol (F)	17.32	35
Blanco (B)	6.51	40
Testigo (Te)	14.74	40

*Inoculó inicial: 1x10⁹ UFC mL⁻¹ de *Rhizobium* sp. y 1x10⁵ conidios mL⁻¹ de *Trichoderma* sp.

** Las condiciones abióticas registradas en invernadero fueron (i) temperaturas: 22.15 °C temperatura media alta; 11.30 °C promedio mínimo; valor máximo registrado de 35 °C y valor mínimo 5.2 °C. (ii) Régimen de luz: 14 h luz y 10 h oscuridad. (iii) pH: 7.5. (iv) Humedad: 33.3% de C.C.; con riego de 200 mL de agua cada 4 días.

Para el primer ensayo en invernadero con 16.66 mg de atrazina 50 g^{-1} de suelo iniciales, se removió hasta 9.27 mg 50 g^{-1} de suelo en el tratamiento fitorremediación + bioaumentación (FT). Los registros abióticos fueron: temperatura (promedio) de 11.30°C a 22.15 °C, pH 7.5, el fotoperiodo fue 14 h luz y 10 h oscuridad y los días experimentales entre 25-30.

En las mismas condiciones abióticas, se desarrolló el segundo ensayo en invernadero, la concentración inicial de atrazina fue de 33.3 mg 50 g^{-1} de suelo. La tendencia de eliminación más alta promedio 25.51 mg 50 g^{-1} de suelo, por el tratamiento frijol + *Trichoderma* sp., seguido del tratamiento FRT. El tiempo oscilo de 35 a 40 días experimentales y el contenido de humedad en el suelo de cada maceta, se mantuvo a 33.3 % de capacidad de campo, en ambos ensayos.

En semejanza con los resultados experimentales, está la propuesta por Kumar y Kumar (2012). Reportan entre 50- 95 % de remoción de una concentración inicial de 1000 mg L^{-1} de atrazina, a pH 6 y 30 °C, mediante sistema de biosorción bacteriana no identificada en agua.

Tras una revisión preliminar (cuadro III.7 del capítulo III) y al comparar los promedios, resultantes con estudios publicados por Gopinath y Sims (2011); Lima *et al.* (2009); Lin *et al.* (2008); Mondragón *et al.* (2008); Ma *et al.* (2011); Sene *et al.*, (2010) y Govantes *et al.*, 2009), se infiere que la eliminación de atrazina oscila entre el 50 % y 95%; en concentraciones iniciales de 1ng a 50 g; hay coincidencias en los parámetros de control como: pH (7-8), temperatura (20-30 °C), días experimentales (20-40) y humedad del suelo (30-65%). La mayoría de estas revisiones, trabajó con

menos concentración de atrazina a la evaluada (cuadro IV.10). Es pertinente aclarar que algunas de estas referencias, difieren en el mecanismo de biorremediación, otros en la especie de la planta o bien en el género del microorganismo.

No fue posible, comparar un modelo igual al propuesto que muestre la fitorremediación por la planta de frijol, en trabajo conjunto con los géneros *Rhizobium* sp., y *Trichoderma* sp., en la remediación de suelo contaminado por atrazina en invernadero. No se encontraron investigaciones (o bien no han sido publicadas y disponibles para consulta) que englobe toda la propuesta. Las comparaciones que se describen, están en función del contenido del herbicida atrazina.

V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- I. Se identificaron ocho géneros bacterianos: *Sphingomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Serratia* sp., *Bacillus* sp., *Erwinia* sp., *Rhizobium* sp., *Pediococcus* sp. y *Agrobacterium* sp., y 7 géneros fúngicos: *Alternaria*, *Mucor*, *Clandosporium*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium* y *Trichoderma*. Además, tres cepas fúngicas no identificadas. Son autóctonos, rizosféricos y fueron aislados de la planta de frijol.
- II. El consorcio de géneros identificados no presentó inhibición de crecimiento en ensayos a 2500 mg L⁻¹ de atrazina. En particular la bacteria *Rhizobium* sp., y el hongo *Trichoderma* sp. no registraron crecimiento inhibitorio a 10,000 mg L⁻¹. Por esta razón, son candidatos viables en la remoción del herbicida.
- III. Se obtuvo una biomasa en *Rhizobium* sp., de 1x10⁹ UFC mL⁻¹ y de *Trichoderma* sp. 1x10⁵ conidios mL⁻¹. Este inóculo generado es viable, cultivable y con tendencia a incrementar exponencialmente la biomasa en suelo contaminado por atrazina en condiciones de laboratorio e invernadero.
- IV. Se demostró la remoción por bioaugmentación con los tratamientos por *Trichoderma* sp., *Rhizobium* sp., y la mezcla *Trichoderma* sp.-

Rhizobium sp., de acuerdo a las diferencias estadísticas en relación al blanco y testigo a 40 días experimentales.

- V. La fitorremediación se manifestó en los ensayos en invernadero. La planta de frijol con una remoción del 52.02 % de atrazina en 35 días.
- VI. Se mostró cuantitativamente la remoción del 76.63% de atrazina en el tratamiento de fitorremediación por la planta de frijol y bioaumentación con el género nativo y rizosférico *Trichoderma* sp., en 40 días en invernadero.
- VII. Los resultados confirman que el modelo biológico propuesto para remediar suelos contaminados por atrazina en el valle de Tulancingo, Hidalgo, México, es viable en invernadero.

Recomendaciones

- I. La metodología desarrollada puede mejorar los procesos nativos existentes en el medio ambiente, mejorar la eficiencia de eliminación de xenobióticos en suelos agrícolas y evitar o reducir la contaminación de otros ecosistemas.
- II. Se requiere más investigación para identificar los mecanismos fisiológicos, bioquímicos y moleculares de la planta de frijol y de los géneros nativos. Además, de validar la biorremediación en condiciones *in vivo* a nivel de campo o parcela experimental.

- III. Son escasas o nulas, las referencias que citen a todos los componentes del modelo biológico propuesto. Regularmente, el estudio de estos microorganismos y de la planta de frijol se limitan en aspectos de mejoras agrícolas como promotores de crecimiento o de control biológico. No se visualizan, como herramientas en biorremediación. Por consiguiente, esta metodología biotecnológica se puede abordar en el área ambiental y agrícola.

VI. REFERENCIAS

Abhilash, P.C., Jamil S., Singh, N. 2009. Transgenic plants for enhanced biodegradation and phytoremediation of organic xenobiotics. *Biotechnology Advances*. 27: 474–488.

Abou-Shanab, R.A., Angle, J.S., Chaney, R.L. 2006. Bacterial inoculants affecting nickel uptake by *Alyssum murale* from low, moderate and high Ni soils. *Soil Biology & Biochemistry*. 38: 2882-2889.

Acevedo, S.O.A. 2000. Degradación y contaminación de los suelos del estado de Hidalgo. Pachuca, Hidalgo, México, Instituto de investigaciones en ciencias de la tierra. Universidad Autónoma del Estados de Hidalgo. Pág. 15.

Aceves, N.L.A., Juárez, L.J.J., Palma, L.D.J., Rivera, H.B., Rincón, R.J.A., Morales, C.R. 2008. Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Estado de Tabasco. Gobierno del Estado de Tabasco. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación. Tomo II.

Acosta, D.C., Martinez, R.E. 2002. Diversity of rhizobia from nodulates of the leguminous trees *Gliricidia sepium*, a natural host of *Rhizobium tropici*. *Archives of Microbiology*. 178: 161-164.

Adebusoye, S.A., Picardal, F.W., Ilori, M.O., Amund, O.O., Fuqua, C. 2008. Characterization of Multiple Novel Aerobic Polychlorinated Biphenyl (PCB)-Utilizing Bacterial Strains Indigenous to Contaminated Tropical African Soils. *Biodegradation*. 19: 145-159.

Agamez, R. E.Y., Zapata, N.R.I., Oviedo, Z.L.E., Barrera, V. J.L. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación sólida para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. *Revista colombiana de biotecnología*. 10: 2.

Agencia de Protección Ambiental. 2012.
<http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine>

Aguilera, C.M., Martínez, E.R. 1990. Relaciones Agua, Suelo, Planta Atmosfera. Departamento de enseñanza investigación y servicio en irrigación. Universidad Autónoma Chapingo, México. Pág.47.

Alletto, L., Coquet, Y., Benoit, P., Heddadj, D., Barriuso, E. 2009. Tillage management effects on pesticide fate in soils. A review. *Agronomy for Sustainable Development*. 30: 367- 400.

AMIFAC: Asociación Mexicana de la Industria Fitosanitaria AC.
<http://www.amifac.org.mx/nosotros.html#>

Anderson, L.R. (2009). Managing weeds with a dualistic approach of prevention and control: a review. Lichtfouse (Ed.). *Sustainable Agricultura*. South Dakota: Springer Science+Business Media B.V. Pág. 391-398.

Argumedo, D.R., Alarcón, A., Ferrera, C.R., Peña, C. J. 2009.El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 25: 257-269.

Argumedo-Delira, R.2011. Respuesta fisiológica de miembros del género *Trichoderma* a hidrocarburos poliaromáticos. Tesis de Doctorado en Edafología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 19-23 p.

Astsd, 2003. <http://www.atsdr.cdc.gov/tfacts153.pdf>

Bajwa, R., Khokhar, I., Mukhtar, I., Mushtaq, S. 2010.Isolation and Identification of Filamentous Fungi from Different Industrial Effluents. Plant Product Research Journal. 14: 32–35.

Barnet, H.L., Hunter, B.B. 2006. Illustratrated general of imperfect fungi, Fourth edition, Apss Press, Minnesota, USA. Pág. 92.

Barriuso, J., Ramos, S.B., Lucas, A.L., Probanza, L.A. 2008. Ecology, Genetic Diversity and Screening Strategies of Plant Growth Promoting Rhizobacteria (PGPR). Ahmad, I, Pichtel, J. and Hayat, S.(Eds), Plant-Bacteria Interactions. Strategies and Techniques to Promote Plant Growth, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, USA. Pág. 113.

Bastos, A.C., Magan, N. 2009. *Trametes versicolor*: Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability condition. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 63: 389–394.

Bauer, A.W., Kirby, W.M.M., Sherris, J.C., Turck, M. 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Pathology*. 45: 493-496.

Bayer Cropscience:

<http://www.annualreport2009.bayer.com/en/homepage.aspx>. [Última consulta 13 Julio 2012]

Beattie, G.A. 2007. Plant –Associated Bacteria: Survey , Molecular Phylogeny, Genomics and Recent Advances. Gnanamanickam S.S. (ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Springer. Pág. 1-56 p.

Belimov, A.A., Hontzeas, V.I., Safronova, S.V., Demchinskaya, G., Piluzza, S., Glick B.R. 2005. Cadmium-tolerant plant growth-promoting bacteria associated with the roots of Indian mustard (*Brassica juncea* L. Czern.). *Soil Biology & Biochemistry*. 37: 241-250.

Ben-Hur, M., Letey, J., Farmer, W., Williams, C., & Nelson, S. 2003. Soluble and solid organic matter effects on atrazine adsorption in cultivated soils. *Soil Science Society of America Journal*. 67: 1140–1146.

Boivin, A., Amellal, S., Schiavon, M., & Genuchten, T. 2005. 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) sorption and degradation dynamics in three agricultural soils. *Environmental Pollution Journal*. 138: 92–99.

Bouquard, C., Ouazzani, J., Promé, J.C., Briand, Y.M. Plésiat, P. 1997. Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate. Applied and Environmental Microbiology. 63(3): 862–866.

Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer method improved for making particle size analysis of soils. Agronomy Journal. 54: 464-465.

Briceño-Muñoz, G. 2009. Influencia de la aplicación de purines de origen bovino sobre la persistencia de atrazina en suelo de uso agrícola: Estudio de adsorción y degradación. Tesis de Doctorado en Ciencias de Recursos Naturales. Universidad de la Frontera. Temuco, Chile. 13-18 p.

Bridges, M. Brien, H.W., Shaner D.L., Khosla, R., Westra, P., Reich R. 2008. Spatial Variability of Atrazine and Metolachlor Dissipation on Dryland No-tillage Crop Fields in Colorado. Journal of Environmental Quality.37: 2212–2220.

Briggs, G.G. 1981. Theoretical and Experimental Relationships between Soils Adsorption, Octanol-Water Partition Coefficients, Water Solubilities, Bioconcentration Factors, and the Parachor. Journal Agricultural Food Chemistry 29: 1050-1059.

Buckman, H. and Brady, N.C. 1966. The Nature and Properties of Soils. The Macmillan Company. United Kingdom. Pág. 590.

Calvo, V.P., Reymundo, M.L., Zuñiga, D. D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada*. 7(1,2): 141-148.

Cano, M.A. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: Micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. Una revisión. *Revista Universidad de Ciencias Aplicadas y Ambientales, Actualidad & Divulgación Científica* 14 (2): 15 – 31.

Casas, E., Bonilla, E., Ducolomb, Y., Bentacour, M. 2008. Los herbicidas atrazina y fenoxaprop-etil y los insecticidas malatión y diazinón, afectan diferencialmente la viabilidad y maduración in vitro de ovocitos de cerdo. Reporte técnico. Universidad Autónoma Metropolitana, México.

Castillo, M.P., Torstensson, L., Stenström, J. 2008. Biobeds for Environmental Protection from Pesticide Uses A Review. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 56: 6206–6219.

Cejudo, E. E., Velázquez, Z.A., Rodríguez, V.R. 2009. Adsorción de atrazina en secciones circulares de raíces de tres plantas de humedales. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 8(1): 35-39.

Celis, R., De Jonge, H., De Jonge, L.W., Real, M., Hermosis, M.C., Cornejo, J. 2006. The role of mineral and organic components in phenanthrene and dibenzofuran sorption by soil. *European Journal of Soil Science* 57: 308-319.

Cepeda, D.J., M. 1991. Química de Suelos. Trillas, México, D.F. Pág. 56.

Chaudhary, K.S., Inouhe, M., Rai, N.M.U., Mishra, K., Gupta, K.D. 2011. Inoculation of *Rhizobium* (VR-1 and VA-1) induces an increasing growth and metal accumulation potential in *Vigna radiata* and *Vigna angularis*L. growing under fly-ash. *Ecological Engineering*. 37(8): 1254-1257.

Chávez, G.M., Montaña, L.J.S., Martínez, S.M.M., Mercado, R.M., Rodríguez, X.M., Quevedo, H. B. 2008. Efecto del sustrato y la exposición a la luz en la producción de una cepa de *Trichoderma* sp. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias. 3(3): 245-251.

Chávez, S.J.A., Álvarez, R. V.P. 2012. Ecofisiología de seis variedades de frijol bajo las condiciones climáticas de la Región Lagunera. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*.3: 299-309.

Cheyns, K., Martin, L.F., Bru, D., Aamand, J., Vanhaecke, L., Diels, J., Merckx, R., Smolders, E., Springael, D. 2011. Long-term dynamics of the atrazine mineralization potential in surface and subsurface soil in an agricultural field as a response to atrazine applications. *Chemosphere*.10: 450-465.

CICOPLAFEST (2004). Catálogo de plaguicidas. Comisión Intersecretarial para el Control del Proceso y Uso de Plaguicidas, Fertilizantes y Sustancias Tóxicas. Secretaría de Salud, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. [en línea]

<http://www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/riiq/Documents/catalogo%20plag/INICIO.pdf>. 12/09/2009.

Cisneros, A.R. 2003. Apuntes de Riego y Drenaje. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. Facultad de Ingeniería. <http://ingenieria.uaslp.mx/web2010/Estudiantes/apuntes/Apuntes%20de%20Riego%20y%20Drenaje%20v.2.pdf>.

Cocaign, A., Dairou, J., Rodrigues, L. F., Silar, P., Dupret, J.M. 2011. Aromatic amine biotransformation by *Trichoderma virens* and *Trichoderma reesei*. Disponible en: <http://summer-school-soils.univ-paris-est.fr/docs/Abstract-Cocaign.pdf>.

COFEPRIS, 2004: Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios.

<http://www.cofepris.gob.mx/AZ/Paginas/Plaguicidas%20y%20Fertilizantes/CatalogoPlaguicidas.aspx>

Cooper, R.L., Laws, S.C., Goldman, J.M., Narotsky, M.G. 2007. Atrazine and reproductive function: mode and mechanism of action studies. Birth Defects Research. 80: 98-112.

Córdova, B.Y., Rivera, C.M.C., Ferrera, C. R., Obrador, O.J.J., Córdova, A.V.2009. Detección de bacterias benéficas en suelo con babano (Musa AAA Simmonds) cultivar ‘Gran enano’ y su potencial para integrar un biofertilizante. Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo. 25(3): 253-265.

Correa, DR. M., y Peñuelo, A. 2002. Aspectos de la Biología de un hongo del género *Rhizoctonia* y de su interacción in vitro con *Fusarium oxysporum* f. sp. dianthi. Acta Biológica Colombiana. 7(1): 41-52.

Cox, L., Cecchi, A Celis, R., Hermosin, M., Koskinen, W., & Cornejo, J. 2001. Effect of exogenous carbon on movement of simazine and 2,4-D in soils. Soil Science Society of America Journal. 65: 1688–1695.

CPEHS, 1993: Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud (1993).Atrazina, Guia para la Salud y la Seguridad. Disponible en: <http://www.cepis.ops-oms.org/bvsacd/eco/036143.pdf>

Cruz-Martínez, L.C. 2007. Estandarización del proceso de producción masiva de hongo *Trichoderma koningii* Th003 mediante fermentación bifásica a escala piloto. Tesis de Licenciatura en Microbiología Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias, Bogotá, D.C. 57-60 pág.

Davidchik, V.N., Kulikova, N.A., Golubeva, L.I., Stepanova, E.V., Koroleva, O.V. 2008. *Coriolus hirsutus* Laccase Effect on Atrazine Adsorption and Desorption by Different Types of Soil. Applied Biochemistry and Microbiology. 44: 440-445.

Dehghani, M., Nasser, S., Hashemi, H. 2013. Research Article: Study of the Bioremediation of Atrazine under Variable Carbon and Nitrogen Sources by Mixed Bacterial Consortium Isolated from Corn Field Soil in Fars Province of Iran. Journal of Environmental and Public Health. 1: 1-7.

Díaz-Trujillo, M.V. 2007. Estudios del sistema suelo-surfactante-plaguicida en los procesos de adsorción y desorción de atrazina, MBT y Clorpirifos. Tesis de Magíster en Química. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas. Santiago de Chile. 14 pág.

Echave B. D.2012. Ecotoxicos: La Naturaleza Amenazada. GT Laboratorio S.R. (Ed.). Rosario, Argentina. Pág. 6-11.

EPA U.S. 2002. The Foundation for Global Action on Persistent Organic Pollutants: A United States Perspective; Report EPA/600/P-01/003F; U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development's (ORD) National Center for Environmental Assessment (NCEA): Washington, DC, March 2002.

EPA, 2012 <http://www.epa.gov/oppsrrd1/reregistration/atrazine/>

EPA, USA: Environmental Protection Agency (EPA, USA). *Pesticides: Fact Sheets. IPM Principles* (www.epa.gov/pesticides/factsheets/ipm.htm).

Etchevers, B.J.D. 1992. Manual de métodos para análisis de suelos, plantas, aguas y fertilizantes: Análisis rutinarios en estudios y programas de fertilidad. Laboratorio de Fertilidad, Centro de Edafología (Ed.). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. Pág. 20-45.

Evy, A.A.M. & Nilanjana, D. 2012. Microbial Degradation of Atrazine, Commonly Used Herbicide. International Journal of Advanced Biological Research. 2(1): 16-23.

FAO (2004). Los niños corren mayores riesgos de intoxicación por plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, Sala de Prensa [en línea] <http://www.fao.org/newsroom/es/news/2004/51018/index.html>.
12/06/2009.

FAO-UNESCO, 1984. Food and Agriculture Organization (FAO)-Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO). Corporate Document Repository. Control of water pollution from agriculture. Chapter 4. Pesticides as water pollutants (<http://www.fao.org/docrep/w2598e/w2598e07.htm>).

Ferrera, C. R., Alarcón, A., Mendoza, L.M.R., Sangabriel, W., Trejo, A.D., Cruz, S.J.S., López, O.C., Delgadillo, M. J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo usando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. Agrociencia. 41(8): 817-826.

Filipov, N.M., Stewart, M.A., Carr, R.L. 2007. Dopaminergic toxicity of the herbicide atrazine in rat striatal slices. Toxicology. 232: 68-78.

Flores, C. F., González, P. E., Fernández, P. M., Villafranca, S. M., Socias, V. M., & Urena, A. M. 2002. Effects of dissolved organic carbon on

sorption and mobility of imidacloprid in soil. *Journal Environmental Quality*. 31: 880–888.

Flores-Rafael, E., y García-Burgo, M.V. 1995. Aislamiento de Cepas de Hongos Filamentosos a partir de la Copra. Tesis de Licenciatura en Ingeniero Bioquímico Industrial. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México. 23 pág.

Fragoeiro, S., Magan, N. 2005. Enzymatic activity, osmotic stress and degradation of pesticide mixtures in soil extract liquid broth inoculated with *Phanerochaete chrysosporium* and *Trametes versicolor*. *Environmental Microbiology* 7: 348–355.

Franché, C., Lindström, K., Elmerich, C. 2009. Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil*. 321: 35–59.

Fromang-Sean, D. 2010. Effects of Atrazine on Non-Target Organisms. University of Florida Soil and Water Science Department. http://soils.ifas.ufl.edu/academics/pdf/Non-Thesis%20Projects/Fall%202011/Fromang_Sean.pdf

Fuentes, C., Lozano, A., Guerrero, J., Pérez, L., Olarte, I., Acevedo, B. 2003. Comportamiento y destino ambiental de la Atrazina en el suelo: detección por HPLC y ¹⁴C de las concentraciones ambientales bajo condiciones controladas y de campo en Saldaña–Tolima. *Agronomía Colombiana*. 21: 29-48.

Fuentes, D.G., Ferrera, C.R., (Eds.). 2007. Ecología de la raíz (segunda edición). Cd. Obregón, Sonora, México. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Pág. 2-20.

García, I. y Dorronsoro, C. 2010. Departamento de Edafología Química Agrícola. Universidad de Granada, España. Unidad Docente e Investigadora de la Facultad de Ciencias. <http://edafologia.ugr.es/index.htm>

Gentry, T.J., Rensing, C., Pepper, L.I. 2004. New Approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*. 34: 447–494.

GESAPRIM 50 FW®. Syngenta 2009. Hoja de Seguridad Resolución 350/99. http://www.jedys.com.ar/data/HojaDeSeguridad_359.pdf. [Última consulta 13 Julio 2012]

Getenga, Z., Dörfler, U., Iwobi, A., Schmid, M., Schroll, R. 2009. Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere* 77: 534–539.

Ghosh, P.K. y Philip, L. 2004. Atrazine degradation in anaerobic environment by a mixed microbial consortium. *Water Research*. 34: 2277–2284.

González, A.C.A., Robledo, M. M.L., Medina, D.I.M., Velázquez, F.J.B., Girón, P.M.I., Quintanilla, V.B., Ostrosky, W.P., Pérez, H.N.E., Rojas,

G.A.E. 2010. Patrón de uso y venta de plaguicidas en Nayarit, México. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 26 (3): 221-228.

Gopi, V., Upgade, A., Soundararajan, N. 2012. Bioremediation potential of individual and consortium Non-adapted fungal strains on *Azo dye* containing textile effluent. *Advances in Applied Science Research*. 3: 303-311.

Gopinath, K.R. y Sims, K.G. 2011. Biostimulation for the Enhanced Degradation of Herbicides in Soil. *Applied and Environmental Soil Science* [Versión electronica] Disponible en: <http://www.hindawi.com/journals/aess/2011/843450> .[Última consulta 13 Julio 2012]

Govantes, F., Porrúa, O., García G. V., Santero, E. 2009. Atrazine biodegradation in the lab and in the field: enzymatic activities and gene regulation *Microbial Biotechnology*. 2(2): 178–185.

Guigón, L. C., Guerrero, P.V., Vargas, A.F., Carvajal, M. E., Ávila, Q. G.D., Bravo, L. L., Ruocco, M., Lanzuise, S., Woo, S., Lorito, M. 2010. Identificación Molecular de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. su Tasa de Crecimiento *in vitro* y Antagonismo contra Hongos Fitopatogenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 28: 87-96.

Harman, G.E., Lorito, M., Lynch J.M. 2004. Uses of *Trichoderma* spp. to Alleviate or Remediate Soil and Water Pollution. *Advances in Applied Microbiology*. 56: 330-331.

Hoyos, C. L.M., Orduz, S., Bissett, J. 2009. Growth stimulation in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by Trichoderma. Biological Control. 51: 409-416.

Ibiene, A.A., Orji, F.A., Ezidi, C.O. and Ngwobia, C.L. 2011. Bioremediation of hydrocarbon contaminated soil in the niger delta using spent mushroom compost and other organic wastes. Nigerian Journal of Agriculture, Food and Environment. 7(3): 1-7.

INE (2000) Características de peligrosidad ambiental de los plaguicidas. Instituto Nacional de Ecología. México. Pág. 270.

INE –plaguicidas:

http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/descargas/caracteristicas_fyq_plaguicidas.pdf

INE. 2007: Instituto Nacional de Ecología. Estudio: precisión del Inventario de plaguicidas obsoletos y sitios contaminados con éstos http://siscop.ine.gob.mx/descargas/gt/informe_final/informe_final_plaguicidas.pdf.

INEGI 2012: Instituto Nacional de Ecología. <http://www.inegi.org.mx/sistemas/sisept/default.aspx?t=inte14&c=27558&s=est>

Joo, H., Choi, K., Hodgson, H. 2010. Human metabolism of atrazine. Pesticide. Biochemistry and Physiology. 98: 73–79.

Juhler, R., Henriksen, T., Rosenbom, A., Kjaer, J. 2010. Fate and transporte of chlormequat in subsurface environments. *Environmental Science and Pollution Research* 17: 1245-1256.

Kadian, N., Gupta, A., Satya, S., Kumasi R., & Malik, A. 2008. Biodegradation of herbicide (atrazine) in contaminated soil using various bioprocessed materials. *Bioresource Technology*. 99: 4642-4647.

Khan, G.A. 2005. Review role of microbes in the rhizospheres of plants growing on trace metal contaminated soils in phytoremediation. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*.18: 355-364.

Khan, Z., and Anjaneyulu, Y. 2005. Review Paper: Review on Applications of Bioremediation Methods for Decontamination of Soils. *Research Journal of Chemistry and Environment*. 9(2): 469-474.

Kjeldahl, J. 1983. Sur une nouvelle méthode de dosage de l'azote dans les substances organiques, Résumé du compte-rendu des travaux du Laboratoire de Carlsberg, Copenhague, en commission chez H. Hagerup, Imprimerie de Thiele

Kolombet, V.L., Zhigletsova, K.S., Kosareva, I.N., Bystrova V.E., Derbyshev, V.V., Krasnova, P.S., Schisler, D. 2008. Development of an extended shelf-life, liquid formulation of the biofungicide *Trichoderma asperellum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 24: 123–131.

Kovaios, I., Paraskeva, C., Koutsoukos, P., & Payatakes. A. 2006. Adsorption of atrazine on soils: Model study. *Journal Colloid Interface Science*. 299: 88-94.

Krishnan, B.H., Benntt, J. 2007. *Rhizobium*-legume symbioses: molecular signals elaborated by rhizobia that are important for nodulation. Gnanamanickam, S.S. (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*. Pág. 57-100.

Kumar P. R., Kumar, D. M.A.2012. Effect of Various Environmental Parameters on Biosorptive Removal of Atrazine from Water Environment. *International Journal of Environmental Science and Development*. 3(3): 289-293.

Kumar, G.P., Philip, L. 2006. Environmental significance of atrazine in aqueous systems and its removal by biological processes: an overview. *Global Nest Journal*. 8(2): 159-178.

Lal, R. 2009. Soils and Sustainable Agriculture: A Review. *Sustainable Agriculture Book*. Part 1. Pág. 15-23.

Larson, J.D., Wadman, S.A., Chen, E., Kerley, L., Clark, K.J., Eide, M., Lippert, S., Nasevicius, A., Ekker, S.C., Hackett, P.B., and Essner, J.J. 2004. Expression of VE-cadherin in zebrafish embryos: A new tool to evaluate vascular development. *Developmental Dynamics Journal*. 231(1): 204-213.

Law, J.I., Botha, F.W., Majaules, C.U., Phalane, L.F. 2007. Symbiotic and genomic diversity of 'cowpea' bradyrhizobia from soils in Botswana and South Africa. *Biology and Fertility of Soils*. 43: 653–663.

Lesan, H.M., Bhandari, A. 2004. Contact-time- dependent atrazine residue formation in Surface soils. *Water Research*. 38: 4445-4445.

Lewis, S.E., Brodie, J.E., Bainbridge, Z.T., Rohde, K.W., Davis, A.M., Masters, B.L., Maughan, M., Devlin, M.J., Mueller, J.F., Schaffelke, B. 2009. Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. *Environmental Pollution*. 30: 1-15.

Lima, P.D., Viana, P. André S., Chelinho, S., Costa, C., Ribeiro, R., Sousa, J.P., Fialho, A.M., Viegas, C.A. 2009. Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: The effectiveness of bioaugmentation and biostimulation Approaches. *Chemosphere*.74: 187–192.

Lin, C., Lerch, R., Garrett, H.G. 2008. Biorremediación of Atrazine-Contaminated Soil by Forage Grasses: Transformation, Uptake, and Detoxification.[versión electrónica].*Journal of Environmental Quality*.37: 196-206.

Liu, X., y Parales, E.R. 2009. Bacterial Chemotaxis to Atrazine and Related s-Triazines. *Applied and Environmental Microbiology*. 75: 5481-5482.

Llado, S., Jiménez, N., Viñas, M., Solanas A.M. 2009. Microbial populations related to PAH biodegradation in an aged biostimulated creosote-contaminated soil. *Biodegradation*. 20: 593–601.

Locke, M.A., Weaver, M.A., Zablotowicz, Steinriede, R.W., Bryson, C.T., Cullum, R.F. 2011. Constructed wetlands as a component of the agricultural landscape: Mitigation of herbicides in simulated runoff from upland drainage areas. *Chemosphere*. 83: 1532-1538.

Lopera, M.M., Peñuela, G., Damínguez, M., Mejía, G. 2005. Evaluación de la degradación del plaguicida clorpirifos en muestras de suelo utilizando el hongo *Phanerochaete chrysosporium*. *Revista Facultad de Ingeniería, Universidad de Antioquia*. 33: 58-69.

Ma, Y., Prasad, M.N., Rajkumar, M., Freitas, H. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria and endophytes accelerate phytoremediation of metalliferous soils. *Biotechnology Advances*.29: 248-258.

Madigan, M.T., Martinko J.M., Parker J. 2006. *Brock Biología de los Microorganismos*. Décima Edición, Pearson Prentice Hall, Madrid, España. 625 p.

Madrigal-Monarez, I. 2004. Retención de plaguicidas en suelos de dispositivos Amortiguadores: barreras de hierba y zonas arboladas: Papel de las materias orgánicas. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. 27 pág.

Maier, R.M and Pepper, L.I. 2009. Gerba P.C., Maier R.M and Pepper L.I.(Eds).Earth Environments. Enviromental Microbiology. Inglaterra: Elsevier. Pág. 57-82.

Maldonado, C.E., Rivera, C.M.C., Izquierdo, R.F., Palma, L.D.J. 2010. Efectos de rizósfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. Universidad y Ciencia, Trópico Húmedo. 26(2): 121-136.

Martín, P.F. 2010. Descontaminación de suelos: Técnicas biológicas. Departamento de Edafología y Química Agrícola. Facultad de Ciencias. Universidad de Granada.
<http://edafologia.ugr.es/desconta/bioremediacion.pdf>

Martínez, T.M.A., García, R.M. 2012. Revisión: Aplicaciones ambientalistas de microorganismos inmovilizados. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11(1): 55-73.

Matsubara, M., Lynch, J.M., De Leij, F.A.A.A.M. 2005. A simple screening procedure for selecting fungi with potential for use in the bioremediation of contaminated land. Enzyme & Microbial Technology. 39: 1365-1372.

May, L.C., Pérez G. A., Ruiz, S.E., Ic, C.A.E., García, R.A. 2011. Efecto de niveles de humedad en el crecimiento y potencial hídrico de *Capsicum chinense* Jacq. Y su relación con el desarrollo de *Bemisia tabaci* Genn. Tropical and subtropical agroecosystems.14:3.

McGrath. G., Hinz, C., Sivapalan, M. 2010. Assessing the impact of regional rainfall variability on rapid pesticide leaching potential. *Journal Contaminant Hydrology*. 113: 56-65.

Mehlich, A. 1948. Determination of cation and anion-exchange properties of soils. *Soil Science*. 66: 429-445.

Mendoza, C.A. 2011. Información General sobre Herbicidas. Dirección General de Investigación sobre la contaminación Urbana y Regional. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales.

http://www.ine.gob.mx/descargas/bioseguridad/2011_simp_ogm_tolerancia_pres1.pdf

Mihelcic, J.R. y Zimmerman, J.B. 2012. *Ingeniería Ambiental: fundamentos, sustentabilidad, diseño*. Alfaomega grupo editor, México. Pág. 60.

Mishra, P.N.R., Singh, K.R., Jaiswal, K.H., Singh, K.M., Yanni, G.Y., Dazzo, B.F. 2008. Rice–Rhizobia Association: Evolution of an Alternate Niche of Beneficial Plant–Bacteria Association. Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (Eds). *Plant-Bacteria Interactions*. Pág.165-188.

Mnasri, B., Fatma Tajini, F., Trabelsi, M., Aouani M.E., Mhamdi, R. (2007). *Rhizobium gallicum* as an efficient symbiont for bean cultivation. *Agronomy for Sustainable Development*. 27: 331-336.

Monard, C., Martin, L.F., Vecchiato, C., Francez, A.J., Vandenkoornhuysse, P., Binet, F. 2008. Combined effect of bioaugmentation and bioturbation on atrazine degradation in soil. *Soil Biology & Biochemistry*. 40: 2253–2259.

Mondragón, P.M.H., Ruiz, O.N., Talbya, G.A., Juárez, R.C., Curiel, Q.E., Galíndez, M.J. 2008. Chemostat selection of a bacterial community able to degrade s-triazinic compounds: continuous simazine biodegradation in a multi-stage packed bed biofilm reactor. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 35(7): 767-776.

Monsanto Argentina (2002).Ficha de Seguridad de Atrazina Equipagro.Disponible en: Proficol S.A. (2008). Ficha de seguridad de productos de Atrazina. Disponible en: http://mercadeo.proficol.com/hojaseg/Atrazina_500_SC.pdf

Mora, E., Toro, Osorio, E. 2007. Efectividad de cepas de *Rhizobium* en el desarrollo y productividad de variedades de *Phaseolus vulgaris*. XVII Congreso Venezolano de Botánica. 12: 615-618.

Morán-Diez, M.E. 2008. Aislamiento, caracterización y análisis funcional del gen Thpg 1 de *Trichoderma harzianum*. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. Universidad de Salamanca, España. 5-12 pág.

Mordaunt, C., Gevao, B., Jones, K., & Semple, K. 2005. Formation of non-extractable pesticides residues: observations on compound differences, measurement and regulatory issues. *Environmental Pollution*. 133: 25–34.

Muñoz, V. E.E., Rubio, H. D., Bernal, L. I., Garza, G. R., Jacinto, H.C. 2009. Caracterización de genotipos nativos de frijol del estado de Hidalgo, con base a calidad del grano. *Agricultura Técnica en México*. 35(4): 426-435.

NOM-021-RECNAT-2000. Norma Oficial Mexicana, que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de los suelos. Estudios, muestreo y análisis.

NOM-112-SSA1-1994. Norma Oficial Mexicana, que establece bienes y servicios. Determinación de bacterias coliformes. Técnica del número más probable.

<http://bibliotecas.salud.gob.mx/gsdl/collect/nomssa/index/assoc/hash8ceb.dir/doc.pdf> [Última consulta 13 Julio 2012]

Ortiz, V.B., Ortiz, S.C.A. 1988. Edafología. Universidad Autónoma de Chapingo 7a. edición. Departamento de suelos, México. Pág. 19.

Panna, 2010.

<http://www.panna.org/sites/default/files/AtrazineReportBig2010.pdf>

<http://www.panna.org/resources/specific-pesticides/atrazine>

Panuwet, P., Restrepo, P.A., Magumbola, M., Junga, K.Y., Montesano, M.A., Needham, L.L., Boyd, B.D. 2010. An improved high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometric method to measure

atrazine and its metabolites in human urine. *Journal of Chromatography*. 878: 957–962.

Pathak, J.R. K. and A. K. Dikshit, A.K. 2012. Atrazine and its Use. *International Journal of Research in Chemistry and Environment*. 2(1): 1-6.

Peralta, P. M.R., Volke, S. T.L. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 11(1): 75-88.

Pérez, A.B., Castañeda, A. D., Castellanos, T.G., Jiménez, S.T., Armando Tapia, H. A., Martínez, C. D. 2011. Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. *Terra Latinoamericana*. 29(1): 95-102.

Pérez, B.Y., Cantillo, P.T., Ramos, R.E., González G.M., López, M.M. 2009. Prospección de hongos de suelo con potencialidades para el control biológico en suelos de agroecosistemas cubanos. *Fitosanidad*.13: 3-5.

Pimentel, D. 2009. Environmental and economic costs of the application of pesticides primarily in the United States. In: Peshin R, Dhawan (Eds). *Integrated Pest Management: Innovation- Development Process*. Springer Science, Berlin-New York. Pág. 89-110.

PNUMA: Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente. 2001. Convenio de Estocolmo sobre contaminantes orgánicos persistentes. <http://redalyc.uaemex.mx/pdf/539/53906901.pdf>

Pochon, J., Tardieux, Y. 1962. *Techniques d'Analyse en Microbiologie du sol*. Editurial de Tourelle, París, France. Pág. 35.

Podile, R.A., Kishore, K. 2006. Plant growth-promoting rhizobacteria. Gnanamanickam, S.S. (Ed.). *Plant-Associated Bacteria*. 195-230 pág.

Prado, B., Duwig, C., Hidalgo, C., Gómez, D., Yee, H., Prat, C., Esteves, M., Etchevers, J.D. 2007. Characterization, functioning and classification of two volcanic soils profiles under different land uses in Central Mexico. *Geoderma*. 139: 300-313.

Prasad, M.N.V. 2011. A State-of-the Art-report on Biorremediación, its Applications to Contaminated sites in India. Universidad of Hyderabad, Hyderabad Ministry of Evironment & Forests. Government of India. Pág. 8, 18 y 52.

Prasad, M.N.V. y Katiyar, S.C. 2010. Drill cuttings and fluids of fossil fuel exploration in North-Eastern India: environmental concern and mitigation options. *Current Science*. 98: 1566-156.

Prata, F., Lavorenti A., Vanderborght, J., Burauel, P, Vereecken, H. 2003. Miscible displacement, sorption and desorption of atrazine in a Brazilian Oxisol. *Vadose Zone Journal*. 2: 728-738.

Proficol S.A. (2008). Ficha de seguridad de productos de Atrazina. Disponible en: http://mercadeo.proficol.com/hojaseg/Atrazina_500_SC.pdf

Przybulewska, K. and Sienicka, K. 2008. Decomposition of atrazine by microorganism isolated from long-term herbicide experimet soil. Ecological Chemistry and Endengineering. 15: 501-511.

Quinto, C., Cárdenas, L. 2007. Diálogo para ganar: interacción simbiótica entre una bacteria del suelo y el frijol. Biotecnología. 14: 273-280.

Rai, U. N., Pandey, K., Sinha, S., Sing, A., Saxena, R., Gupta, D.K. 2004. Revegetating fly ash landfills with *Prosopis juliflora* L.: impact of different amendments and *Rhizobium* inoculation. Environment International. 30(3): 293-300.

Raina, J., Tapiolas, D.M., Willis, B., Bourne, D. 2009. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. Applied and Environmental Microbiology 75: 3492–3501.

Rao, M.A., Scelza, R., Scotti, R., Gianfreda, I. 2010. Role of Enzymes in the Remediation of Polluted Environments. Journal soil science plant nutrition. 10 (3): 333- 353.

RAPAL, 2012:

http://www.rapaluruaguay.org/agrotoxicos/Prensa/La_lista_de_listas.pdf

Raymundo, E., Nikolskii, I., Duwig, C., Prado, B., Hidalgo, C., Gavi, F. 2009. Transporte de atrazina en un andosol y un versitol de México, Interciencia. 34: 330-337.

Raymundo-Raymundo, E. 2008. Parámetros de transporte de atrazina en un andosol y un vertisol de México. Tesis de Doctorado en Hidrociencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 45-48 pág.

Razak, A.A., Bachman, G., and Farrag, R. 1999. Activites of microflora in soils of upper and lower Egypt. *The African Journal of Mycology and Biotechnology*. 98: 2557-2551.

Reporte meteorológico universitario de la estación meteorológica del Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. 2009. <http://www.uaeh.edu.mx/principal/clima/index.html>. [Última consulta 13 julio 2012]

Rey, M., Llobell, A., Monte, E., Scala, F., Lorito, M. 2004. Genomics of *Trichoderma*. *Applied Mycology and Biotechnology*. 4: 225-248.

Rhine, E., Fuhrmann, J., & Radosevich, M. 2003. Microbial community response to atrazine exposure and nutrient availability: Linking degradation capacity to community structure. *Journal Microbial Ecology*. 46: 145-160.

Richardson, J. S., Hynes, M. F., Oresnik, I. J. 2004. A genetic locus necessary for rhamnose uptake and catabolism in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii*. *Journal of Bacteriology* 186: 8433-8442.

Riddell, R.W.1950 Permanent strained mycological preparation obtained by slide cultures. *Micología*. 82: 265-270.

Rieger, P.G., Meier, H.M., Gerle, M., Vogt, U., Groth, T., Knackmuss, H.J. 2002. Xenobiotics in the environment: present and future strategies to obviate the problem of biological persistence. *Journal of Biotechnology*. 94: 101-123.

Rinnan, R., Michelsen, A., Bååth, E., Jonasson, S. 2007. Mineralization and carbon turnover in subarctic heath soil as affected by warming and additional litter. *Soil Biology and Biochemistry*. 39: 3014-3023.

Robinson, R.A.1996. Return to Resistance: Breeding Crops to Reduce Pesticide Dependence. Davis, CA, agAccess. United States of America. Pág. 47-61.

Rodríguez, H., Rodríguez, J. 2002. Métodos de análisis de suelos y plantas, Criterios de interpretación, Trillas, D.F. México. Pág. 31-78.

Rodríguez, V.M., Cory, S.D.A. 2005. Sustained exposure to the widely used herbicide atrazine: altered function and loss of neurons in brain monoamine systems. *Environmental Health Perspectives*. 113: 708-715.

Rondón, B.I.S., Pardo, H.D., Eslava, M.P.R. 2010. Effects of herbicides on immune system: an approach to fish. *Revista Complutense de Ciencias Veterinarias* 4(1): 1-22.

Ruiz-Nájera, R.E. 2001. Efecto de niveles de abono verde sobre la degradación de atrazina en un suelo agrícola no esterilizado y esterilizado. Tesis Doctoral en Ciencias Área Biotecnología. Universidad de Colima, Tecomán, Colima, México. 11-27 pág..

Rusiecki, J.A., De Roos, A., Lee, J.W., Dosemeci, M., Lubin, J.H., Hopin, A.J., Blair, A., Alavanja, R.C.M. 2004. Cancer Incidence Among Pesticide Applicators Exposed to Atrazine in the Agricultural Health study. Journal of the National Cancer Institute. 96: 1375-1382.

Saad, I., Castillo, S.V., Rebolledo, D. 2009. Fitorremediación: Estudio de inteligencia tecnológica competitiva. SINNCO.1-9.

Sánchez, L.L.C., Arguello, A.H. 2006. Capacidad de bacterias halófilas para capturar sodio in vitro y su posible aplicación en biorremediación en suelos salidos-sódicos. Revista Nova. 4(6): 19-32.

Sánchez, M.M.J., Sánchez, C.M.1984. Los Plaguicidas. Adsorción y Evolución en el Suelo, Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Ceresnet, Salamanca, España. Pág. 27.

Sánchez, S.K. y Betanzos, O. P. 2006. Aspectos socioeconómicos y culturales en el uso de agroquímicos y plaguicidas en los Altos de Morelos, México. Revista Iberoamericana de Economía Ecológica. 3: 33-47.

Sangabriel, W., Ferrera, C.R., Trejo, A.D., Mendoza, L. M.R., Cruz, S.J.S., López, O.C., Delgadillo, M. J., Alarcón, A. 2006. Tolerancia y capacidad

de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. Revista Internacional de Contaminación Ambiental. 22 (2): 63-73.

Sangerman, J.D.M.A., Shwenstesius, R.R., Damián, H.M.A., Larqué, S.B.S. 2010. Consideraciones e importancia social en torno al cultivo del frijol en el centro de México. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas. 1: 363-380.

Santana-Jiménez, M. 2007. Fijación Biológica de Nitrógeno por Leguminosas Arbóreas para Sombra de Café en Puerto Rico. Tesis de Maestro en Ciencias en Agronomía. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 56 pág.

Scheunert, I. 1992. Transformation and degradation of pesticides in soil. Ebing, W (Ed.). En: Chemistry of Plant Protection. Springer-Verlag. Vol.8.

Schuster, A., Schmoll, M. 2010. Biology and biotechnology of Trichoderma. Applied Microbiology & Biotechnology. 87 (3): 787.

Scott, C., Lewis, E.S., Milla, R., Taylor, M.C., Rodgers, J.W.A., Dumsday, G., Brodie, E.J., Oakeshott G.J., Russell, J.R. 2010. A free-enzyme catalyst for the bioremediation of environmental atrazine contamination. Journal of Environmental Management. 91: 2075-2078.

SECOFI: Secretaría de Comercio y Fomento Industrial. 2002. Norma Mexicana NMX-FF-038-SCFI. 2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fabaceas (*Phaseolus*

vulgaris L). Especificaciones y métodos de prueba. Dirección General de Normas. México, D. F. 26 pág.

SEMARNAT. www.semarnat.gob.mx/gestionambiental/Materiales%20y%20Actividades%20Riesgosas/plafest/clasificaciones.pdf.

SENASICA 2011. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA)
<http://www.senasica.gob.mx/?doc=22993>

Sene, L. Converti, A., Ribeiro, G.A.S., Cássia, R. 2010. New Aspects on Atrazine Biodegradation. Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal. 53: 487-496.

Sistema Meteorológico Nacional, 2011.
http://smn.cna.gob.mx/index.php?option=com_content&view=article&id=103&Itemid=68

Smith, D., Alvey, S., Crowley, E.D. 2005. Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. Microbiology Ecology. 53: 265–273.

So, Y.K., y Kyung S.C. 2009. Isolation and Characterization of a Plant Growth-Promoting Rhizobacterium, *Serratia* sp. SY5. Journal Microbiology. Biotechnology. 19: 1431-1438.

Soni, R., Kumari, S., Zaidi, M.G.H., Shouche S.Y., Goel, R. 2008. Practical Applications of Rhizospheric Bacteria in Biodegradation of Polymers from Plastic Wastes. Ahmad, I., Pichtel, J., Hayat, S. (Eds.), Plant-Bacteria Interactions. Pág. 235.

Spaczyński, M., Seta, K. A., Patrzył, P., Betlej, A., Skórzyńska, P.E. 2012. Phytodegradation and Biodegradation in Rhizosphere as efficient methods of reclamation of soil contaminated by organic chemicals (a Review). Acta Agrophysica. 19(1): 155-169.

Tang, J. Liu, L., Hu, S., Chen, Y., Chen, J. 2009. Improved degradation of organophosphate dichlorides by *Trichoderma atroviride* transformants generated by restriction enzyme-mediated integration (REMI). Bioresource Technology. 100: 480-483.

Tappin, I.A, Loughnane J.P., McCarthy, J.A., Fitzsimons, F.M. 2012. Removal of atrazine from river waters by indigenous microorganisms. Environmental Chemistry Letters. 10: 89-96.

Torres, D., y Capote, T. 2004. Agroquímicos un problema ambiental global: uso de los análisis químicos como herramienta para el monitoreo ambiental. Ecosistemas, Revista Científica y Técnica de Ecología y Medio Ambiente. 13(3): 1-5.

UN, 2009. United Nations. Department of Economic and Social Affairs. Population Division World Population Prospects. Population Newsletter

Valavanidis, A. y Vlachogianni, Th. 2010. Agricultural pesticides: Ecotoxicological studies and environmental risk assessment. Science Advances on Environment, Toxicology & Ecotoxicology Issues. [www.chem-tox-ecotox.org](http://chem-tox-ecotox.org). http://chem-tox-ecotox.org/wp/wp-content/uploads/2010/11/07-Pesticides-06_11_2010.pdf

Vásquez, M.C., Guerrero, F. J.T., Quintero, A.P. 2010. Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. Revista Colombiana de Biotecnología. 12(1): 141-157.

Vidal-Fernández, J.E. 2012. Respuesta de la simbiosis tripartita *Rhizobium*-leguminosa- micorriza arbuscular ante vanadio y níquel. Tesis de Maestría en Ciencias en Edafología. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Texcoco, Estado de México, 53 pág.

Villareal, H. 2006. Ecosistemas terrestres naturales. En: Cháves, M. E. Y M. Santamaría. (eds.). 2006. Informe sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998 – 2004. Instituto de investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. DC. Colombia. Tomo I. Pág. 54-61.

Waksman, S. A. 1922. A method of counting the number of fungi in soil. *Journal of Bacteriology*. 7(3):341-399.

Walkley, A., and Black, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining organic carbon in soils: Effect of variations in

digestion conditions and of inorganic soil constituents. Soil Science. 63:251-263.

Wissuwa, M., Mazzola, M., Picard, C. 2009. Novel approaches in plant breeding for rhizosphere-related traits. Plant Soil.321:409–430.

Wu, W., Quirindongo, M., Sass, J., Wetzler, A. 2010. Still Poisoning the Well: Atrazine Continues to Contaminate Surface Water and Drinking Water in the United States, The Heart's Best Defense, United States. Pág. 6.

Xiao, P., T. Mori, I. Kamei and R. Kondo. 2011. Metabolismo forganochlorine pesticide heptachlorand its metabolite heptachlor epoxide by white rot fungi, belonging to genus *Phlebia*. FEMS Microbiology Letters 314(2): 140–146.

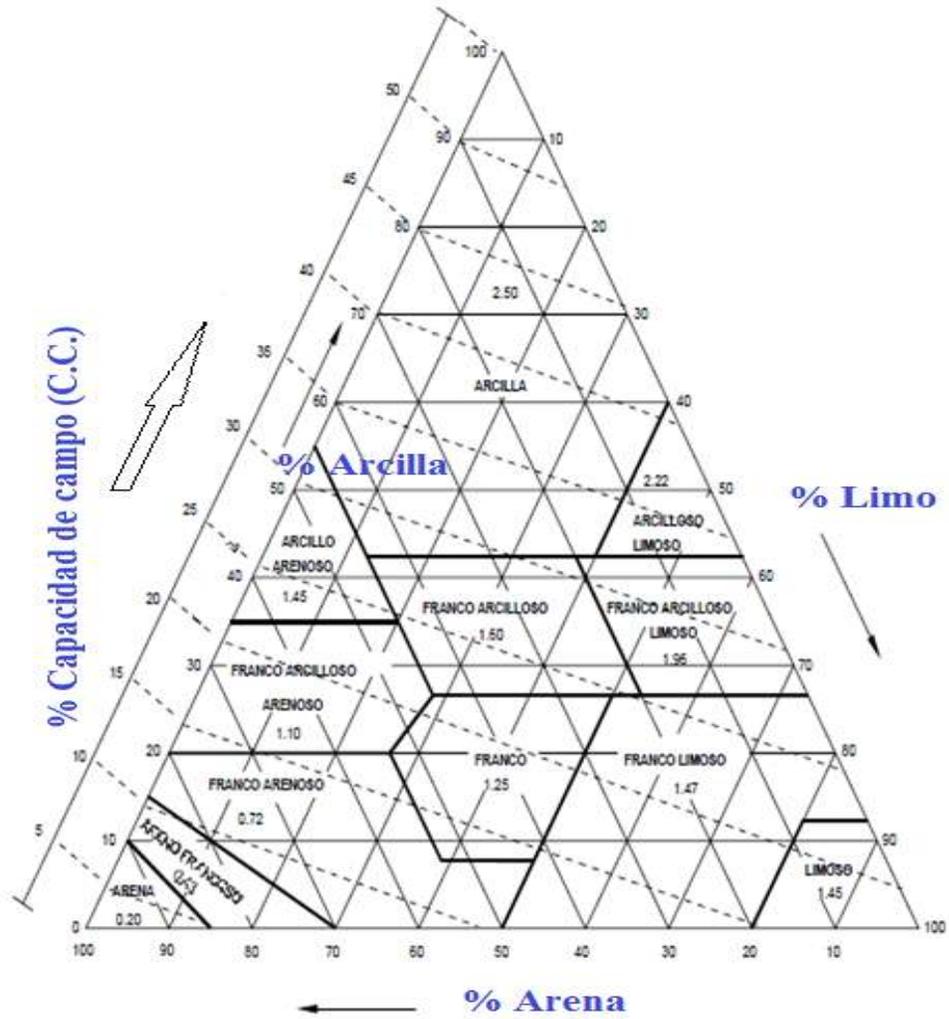
Yang, C., Yang, .L., Kun, Z., Wang, X., Cuiqing, .M., Hongzhi, T., Ping, X. 2010. Atrazine Degradación by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comaonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. Biodegradation. 21: 97-105.

Young, J.M., y Crawford, J.W. 2004. Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. Science. 204: 1634-1637.

Zafar, S., Aqil, F., Ahmad, I. 2007. Metal tolerance and biosurption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural Soil. Bioresour Technology. 98 (13): 2557-2561.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Triángulo de textura para calcular la capacidad de campo en suelo



Anexo 2. Reportes del Análisis de Varianza en laboratorio e invernadero

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 1 23/04/2013 09:45:00 a.m.

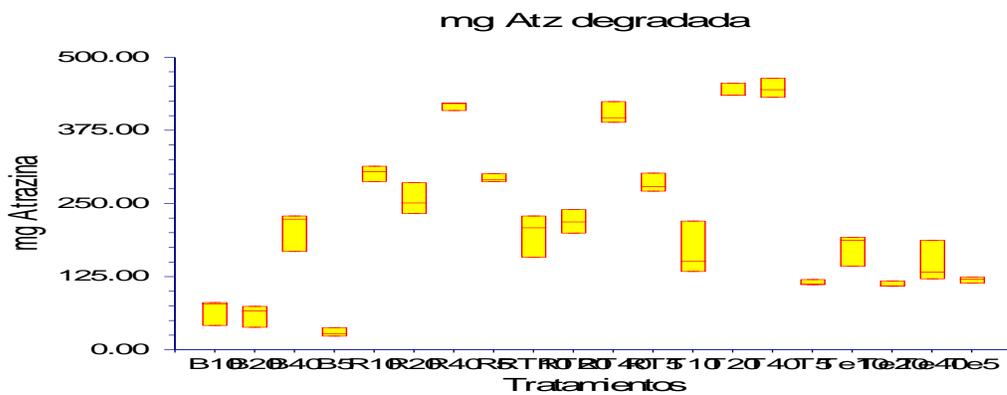
Base de datos Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Predicciones y análisis de residuos

	Valor	Nivel	Decisión
Predicciones			(0.05)
Normalización de residuales:			
Asimétricas	0.2947	0.768239	Aceptar
Curtosis	0.8715	0.383486	Aceptar
General	0.8463	0.654970	Aceptar
Varianza modificada de Levene	0.5545	0.915938	Aceptar

Seccion grafica de caja



Cuadrados medios esperados

Fuente	valor	Denominator	Cuadrado medio
Variación (FV)	GL	Fijo?	
A: C1	19	si	S(A)
S(A)	40	No	S(A)

Nota: Cuadrado medio esperado para cada caso de frecuencia balanceada.

Tabla de análisis de varianza

FV	Suma de Cuadrados (SM)	Cuadrado medio (CM)	F-cal	Nivel proba.	Alfa (0.05)	
A: C1	19	959158.3	50482.02	101.85	0.000000*	1.000000
S(A)	40	19825.81	495.6453			
Total	59	978984.1				
(Ajust)						
Total	60					

* Factor de significancia alfa = 0.05

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 2 23/04/2013 09:45:00 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

ANOVA simple de Kruskal-Wallis

Hipótesis

H0: Todas las medias son iguales.

Ha: Al menos 2 medianas son diferentes.

Resultados

Método	GL	Ji-Cuadrada (H)	Nivel	Decision (0.05)
No corregida	19	57.62951	0.000009	Rechazada H0
Corregida	19	57.62951	0.000009	Rechazada H0

Conjuntos relacionados 0

Factor de Multiplicidad 0

Detalle del grupo

Grupo	Repeticiones	SC	Media	Valor Z	Mediana
B10	3	22.00	7.33	-2.3573	78.62894
B20	3	17.00	5.67	-2.5269	67.12675
B40	3	93.00	31.00	0.0509	224.2121
B5	3	6.00	2.00	-2.9000	27.62825
R10	3	138.00	46.00	1.5772	305.13
R20	3	115.00	38.33	0.7971	251.6793
R40	3	156.00	52.00	2.1877	421.5896
R5	3	131.00	43.67	1.3398	291.1203
RT10	3	88.00	29.33	-0.1187	209.2593
RT20	3	97.00	32.33	0.1865	219.3237
RT40	3	153.00	51.00	2.0859	397.5385
RT5	3	125.00	41.67	1.1362	279.9632
T10	3	76.00	25.33	-0.5257	151.6678
T20	3	172.00	57.33	2.7304	435.8408
T40	3	173.00	57.67	2.7643	445.3301
T5	3	41.00	13.67	-1.7128	113.377
Te10	3	77.00	25.67	-0.4918	187.8422
Te20	3	36.00	12.00	-1.8824	110.1219
Te40	3	63.00	21.00	-0.9667	133.7589
Te5	3	51.00	17.00	-1.3737	121.5436

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 3 23/04/2013 09:45:00 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

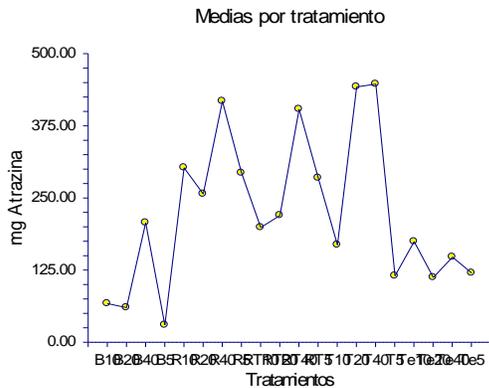
Medias y efectos del error estándar (EE)

FV	repeticiones	Media	EE	Efecto
All	60	223.3364		223.3364

A: C1

B10	3	67.0079	12.8536	-156.3285
B20	3	59.95706	12.8536	-163.3793
B40	3	207.0662	12.8536	-16.27023
B5	3	29.69098	12.8536	-193.6454
R10	3	302.2429	12.8536	78.90652
R20	3	256.7403	12.8536	33.40388
R40	3	417.5677	12.8536	194.2313
R5	3	293.1485	12.8536	69.81213
RT10	3	198.7616	12.8536	-24.5748
RT20	3	219.523	12.8536	-3.813358
RT40	3	403.6424	12.8536	180.306
RT5	3	284.4184	12.8536	61.08197
T10	3	168.5607	12.8536	-54.77571
T20	3	442.3395	12.8536	219.0031
T40	3	447.182	12.8536	223.8456
T5	3	114.9452	12.8536	-108.3912
Te10	3	174.3655	12.8536	-48.97094
Te20	3	112.2	12.8536	-111.1364
Te40	3	147.481	12.8536	-75.85538
Te5	3	119.8873	12.8536	-103.4491

Gaficos de medias



Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 4 23/04/2013 09:45:00 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Prueba de comparación múltiple de Duncan's

Variable de respuesta: C2

FV A: C1

Alfa=0.050 variable de error =S(A) GL=40 EEM=495.6453

Grupo	repeticiones	medias	Diferencias entre grupos
B5	3	29.69098	Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B20	3	59.95706	Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B10	3	67.0079	Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te20	3	112.2	B5, B20, B10, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
T5	3	114.9452	B5, B20, B10, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te5	3	119.8873	B5, B20, B10, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40

Te40	3	147.481	B5, B20, B10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
T10	3	168.5607	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te10	3	174.3655	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
RT10	3	198.7616	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B40	3	207.0662	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
RT20	3	219.523	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
R20	3	256.7403	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, T40, R40, T20, T40
RT5	3	284.4184	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, RT40, R40, T20, T40
R5	3	293.1485	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, RT40, R40, T20, T40
R10	3	302.2429	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, T40, R40, T20, T40
RT40	3	403.6424	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10
R40	3	417.5677	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 5 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Prueba de comparación múltiple de Duncan's

Variable de respuesta: C2

FV A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453

Grupo	rept.	Medias	Diferencia entre grupos
T20	3	442.3395	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10
T40	3	447.182	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10

Nota:

Comparación múltiple para las diferencias entre todos los pares. Según Hsu(1996, pág 130), la tasa de error por grupo especificado (alfa) puede ser exagerado, se recomienda el método de Tukey-Kramer's

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 6 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer

Response: C2

Term A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor crítico=5.3575

Grupo	repeti.	Media	Diferencia entre grupos
B5	3	29.69098	Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B20	3	59.95706	Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B10	3	67.0079	Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te20	3	112.2	B5, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
T5	3	114.9452	B5, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te5	3	119.8873	B5, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te40	3	147.481	B5, B20, B10, RT20, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
T10	3	168.5607	B5, B20, B10, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
Te10	3	174.3655	B5, B20, B10, R20, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
RT10	3	198.7616	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, RT5, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
B40	3	207.0662	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, RT5,

RT20	3	219.523	R5, R10, RT40, R40, T20, T40 B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, R5, R10, RT40, R40, T20, T40
R20	3	256.7403	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT40, R40, T20, T40
RT5	3	284.4184	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT40, R40, T20, T40
R5	3	293.1485	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, RT40, R40, T20, T40
R10	3	302.2429	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, T40, R40, T20, T40,
RT40	3	403.6424	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10
R40	3	417.5677	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10
T20	3	442.3395	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 7 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Prueba de comparación multiple Tukey-Kramer

Response: C2

Term A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Grupo	repeti.	Medias	Diferencias entre grupos
T40	3	447.182	B5, B20, B10, Te20, T5, Te5, Te40, T10, Te10, RT10, B40, RT20, R20, RT5, R5, R10

Nota:

Pruebas de comparación múltiple entre todas las medias.

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 8 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

Variable A: C1

Alfa=0.050, Error =S(A), GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparación	L 95.0%	U 95.0%	Resulta.		
Grupos	Repeti.	MS.C.I.	Dife	Simult.C.I.	
B10	3	67.0079			
- B20	3	59.95706	-61.81278	7.050839	75.91446
- B40	3	207.0662	-208.9219	-140.0583	-71.19466 L
- B5	3	29.69098	-31.5467	37.31693	106.1805
- R10	3	302.2429	-304.0987	-235.235	-166.3714 L
- R20	3	256.7403	-258.596	-189.7324	-120.8688 L

- R40	3	417.5677	-419.4234	-350.5598	-281.6961	L
- R5	3	293.1485	-295.0042	-226.1406	-157.277	L
- RT10	3	198.7616	-200.6173	-131.7537	-62.89008	L
- RT20	3	219.523	-221.3788	-152.5152	-83.65152	L
- RT40	3	403.6424	-405.4981	-336.6345	-267.7708	L
- RT5	3	284.4184	-286.2741	-217.4105	-148.5469	L
- T10	3	168.5607	-170.4164	-101.5528	-32.68917	L
- T20	3	442.3395	-444.1953	-375.3316	-306.468	L
- T40	3	447.182	-449.0377	-380.1741	-311.3105	L
- T5	3	114.9452	-116.8009	-47.93727	20.92635	
- Te10	3	174.3655	-176.2212	-107.3576	-38.49394	L
- Te20	3	112.2	-114.0557	-45.19209	23.67154	
- Te40	3	147.481	-149.3367	-80.47312	-11.6095	L
- Te5	3	119.8873	-121.743	-52.87938	15.98424	
B20	3	59.95706				
- B10	3	67.0079	-75.91446	-7.050839	61.81278	
- B40	3	207.0662	-215.9727	-147.1091	-78.2455	L
- B5	3	29.69098	-38.59754	30.26608	99.12971	
- R10	3	302.2429	-311.1495	-242.2859	-173.4222	L
- R20	3	256.7403	-265.6469	-196.7832	-127.9196	L
- R40	3	417.5677	-426.4742	-357.6106	-288.747	L
- R5	3	293.1485	-302.0551	-233.1915	-164.3279	L
- RT10	3	198.7616	-207.6682	-138.8045	-69.94092	L
- RT20	3	219.523	-228.4296	-159.566	-90.70236	L
- RT40	3	403.6424	-412.5489	-343.6853	-274.8217	L
- RT5	3	284.4184	-293.325	-224.4613	-155.5977	L
- T10	3	168.5607	-177.4673	-108.6036	-39.74001	L
- T20	3	442.3395	-451.2461	-382.3825	-313.5189	L
- T40	3	447.182	-456.0885	-387.2249	-318.3613	L
- T5	3	114.9452	-123.8517	-54.98811	13.87551	
- Te10	3	174.3655	-183.272	-114.4084	-45.54478	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 9 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico =5.3575

Comparación			L 95.0%		U 95.0%	
Groups	rep.	Medias	SM.C.I.	Dife.	SM.C.I.	Result
- Te20	3	112.2	-121.1065	-52.24293	16.6207	
- Te40	3	147.481	-156.3876	-87.52396	-18.66034	L
- Te5	3	119.8873	-128.7938	-59.93022	8.933402	
B40	3	207.0662				
- B10	3	67.0079	71.19466	140.0583	208.9219	U
- B20	3	59.95706	78.2455	147.1091	215.9727	U
- B5	3	29.69098	108.5116	177.3752	246.2388	U
- R10	3	302.2429	-164.0404	-95.17675	-26.31313	L
- R20	3	256.7403	-118.5377	-49.67411	19.18952	
- R40	3	417.5677	-279.3651	-210.5015	-141.6379	L
- R5	3	293.1485	-154.946	-86.08236	-17.21873	L
- RT10	3	198.7616	-60.55904	8.304578	77.1682	
- RT20	3	219.523	-81.32049	-12.45687	56.40675	
- RT40	3	403.6424	-265.4398	-196.5762	-127.7126	L
- RT5	3	284.4184	-146.2158	-77.3522	-8.488575	L
- T10	3	168.5607	-30.35814	38.50548	107.3691	
- T20	3	442.3395	-304.137	-235.2734	-166.4097	L
- T40	3	447.182	-308.9794	-240.1158	-171.2522	L

- T5	3	114.9452	23.25738	92.121	160.9846	U
- Te10	3	174.3655	-36.16291	32.70071	101.5643	
- Te20	3	112.2	26.00257	94.86619	163.7298	U
- Te40	3	147.481	-9.278467	59.58516	128.4488	
- Te5	3	119.8873	18.31528	87.17889	156.0425	U
B5	3	29.69098				
- B10	3	67.0079	-106.1805	-37.31693	31.5467	
- B20	3	59.95706	-99.12971	-30.26608	38.59754	
- B40	3	207.0662	-246.2388	-177.3752	-108.5116	L
- R10	3	302.2429	-341.4156	-272.5519	-203.6883	L
- R20	3	256.7403	-295.9129	-227.0493	-158.1857	L
- R40	3	417.5677	-456.7403	-387.8767	-319.0131	L
- R5	3	293.1485	-332.3212	-263.4576	-194.5939	L
- RT10	3	198.7616	-237.9342	-169.0706	-100.207	L
- RT20	3	219.523	-258.6957	-189.8321	-120.9684	L
- RT40	3	403.6424	-442.815	-373.9514	-305.0878	L
- RT5	3	284.4184	-323.591	-254.7274	-185.8638	L
- T10	3	168.5607	-207.7333	-138.8697	-70.0061	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 10 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

Factor A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparición		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	Rep.	Medias	SM.C.I.	Difference	SM.C.I.	Result
- T20	3	442.3395	-481.5122	-412.6486	-343.7849	L
- T40	3	447.182	-486.3546	-417.491	-348.6274	L
- T5	3	114.9452	-154.1178	-85.2542	-16.39058	L
- Te10	3	174.3655	-213.5381	-144.6745	-75.81087	L
- Te20	3	112.2	-151.3726	-82.50901	-13.64539	L
- Te40	3	147.481	-186.6537	-117.79	-48.92643	L
- Te5	3	119.8873	-159.0599	-90.1963	-21.33268	L
R10	3	302.2429				
- B10	3	67.0079	166.3714	235.235	304.0987	U
- B20	3	59.95706	173.4222	242.2859	311.1495	U
- B40	3	207.0662	26.31313	95.17675	164.0404	U
- B5	3	29.69098	203.6883	272.5519	341.4156	U
- R20	3	256.7403	-23.36098	45.50265	114.3663	
- R40	3	417.5677	-184.1884	-115.3247	-46.46112	L
- R5	3	293.1485	-59.76923	9.094395	77.95802	
- RT10	3	198.7616	34.61771	103.4813	172.345	U
- RT20	3	219.523	13.85626	82.71989	151.5835	U
- RT40	3	403.6424	-170.2631	-101.3994	-32.53581	L
- RT5	3	284.4184	-51.03907	17.82455	86.68818	
- T10	3	168.5607	64.81861	133.6822	202.5459	U
- T20	3	442.3395	-208.9602	-140.0966	-71.23299	L
- T40	3	447.182	-213.8027	-144.939	-76.07542	L
- T5	3	114.9452	118.4341	187.2978	256.1614	U
- Te10	3	174.3655	59.01384	127.8775	196.7411	U
- Te20	3	112.2	121.1793	190.0429	258.9066	U
- Te40	3	147.481	85.89828	154.7619	223.6255	U
- Te5	3	119.8873	113.492	182.3557	251.2193	U
R20	3	256.7403				
- B10	3	67.0079	120.8688	189.7324	258.596	U

- B20	3	59.95706	127.9196	196.7832	265.6469	U
- B40	3	207.0662	-19.18952	49.67411	118.5377	
- B5	3	29.69098	158.1857	227.0493	295.9129	U
- R10	3	302.2429	-114.3663	-45.50265	23.36098	
- R40	3	417.5677	-229.691	-160.8274	-91.96377	L
- R5	3	293.1485	-105.2719	-36.40825	32.45537	
- RT10	3	198.7616	-10.88494	57.97868	126.8423	

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 11 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Database Bioaumentación en laboratorio

Response C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparación			L 95.0%		U 95.0%	
Grupos	Rep.	Medias	S.C.I.	Difere.	S.C.I.	Result
- RT20	3	219.523	-31.64638	37.21724	106.0809	
- RT40	3	403.6424	-215.7657	-146.9021	-78.03845	L
- RT5	3	284.4184	-96.54172	-27.67809	41.18553	
- T10	3	168.5607	19.31597	88.17959	157.0432	U
- T20	3	442.3395	-254.4629	-185.5993	-116.7356	L
- T40	3	447.182	-259.3053	-190.4417	-121.5781	L
- T5	3	114.9452	72.93149	141.7951	210.6587	U
- Te10	3	174.3655	13.5112	82.37482	151.2384	U
- Te20	3	112.2	75.67667	144.5403	213.4039	U
- Te40	3	147.481	40.39564	109.2593	178.1229	U

- Te5	3	119.8873	67.98938	136.853	205.7166	U
R40	3	417.5677				
- B10	3	67.0079	281.6961	350.5598	419.4234	U
- B20	3	59.95706	288.747	357.6106	426.4742	U
- B40	3	207.0662	141.6379	210.5015	279.3651	U
- B5	3	29.69098	319.0131	387.8767	456.7403	U
- R10	3	302.2429	46.46112	115.3247	184.1884	U
- R20	3	256.7403	91.96377	160.8274	229.691	U
- R5	3	293.1485	55.55552	124.4191	193.2828	U
- RT10	3	198.7616	149.9424	218.8061	287.6697	U
- RT20	3	219.523	129.181	198.0446	266.9083	U
- RT40	3	403.6424	-54.93831	13.92531	82.78893	
- RT5	3	284.4184	64.28568	133.1493	202.0129	U
- T10	3	168.5607	180.1434	249.007	317.8706	U
- T20	3	442.3395	-93.6355	-24.77187	44.09175	
- T40	3	447.182	-98.47791	-29.61429	39.24933	
- T5	3	114.9452	233.7589	302.6225	371.4861	U
- Te10	3	174.3655	174.3386	243.2022	312.0658	U
- Te20	3	112.2	236.5041	305.3677	374.2313	U
- Te40	3	147.481	201.223	270.0866	338.9503	U
- Te5	3	119.8873	228.8168	297.6804	366.544	U
R5	3	293.1485				
- B10	3	67.0079	157.277	226.1406	295.0042	U
- B20	3	59.95706	164.3279	233.1915	302.0551	U
- B40	3	207.0662	17.21873	86.08236	154.946	U
- B5	3	29.69098	194.5939	263.4576	332.3212	U

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 12 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor crítico=5.3575

Comparación			L 95.0%		U 95.0%	
Grupos	repet.	Medias	S.C.I. Dife.		S.C.I.	Result
- R10	3	302.2429	-77.95802	-9.094395	59.76923	
- R20	3	256.7403	-32.45537	36.40825	105.2719	
- R40	3	417.5677	-193.2828	-124.4191	-55.55552	L
- RT10	3	198.7616	25.52331	94.38693	163.2505	U
- RT20	3	219.523	4.761867	73.62549	142.4891	U
- RT40	3	403.6424	-179.3575	-110.4938	-41.6302	L
- RT5	3	284.4184	-60.13346	8.730159	77.59378	
- T10	3	168.5607	55.72422	124.5878	193.4515	U
- T20	3	442.3395	-218.0546	-149.191	-80.32739	L
- T40	3	447.182	-222.897	-154.0334	-85.16981	L
- T5	3	114.9452	109.3397	178.2034	247.067	U
- Te10	3	174.3655	49.91945	118.7831	187.6467	U
- Te20	3	112.2	112.0849	180.9485	249.8122	U
- Te40	3	147.481	76.80389	145.6675	214.5311	U
- Te5	3	119.8873	104.3976	173.2612	242.1249	U
RT10 3		198.7616				
- B10	3	67.0079	62.89008	131.7537	200.6173	U

- B20	3	59.95706	69.94092	138.8045	207.6682	U
- B40	3	207.0662	-77.1682	-8.304578	60.55904	
- B5	3	29.69098	100.207	169.0706	237.9342	U
- R10	3	302.2429	-172.345	-103.4813	-34.61771	L
- R20	3	256.7403	-126.8423	-57.97868	10.88494	
- R40	3	417.5677	-287.6697	-218.8061	-149.9424	L
- R5	3	293.1485	-163.2505	-94.38693	-25.52331	L
- RT20	3	219.523	-89.62507	-20.76144	48.10218	
- RT40	3	403.6424	-273.7444	-204.8808	-136.0171	L
- RT5	3	284.4184	-154.5204	-85.65678	-16.79315	L
- T10	3	168.5607	-38.66272	30.2009	99.06453	
- T20	3	442.3395	-312.4416	-243.5779	-174.7143	L
- T40	3	447.182	-317.284	-248.4204	-179.5567	L
- T5	3	114.9452	14.9528	83.81642	152.6801	U
- Te10	3	174.3655	-44.46749	24.39614	93.25976	
- Te20	3	112.2	17.69799	86.56161	155.4252	U
- Te40	3	147.481	-17.58305	51.28057	120.1442	
- Te5	3	119.8873	10.0107	78.87432	147.7379	U
RT20	3	219.523				
- B10	3	67.0079	83.65152	152.5152	221.3788	U

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 13 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

VR: C2

FV A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor crítico=5.3575

Comparación			L 95.0%		U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Difference	Simult.C.I.	Result
- B20	3	59.95706	90.70236	159.566	228.4296	U
- B40	3	207.0662	-56.40675	12.45687	81.32049	
- B5	3	29.69098	120.9684	189.8321	258.6957	U
- R10	3	302.2429	-151.5835	-82.71989	-13.85626	L
- R20	3	256.7403	-106.0809	-37.21724	31.64638	
- R40	3	417.5677	-266.9083	-198.0446	-129.181	L
- R5	3	293.1485	-142.4891	-73.62549	-4.761867	L
- RT10	3	198.7616	-48.10218	20.76144	89.62507	
- RT40	3	403.6424	-252.9829	-184.1193	-115.2557	L
- RT5	3	284.4184	-133.759	-64.89533	3.968292	
- T10	3	168.5607	-17.90127	50.96235	119.826	
- T20	3	442.3395	-291.6801	-222.8165	-153.9529	L
- T40	3	447.182	-296.5226	-227.6589	-158.7953	L
- T5	3	114.9452	35.71425	104.5779	173.4415	U
- Te10	3	174.3655	-23.70604	45.15758	114.0212	
- Te20	3	112.23845943	107.3231	176.1867	U	
- Te40	3	147.481	3.178399	72.04202	140.9056	U
- Te5	3	119.8873	30.77214	99.63577	168.4994	U

RT40	3	403.6424				
- B10	3	67.0079	267.7708	336.6345	405.4981	U
- B20	3	59.95706	274.8217	343.6853	412.5489	U
- B40	3	207.0662	127.7126	196.5762	265.4398	U
- B5	3	29.69098	305.0878	373.9514	442.815	U
- R10	3	302.2429	32.53581	101.3994	170.2631	U
- R20	3	256.7403	78.03845	146.9021	215.7657	U
- R40	3	417.5677	-82.78893	-13.92531	54.93831	
- R5	3	293.1485	41.6302	110.4938	179.3575	U
- RT10	3	198.7616	136.0171	204.8808	273.7444	U
- RT20	3	219.523	115.2557	184.1193	252.9829	U
- RT5	3	284.4184	50.36036	119.224	188.0876	U
- T10	3	168.5607	166.218	235.0817	303.9453	U
- T20	3	442.3395	-107.5608	-38.69719	30.16644	
- T40	3	447.182	-112.4032	-43.5396	25.32402	
- T5	3	114.9452	219.8336	288.6972	357.5608	U
- Te10	3	174.3655	160.4133	229.2769	298.1405	U
- Te20	3	112.2	222.5788	291.4424	360.306	U
- Te40	3	147.481	187.2977	256.1613	325.025	U

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 14 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta.: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 valor critico=5.3575

Comparición		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Dife.	Simult.C.I.	Result
- Te5	3	119.8873	214.8915	283.7551	352.6187	U
RT5	3	284.4184				
- B10	3	67.0079	148.5469	217.4105	286.2741	U
- B20	3	59.95706	155.5977	224.4613	293.325	U
- B40	3	207.0662	8.488575	77.3522	146.2158	U
- B5	3	29.69098	185.8638	254.7274	323.591	U
- R10	3	302.2429	-86.68818	-17.82455	51.03907	
- R20	3	256.7403	-41.18553	27.67809	96.54172	
- R40	3	417.5677	-202.0129	-133.1493	-64.28568	L
- R5	3	293.1485	-77.59378	-8.730159	60.13346	
- RT10	3	198.7616	16.79315	85.65678	154.5204	U
- RT20	3	219.523	-3.968292	64.89533	133.759	
- RT40	3	403.6424	-188.0876	-119.224	-50.36036	L
- T10	3	168.5607	46.99406	115.8577	184.7213	U
- T20	3	442.3395	-226.7848	-157.9212	-89.05755	L
- T40	3	447.182	-231.6272	-162.7636	-93.89997	L
- T5	3	114.9452	100.6096	169.4732	238.3368	U
- Te10	3	174.3655	41.18929	110.0529	178.9165	U
- Te20	3	112.2	103.3548	172.2184	241.082	U
- Te40	3	147.481	68.07373	136.9373	205.801	U
- Te5	3	119.8873	95.66747	164.5311	233.3947	U
T10	3	168.5607				
- B10	3	67.0079	32.68917	101.5528	170.4164	U
- B20	3	59.95706	39.74001	108.6036	177.4673	U
- B40	3	207.0662	-107.3691	-38.50548	30.35814	
- B5	3	29.69098	70.0061	138.8697	207.7333	U
- R10	3	302.2429	-202.5459	-133.6822	-64.81861	L
- R20	3	256.7403	-157.0432	-88.17959	-19.31597	L
- R40	3	417.5677	-317.8706	-249.007	-180.1434	L

- R5	3	293.1485	-193.4515	-124.5878	-55.72422	L
- RT10	3	198.7616	-99.06453	-30.2009	38.66272	
- RT20	3	219.523	-119.826	-50.96235	17.90127	
- RT40	3	403.6424	-303.9453	-235.0817	-166.218	L
- RT5	3	284.4184	-184.7213	-115.8577	-46.99406	L
- T20	3	442.3395	-342.6425	-273.7788	-204.9152	L
- T40	3	447.182	-347.4849	-278.6213	-209.7576	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 15 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

Term A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparison			L 95.0%		U95.0%	
Groups	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferenc	Simult.C.I.	Result
- T5	3	114.9452	-15.2481	53.61552	122.4791	
- Te10	3	174.3655	-74.66839	-5.80477	63.05885	
- Te20	3	112.2	-12.50291	56.36071	125.2243	
- Te40	3	147.481	-47.78395	21.07967	89.94329	
- Te5	3	119.8873	-20.19021	48.67342	117.537	
T20	3	442.3395				
- B10	3	67.0079	306.468	375.3316	444.1953	U
- B20	3	59.95706	313.5189	382.3825	451.2461	U
- B40	3	207.0662	166.4097	235.2734	304.137	U

- B5	3	29.69098	343.7849	412.6486	481.5122	U
- R10	3	302.2429	71.23299	140.0966	208.9602	U
- R20	3	256.7403	116.7356	185.5993	254.4629	U
- R40	3	417.5677	-44.09175	24.77187	93.6355	
- R5	3	293.1485	80.32739	149.191	218.0546	U
- RT10	3	198.7616	174.7143	243.5779	312.4416	U
- RT20	3	219.523	153.9529	222.8165	291.6801	U
- RT40	3	403.6424	-30.16644	38.69719	107.5608	
- RT5	3	284.4184	89.05755	157.9212	226.7848	U
- T10	3	168.5607	204.9152	273.7788	342.6425	U
- T40	3	447.182	-73.70604	-4.84242	64.0212	
- T5	3	114.9452	258.5308	327.3944	396.258	U
- Te10	3	174.3655	199.1105	267.9741	336.8377	U
- Te20	3	112.2	261.2759	330.1396	399.0032	U
- Te40	3	147.481	225.9949	294.8585	363.7221	U
- Te5	3	119.8873	253.5886	322.4523	391.3159	U
T40	3	447.182				
- B10	3	67.0079	311.3105	380.1741	449.0377	U
- B20	3	59.95706	318.3613	387.2249	456.0885	U
- B40	3	207.0662	171.2522	240.1158	308.9794	U
- B5	3	29.69098	348.6274	417.491	486.3546	U
- R10	3	302.2429	76.07542	144.939	213.8027	U
- R20	3	256.7403	121.5781	190.4417	259.3053	U
- R40	3	417.5677	-39.24933	29.61429	98.47791	
- R5	3	293.1485	85.16981	154.0334	222.897	U
- RT10	3	198.7616	179.5567	248.4204	317.284	U
- RT20	3	219.523	158.7953	227.6589	296.5226	U

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 16 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparación		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferenc.	Simult.C.I.	Result
- RT40	3	403.6424	-25.32402	43.5396	112.4032	
- RT5	3	284.4184	93.89997	162.7636	231.6272	U
- T10	3	168.5607	209.7576	278.6213	347.4849	U
- T20	3	442.3395	-64.0212	4.84242	73.70604	
- T5	3	114.9452	263.3732	332.2368	401.1004	U
- Te10	3	174.3655	203.9529	272.8165	341.6801	U
- Te20	3	112.2	266.1183	334.982	403.8456	U
- Te40	3	147.481	230.8373	299.701	368.5646	U
- Te5	3	119.8873	258.4311	327.2947	396.1583	U
T5	3	114.9452				
- B10	3	67.0079	-20.92635	47.93727	116.8009	
- B20	3	59.95706	-13.87551	54.98811	123.8517	
- B40	3	207.0662	-160.9846	-92.121	-23.25738	L
- B5	3	29.69098	16.39058	85.2542	154.1178	U
- R10	3	302.2429	-256.1614	-187.2978	-118.4341	L
- R20	3	256.7403	-210.6587	-141.7951	-72.93149	L
- R40	3	417.5677	-371.4861	-302.6225	-233.7589	L
- R5	3	293.1485	-247.067	-178.2034	-109.3397	L
- RT10	3	198.7616	-152.6801	-83.81642	-14.9528	L
- RT20	3	219.523	-173.4415	-104.5779	-35.71425	L
- RT40	3	403.6424	-357.5608	-288.6972	-219.8336	L
- RT5	3	284.4184	-238.3368	-169.4732	-100.6096	L

- T10	3	168.5607	-122.4791	-53.61552	15.2481	
- T20	3	442.3395	-396.258	-327.3944	-258.5308	L
- T40	3	447.182	-401.1004	-332.2368	-263.3732	L
- Te10	3	174.3655	-128.2839	-59.42029	9.443333	
- Te20	3	112.2	-66.11843	2.745188	71.60881	
- Te40	3	147.481	-101.3995	-32.53585	36.32777	
- Te5	3	119.8873	-73.80573	-4.942106	63.92152	
Te10	3	174.3655				
- B10	3	67.0079	38.49394	107.3576	176.2212	U
- B20	3	59.95706	45.54478	114.4084	183.272	U
- B40	3	207.0662	-101.5643	-32.70071	36.16291	
- B5	3	29.69098	75.81087	144.6745	213.5381	U
- R10	3	302.2429	-196.7411	-127.8775	-59.01384	L
- R20	3	256.7403	-151.2384	-82.37482	-13.5112	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 17 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor crítico=5.3575

Comparación		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
- R40	3	417.5677	-312.0658	-243.2022	-174.3386	L
- R5	3	293.1485	-187.6467	-118.7831	-49.91945	L
- RT10	3	198.7616	-93.25976	-24.39614	44.46749	
- RT20	3	219.523	-114.0212	-45.15758	23.70604	
- RT40	3	403.6424	-298.1405	-229.2769	-160.4133	L
- RT5	3	284.4184	-178.9165	-110.0529	-41.18929	L
- T10	3	168.5607	-63.05885	5.80477	74.66839	
- T20	3	442.3395	-336.8377	-267.9741	-199.1105	L
- T40	3	447.182	-341.6801	-272.8165	-203.9529	L
- T5	3	114.9452	-9.443333	59.42029	128.2839	
- Te20	3	112.2	-6.698144	62.16548	131.0291	
- Te40	3	147.481	-41.97918	26.88444	95.74806	
- Te5	3	119.8873	-14.38544	54.47818	123.3418	
Te20	3	112.2				
- B10	3	67.0079	-23.67154	45.19209	114.0557	
- B20	3	59.95706	-16.6207	52.24293	121.1065	

- B40	3	207.0662	-163.7298	-94.86619	-26.00257	L
- B5	3	29.69098	13.64539	82.50901	151.3726	U
- R10	3	302.2429	-258.9066	-190.0429	-121.1793	L
- R20	3	256.7403	-213.4039	-144.5403	-75.67667	L
- R40	3	417.5677	-374.2313	-305.3677	-236.5041	L
- R5	3	293.1485	-249.8122	-180.9485	-112.0849	L
- RT10	3	198.7616	-155.4252	-86.56161	-17.69799	L
- RT20	3	219.523	-176.1867	-107.3231	-38.45943	L
- RT40	3	403.6424	-360.306	-291.4424	-222.5788	L
- RT5	3	284.4184	-241.082	-172.2184	-103.3548	L
- T10	3	168.5607	-125.2243	-56.36071	12.50291	
- T20	3	442.3395	-399.0032	-330.1396	-261.2759	L
- T40	3	447.182	-403.8456	-334.982	-266.1183	L
- T5	3	114.9452	-71.60881	-2.745188	66.11843	
- Te10	3	174.3655	-131.0291	-62.16548	6.698144	
- Te40	3	147.481	-104.1447	-35.28104	33.58258	
- Te5	3	119.8873	-76.55092	-7.687294	61.17633	
Te40	3	147.481				
- B10	3	67.0079	11.6095	80.47312	149.3367	U
- B20	3	59.95706	18.66034	87.52396	156.3876	U

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 18 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=40 EEM=495.6453 Valor critico=5.3575

Comparición		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
- B40	3	207.0662	-128.4488	-59.58516	9.278467	
- B5	3	29.69098	48.92643	117.79	186.6537	U
- R10	3	302.2429	-223.6255	-154.7619	-85.89828	L
- R20	3	256.7403	-178.1229	-109.2593	-40.39564	L
- R40	3	417.5677	-338.9503	-270.0866	-201.223	L
- R5	3	293.1485	-214.5311	-145.6675	-76.80389	L
- RT10	3	198.7616	-120.1442	-51.28057	17.58305	
- RT20	3	219.523	-140.9056	-72.04202	-3.178399	L
- RT40	3	403.6424	-325.025	-256.1613	-187.2977	L
- RT5	3	284.4184	-205.801	-136.9373	-68.07373	L
- T10	3	168.5607	-89.94329	-21.07967	47.78395	
- T20	3	442.3395	-363.7221	-294.8585	-225.9949	L
- T40	3	447.182	-368.5646	-299.701	-230.8373	L
- T5	3	114.9452	-36.32777	32.53585	101.3995	
- Te10	3	174.3655	-95.74806	-26.88444	41.97918	
- Te20	3	112.2	-33.58258	35.28104	104.1447	
- Te5	3	119.8873	-41.26988	27.59374	96.45737	
Te5	3	119.8873				
- B10	3	67.0079	-15.98424	52.87938	121.743	
- B20	3	59.95706	-8.933402	59.93022	128.7938	
- B40	3	207.0662	-156.0425	-87.17889	-18.31528	L
- B5	3	29.69098	21.33268	90.1963	159.0599	U
- R10	3	302.2429	-251.2193	-182.3557	-113.492	L
- R20	3	256.7403	-205.7166	-136.853	-67.98938	L
- R40	3	417.5677	-366.544	-297.6804	-228.8168	L
- R5	3	293.1485	-242.1249	-173.2612	-104.3976	L
- RT10	3	198.7616	-147.7379	-78.87432	-10.0107	L
- RT20	3	219.523	-168.4994	-99.63577	-30.77214	L

- RT40	3	403.6424	-352.6187	-283.7551	-214.8915	L
- RT5	3	284.4184	-233.3947	-164.5311	-95.66747	L
- T10	3	168.5607	-117.537	-48.67342	20.19021	
- T20	3	442.3395	-391.3159	-322.4523	-253.5886	L
- T40	3	447.182	-396.1583	-327.2947	-258.4311	L
- T5	3	114.9452	-63.92152	4.942106	73.80573	
- Te10	3	174.3655	-123.3418	-54.47818	14.38544	
- Te20	3	112.2	-61.17633	7.687294	76.55092	
- Te40	3	147.481	-96.45737	-27.59374	41.26988	

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 19 23/04/2013 09:45:01 a.m.

Base de datos: Bioaumentación en laboratorio

Variable de respuesta: C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) DF=40 EEM=495.6453 valor crítico =5.3575

Comparación		L 95.0%		U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I. Result

Nota:

Pruebas de comparación múltiple entre todas las diferencias de medias.

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 1 24/05/2013 08:45:39 a.m.

Base de datos: C:\Users\tellezjar\Documents

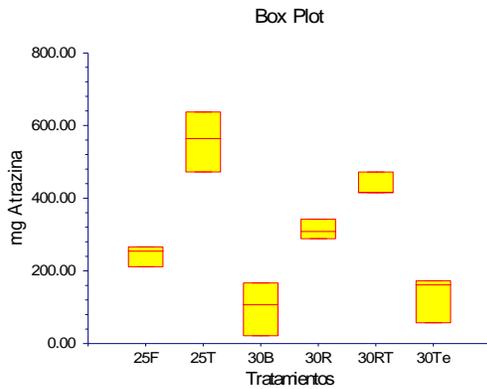
07\Report\invernal1000ppm.S0

Variable de respuesta: C3

Predicciones y análisis de residuales

Predicciones	Valor	nivel	Decisión
Nomalización de residuales			(0.05)
Asimétricas	-0.6862	0.492563	A
Curtosis	-0.2382	0.811734	A
General	0.5277	0.768105	A
Varianza modificada	0.5327	0.747961	A

Graficos de caja



Cuadrados medios

FV	GL	Valor Fijo?	Denominator	Cuadrado medio
A: C1	5	si	S(A) S+sA	
S(A)	12	No	S(A)	

Nota: Cuadrado medio esperado para cada caso de frecuencia balanceada.

Tabla de Análisis de Varianza

FV	GL	SC	CM	F-calcul	Proba.	Alfa=0.05
A: C1	5	471991	94398.2	29.97	0.000002*	1.000000
S(A)	12	37795.27	3149.605			
Total						
(Ajustada)	17	509786.3				
Total	18					

* alfa = 0.05

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 2 24/05/2013 08:45:39 a.m.
Base de datos C:\Users\tellezjar\Documents ...
007\Report\inverna1000ppm.S0
Variable de respuesta: C3

ANOVA simple de Kruskal-Wallis

Hipótesis

H0: Todas las medias son iguales.

Ha: Al menos 2 medias son diferentes.

Resultados

Method	DF	Jl-Cuadrada (H)	Nivel	Decision(0.05)
No				
Corregida	5	16.15789	0.006407	Rechazada H0
Corregida	5	16.15789	0.006407	Rechazada H0

Conjuntos relacionados 0

Factor de multiplicidad 0

Detalle del grupo

Grupo	rep.	SC	Media	Valor Z	Mediana
25F	3	24.00	8.00	-0.5331	255.5279
25T	3	51.00	17.00	2.6656	565.4514
30B	3	9.00	3.00	-2.3102	108.0149
30R	3	33.00	11.00	0.5331	309.7666
30RT	3	42.00	14.00	1.5993	417.4496
30Te	3	12.00	4.00	-1.9548	162.5306

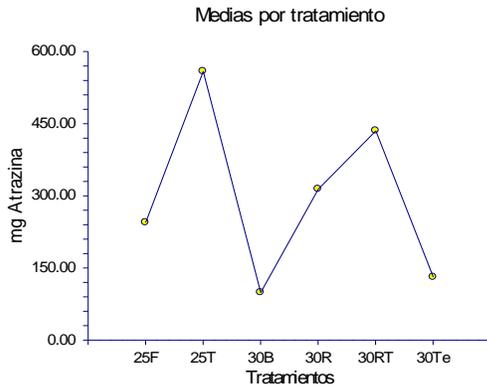
Medias y efectos del error estándar (EE)

FV	repe.	Media	Error	Efecto
All	18	296.9134	296.9134	
A: C1				
25F	3	244.4174	32.40167	-52.49596
25T	3	558.5515	32.40167	261.6381
30B	3	98.91213	32.40167	-198.0012
30R	3	313.7177	32.40167	16.80427
30RT	3	434.9978	32.40167	138.0844
30Te	3	130.8838	32.40167	-166.0296

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 3 24/05/2013 08:45:39 a.m.
Database C:\Users\tellezjar\Documents ... 007\Report\inverna1000ppm.S0
Response C3

Graficos de medias



Prueba de Comparación Multiple Tukey-Kramer

Variable de respuesta: C3

A: C1

Alfa=0.050, Error =S(A) GL=12 EEM=3149.605, Valor critico=4.7502

Grupo	rep.	Medias	Diferencias entre grupos
30B	3	98.91213	30R, 30RT, 25T
30Te	3	130.8838	30R, 30RT, 25T
25F	3	244.4174	30RT, 25T
30R	3	313.7177	30B, 30Te, 25T
30RT	3	434.9978	30B, 30Te, 25F
25T	3	558.5515	30B, 30Te, 25F, 30R

Nota:

Pruebas de comparación multiple entre todas las diferencias de medias.

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 4 24/05/2013 08:45:39 a.m.

Base de datos: C:\Users\tellezjar\Documents ...

007\Report\inverna1000ppm.S0

Variable de respuesta: C3

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C3

A: C1

Alfa=0.050 Error=S(A) GL=12 EEM=3149.605 Valor crítico=4.7502

Compación			L 95.0%		U 95.0%	
Grupos	repet.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
25F	3	244.4174				
- 25T	3	558.5515	-468.05	-314.1341	-160.2182	L
- 30B	3	98.91213	-8.41062	145.5053	299.4212	
- 30R	3	313.7177	-223.2161	-69.30023	84.61566	
- 30RT	3	434.9978	-344.4963	-190.5804	-36.66451	L
- 30Te	3	130.8838	-40.38226	113.5336	267.4495	
25T	3	558.5515				
- 25F	3	244.4174	160.2182	314.1341	468.05	U
- 30B	3	98.91213	305.7234	459.6393	613.5552	U
- 30R	3	313.7177	90.91792	244.8338	398.7497	U
- 30RT	3	434.9978	-30.36225	123.5536	277.4695	
- 30Te	3	130.8838	273.7518	427.6677	581.5836	U
30B	3	98.91213				
- 25F	3	244.4174	-299.4212	-145.5053	8.41062	
- 25T	3	558.5515	-613.5552	-459.6393	-305.7234	L
- 30R	3	313.7177	-368.7214	-214.8055	-60.88961	L
- 30RT	3	434.9978	-490.0016	-336.0857	-182.1698	L
- 30Te	3	130.8838	-185.8875	-31.97164	121.9443	
30R	3	313.7177				

- 25F	3	244.4174	-84.61566	69.30023	223.2161	
- 25T	3	558.5515	-398.7497	-244.8338	-90.91792	L
- 30B	3	98.91213	60.88961	214.8055	368.7214	U
- 30RT	3	434.9978	-275.1961	-121.2802	32.63572	
- 30Te	3	130.8838	28.91797	182.8339	336.7498	U
30RT	3	434.9978				
- 25F	3	244.4174	36.66451	190.5804	344.4963	U
- 25T	3	558.5515	-277.4695	-123.5536	30.36225	
- 30B	3	98.91213	182.1698	336.0857	490.0016	U
- 30R	3	313.7177	-32.63572	121.2802	275.1961	
- 30Te	3	130.8838	150.1982	304.114	458.0299	U
30Te	3	130.8838				
- 25F	3	244.4174	-267.4495	-113.5336	40.38226	
- 25T	3	558.5515	-581.5836	-427.6677	-273.7518	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 5 24/05/2013 08:45:39 a.m.

Base de datos: C:\Users\tellezjar\Documents ...

007\Report\inverna1000ppm.S0

Variable de respuesta: C3

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C3

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=3149.605 Critical Value=4.7502

Comparación		L 95.0%			U 95.0%	
Grupos	rep.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
- 30B	3	98.91213	-121.9443	31.97164	185.8875	
- 30R	3	313.7177	-336.7498	-182.8339	-28.91797	L
- 30RT	3	434.9978	-458.0299	-304.114	-150.1982	L

Nota:

Pruebas de comparación múltiple entre todas las diferencias de medias.

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 1 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Base de datos: Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

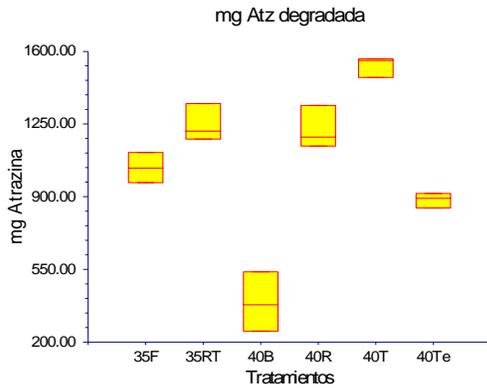
Variable de respuesta: C2

Predicciones y análisis de residuos

Predicciones

Normalización de residuales	Valor	Nivel	Decisión (0.05)
Asimétricas	0.6194	0.535636	Accept
Curtosis	-0.1243	0.901068	Accept
General	0.3991	0.819082	Accept
Varianza modificada de Levene	0.5524	0.734181	Accept

Graficas en cajas



Cuadrados medios

FV	GL	V. Fijo?	Denominador	Cuadrado medio
A: C1	5	si	S(A)	S+sA
S(A)	12	No	S(A)	

Nota: Cuadrado medio esperado para cada caso de frecuencia balanceada.

Tabla de análisis de varianza

FV	GL	SC	CM	F-cal	nivel	Alpha (0.05)
A: C1	5	2292329	458465.7	57.3	10.000*	1.0000
S(A)	12	95995.36	7999.613			

Total

(Ajusta) 17 2388324

Total 18

* alfa = 0.05

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 2 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Base de datos:Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

Variable de respuesta: C2

ANOVA simple Kruskal-Wallis ANOVA

Hipótesis

H0: Todas las medias son iguales.

Ha: Al menos 2 medianas son diferentes.

Resultados

Método	GL	Ji-Cuadrada (H)	nivel	Decision(0.05)
No Corregida	5	16.15789	0.006407	Rechazada H0
Corregida	5	16.15789	0.006407	Rechazada H0
Conjuntos relacionados	0			
Factor de Multiplicidad	0			

Detalle del grupo

Grupo	repe.	SC	Medias	Valor Z	Mediana
35F	3	24.00	8.00	-0.5331	1040.166
35RT	3	39.00	13.00	1.2439	1218.241
40B	3	6.00	2.00	-2.6656	381.545
40R	3	36.00	12.00	0.8885	1189.535
40T	3	51.00	17.00	2.6656	1558.846
40Te	3	15.00	5.00	-1.5993	894.5124

Medias y efectos del error estándar (EE)

FV	repet.	Media	EE	Efecto
All	18	1053.772		1053.772
A: C1				
35F	3	1040.574	51.63853	-13.19727
35RT	3	1248.323	51.63853	194.5507
40B	3	391.0001	51.63853	-662.7717
40R	3	1224.677	51.63853	170.9056
40T	3	1532.603	51.63853	478.8311
40Te	3	885.4534	51.63853	-168.3184

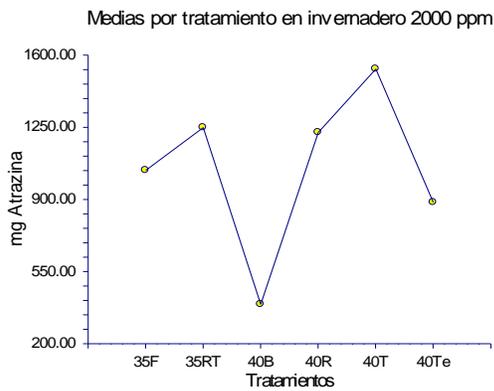
Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 3 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Base de datos: Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

Variable de respuesta: C2

Graficos de medias



Prueba de comparación multiple Duncan's

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=12 EEM=7999.613

Grupo	repet.	Medias	Diferencias entre grupos
40B	3	391.0001	40Te, 35F, 40R, 35RT, 40T
40Te	3	885.4534	40B, 40R, 35RT, 40T
35F	3	1040.574	40B, 40R, 35RT, 40T
40R	3	1224.677	40B, 40Te, 35F, 40T
35RT	3	1248.323	40B, 40Te, 35F, 40T
40T	3	1532.603	40B, 40Te, 35F, 40R, 35RT

Nota:

Comparación múltiple para las diferencias entre todos los pares. Según Hsu(1996, pág 130), la tasa de error por grupo especificado (alfa) puede ser exagerado, se recomienda el método de Tukey-Kramer's

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 4 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Base de datos: Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

Variable de respuesta: C2

Comparación múltiple de Tukey-Kramer

Variable de respuesta:C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=12 EEM=7999.613 Valor critic =4.7502

Grupo	repet.	Medias	Diferencias entre grupos
40B	3	391.0001	40Te, 35F, 40R, 35RT, 40T
40Te	3	885.4534	40B, 40R, 35RT, 40T
35F	3	1040.574	40B, 40T
40R	3	1224.677	40B, 40Te, 40T
35RT	3	1248.323	40B, 40Te, 40T
40T	3	1532.603	40B, 40Te, 35F, 40R, 35RT

Notas:

Pruebas de comparación múltiple entre todas las diferencias de medias.

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación múltiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=12 EEM=7999.613 Valor critico=4.7502

Comparación			L 95.0%	Ur 95.0%		
Groups	repet.	Medias	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
35F	3	1040.574				
- 35RT	3	1248.323	-453.0436	-207.7479	37.54774	
- 40B	3	391.0001	404.2787	649.5745	894.8701	U
- 40R	3	1224.677	-429.3986	-184.1029	61.19279	
- 40T	3	1532.603	-737.324	-492.0284	-246.7327	L
- 40Te	3	885.4534	-90.17451	155.1212	400.4168	
35RT	3	1248.323				
- 35F	3	1040.574	-37.54774	207.7479	453.0436	
- 40B	3	391.0001	612.0267	857.3224	1102.618	U
- 40R	3	1224.677	-221.6506	23.64506	268.9407	
- 40T3		1532.603	-529.5761	-284.2804	-38.98475	L
- 40Te	3	885.4534	117.5734	362.8691	608.1648	U
40B	3	391.0001				
- 35F	3	1040.574	-894.8701	-649.5745	-404.2787	L

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 5 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Database Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

Variable de respuesta:C2

Intervalos de confianza de Tukey-Kramer's para comparación multiple entre todos los pares

Variable de respuesta: C2

A: C1

Alfa=0.050 Error =S(A) GL=12 EEM=7999.613 Valor critico=4.7502

Comparación		L 95.0%		U 95.0%		
Groups	repet.	Mean	Simult.C.I.	Diferen.	Simult.C.I.	Result
- 35RT	3	1248.323	-1102.618	-857.3224	-612.0267	L
- 40R	3	1224.677	-1078.973	-833.6773	-588.3817	L
- 40T	3	1532.603	-1386.899	-1141.603	-896.3071	L
- 40Te	3	885.4534	-739.749	-494.4533	-249.1576	L
40R	3	1224.677				
- 35F	3	1040.574	-61.19279	184.1029	429.3986	
- 35RT	3	1248.323	-268.9407	-23.64506	221.6506	
- 40B	3	391.0001	588.3817	833.6773	1078.973	U
- 40T	3	1532.603	-553.2212	-307.9255	-62.62981	L
- 40Te	3	885.4534	93.92838	339.2241	584.5197	U
40T	3	1532.603				
- 35F	3	1040.574	246.7327	492.0284	737.324	U
- 35RT	3	1248.323	38.98475	284.2804	529.5761	U
- 40B	3	391.0001	896.3071	1141.603	1386.899	U
- 40R	3	1224.677	62.62981	307.9255	553.2212	U
- 40Te	3	885.4534	401.8539	647.1495	892.4453	U
40Te	3	885.4534				
- 35F	3	1040.574	-400.4168	-155.1212	90.17451	
- 35RT	3	1248.323	-608.1648	-362.8691	-117.5734	L
- 40B	3	391.0001	249.1576	494.4533	739.749	U
- 40R	3	1224.677	-584.5197	-339.2241	-93.92838	L
- 40T	3	1532.603	-892.4453	-647.1495	-401.8539	L

Nota:

Pruebas de comparación múltiple entre todas las diferencias de medias.

Reporte de Análisis de Varianza

Página/Fecha/Hora 6 23/04/2013 04:37:30 p.m.

Database Fitorremediación+Bioaumentación en invernadero a 2000 mg/L

Response C2

Comparación: Tendencia lineal

Response: C2

Term A: C1

Alpha=0.050 Error Term=S(A) DF=12 MSE=7999.613

Comparación Valor=108.8749 T=2.1084 Prob>|T|=0.056692 Decision
(0.05)=No rechazar

Comparison Error estandar = 51.63853 Comparación del intervalo de
coeficiente = -3.63579 to 221.3856

Grupo	Coeficiente de Comparación	repeticiones	valor medio
35F	-0.5976143	3	1040.574
35RT	-0.3585686	3	1248.323
40B	-0.1195229	3	391.0001
40R	0.1195229	3	1224.677
40T	0.3585686	3	1532.603
40Te	0.5976143	3	885.4534

Notas:

Se presentan los resultados significativos de la prueba de comparación de un polinomio de primer orden (tendencia lineal)

