

PARÁMETROS BIOLÓGICOS DE LA RESTAURACIÓN DE SUELOS CONTAMINADOS POR PETRÓLEO CRUDO

Biological parameters of the restoration of soils polluted by crude oil

¹*Antonio Trujillo-Narcía, ²María del Carmen Rivera-Cruz, ²Luz del Carmen Lagunes-Espinoza, ²David Jesús Palma-López, ²Saúl Sánchez-Soto, ³Gustavo Ramírez-Valverde

¹Programa en Producción Agroalimentaria en el Trópico, Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. Periférico Carlos A. Molina s/n Carretera Cárdenas - Huimanguillo Km 3 Apartado Postal 24 CP 86500. H. Cárdenas, Tabasco, México.

Universidad Popular de la Chontalpa H. Cárdenas, Tabasco, México.

*atrujillonarcia@hotmail.com

²Programa en Producción Agroalimentaria en el Trópico, Campus Tabasco, Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco, México.

³Postgrado en Estadística. Campus Montecillo, Colegio de Postgraduados. Texcoco, edo. México, México.

Artículo científico recibido: 20 de septiembre de 2013, **aceptado:** 28 de febrero de 2014

RESUMEN. El objetivo de este trabajo fue identificar parámetros de la microflora rizosférica, la fauna del suelo y de la planta de rábano para medir la eficacia de la descontaminación de un Fluvisol afectado por petróleo crudo. En 0.85 ha de suelo restaurado y en 0.377 ha de suelo testigo aledaño, localizados en Cunduacán, estado de Tabasco, México, se establecieron bioensayos con plantas de rábano (*Raphanus sativus* L.) en tres épocas climáticas del año: nortes (noviembre a febrero), sures o sequía (marzo a mayo) y lluvias (junio a octubre). El diseño fue completamente al azar con arreglo factorial (tipo de suelo y época del año) y con cuatro repeticiones. Se evaluaron cinco variables de la microflora, la diversidad de la fauna del suelo y siete variables de la planta. Los datos se analizaron con contrastes ortogonales, ANDEVA y correlaciones múltiples, además se calcularon índices de impacto ecotoxicológico (IIE). El suelo superficial restaurado aún tiene 6 480 a 11 210 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) que causó necrosis y hasta 92 % de mortalidad de las plantas. No se formó el bulbo (-0.658**) y en consecuencia disminuyó la biomasa vegetal (-0.691**), ambos fueron los parámetros más sensibles en la época de sures. La variable más afectada ($p \leq 0.01$) en las épocas de nortes y de lluvias fue la densidad de la fauna del suelo (-0.729**). El IIE propuesto aporta valores que permite identificar parámetros sensibles de bioindicadores utilizados en la evaluación de la calidad de la restauración de Fluvisoles contaminados con petróleo crudo.

Palabras clave: Bioindicador, biomasa del bulbo, fauna del suelo, HTP, *Raphanus sativus*.

ABSTRACT. The purpose of this study was to identify parameters of rhizospheric microflora, soil fauna and radish plants in order to measure the effectiveness of the decontamination of a Fluvisol affected by crude oil. Bioassays were established with radish plants (*Raphanus sativus* L.) in 0,85 ha of restored soil and 0,377 ha of adjacent control soil in Cunduacán, state of Tabasco, Mexico, in the three climatic seasons of the year: northers (November to February), southens or dry season (March to May) and rainy season (June to October). A completely randomised design with a factorial arrangement (soil type and season of the year) was applied four replicates. Five microflora variables, the diversity of the soil fauna and seven plant variables were evaluated. The data were analysed using orthogonal contrasts, an ANOVA and multiple correlations. Ecotoxicological impact indices (EII) were also calculated. The restored topsoil still has from 6 480 to 11 210 mg kg⁻¹ of total petroleum hydrocarbons (TPH), which caused necrosis and up to a 92 % mortality in plants. The bulb (-0.658**) did not form leading to a reduction in plant biomass (-0.691**), these were the most sensitive parameters in the dry season. The most affected variable ($p \leq 0.01$) in the dry and rainy seasons was the soil fauna density (-0.729**). The EII proposed provided values that make it possible to identify sensitive parameters of bioindicators used to evaluate the restoration quality of Fluvisols polluted by crude oil.

Key words: Bioindicator, bulb biomass, soil fauna, TPH, *Raphanus sativus*.

INTRODUCCIÓN

El petróleo es la fuente energética más importante con el 33.1 % del consumo mundial (British Petroleum 2012). Los beneficios de esta fuente energética no renovable se asocian con la generación de empleo y la producción de materia prima para la industria, sin embargo origina contaminación del suelo durante la extracción de los yacimientos, en el transporte, en el almacenamiento y también durante la refinación (Saterback *et al.* 2000, PEMEX 2011). Los derrames de petróleo causan alteraciones de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo (Cébron *et al.* 2011, Rivera-Cruz 2011, Trujillo-Narcía *et al.* 2012). Para la descontaminación es necesario la aplicación de tratamientos basados en tecnologías físicas, químicas y biológicas de modo que el suelo recupere sus condiciones originales (Riser-Roberts 1998). En México, aunque existe normatividad para la restauración de suelos contaminados con petróleo (DOF 2013), los suelos restaurados *ex situ* mediante lavado con surfactantes químicos no recuperan la fertilidad ni la sustentabilidad del suelo (Trujillo-Narcía *et al.* 2012). Así mismo la aplicación de desorción térmica para la remoción de hidrocarburos aromáticos policíclicos modifica las características del suelo y altera la diversidad de la fauna del suelo (Cébron *et al.* 2009, 2011). Una opción para la evaluación de los suelos restaurados es el desarrollo de protocolos basados en la calidad biológica del suelo a partir de bioindicadores, para lograrlo es necesario conocer la relación que existe entre la cantidad, composición y grado de afectación sobre los organismos vivos (Al-Mutairi *et al.* 2008). Se ha encontrado que la exposición a petróleo crudo afecta la densidad y diversidad de las bacterias y hongos rizosféricos (Rivera-Cruz 2011), lo que induce la disminución de la abundancia y riqueza de la fauna del suelo (Cutz-Pool *et al.* 2007, Uribe-Hernández *et al.* 2010), y en la planta origina alteraciones en el crecimiento y en la reproducción (Plaza *et al.* 2005, Rivera-Cruz *et al.* 2012). La microflora del suelo, la fauna del suelo y la planta, sensibles a la presencia de petróleo, pueden ser utilizados como bioindicadores (Spurgeon *et al.* 2008, Rivera-Cruz 2011) para

la medición de la calidad de la restauración del suelo. El objetivo de este trabajo fue identificar los parámetros de la microflora rizosférica de rábano (*Raphanus sativus* L.), de la fauna del suelo y de la planta de rábano para evaluar la eficacia de la descontaminación de un Fluvisol contaminado con petróleo crudo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y condiciones climáticas

El experimento se realizó en la ranchería Los Cedros, municipio de Cunduacán, Tabasco (UTM 1996493 y 493951) en una superficie de 1.187 ha (Figura 1). El clima es tropical con lluvias en verano (Amf), temperatura media 22 °C y 2 200 mm de lluvia anual (INEGI 2001). Se distinguen tres épocas durante el año en función de las condiciones climáticas dominantes (West *et al.* 1985). Las épocas se denominan nortes (noviembre a febrero), sures o sequía (marzo a mayo) y lluvias (junio a octubre). De acuerdo con datos del clima del periodo 2008-2011 (estación Libertad, 18° 07' 45" Latitud Norte y 93° 21' 34" Longitud Oeste) de la red de estaciones del INIFAP-COFRUPO (2012), durante la época nortes ocurren frecuentes días medio nublados a nublados, se acumula 30 % de la lluvia promedio anual, la temperatura mínima varía de 9.6 a 14 °C y se presentan vientos frescos a fríos hasta de 23 km h⁻¹. Las condiciones típicas durante sequía son días soleados y pocos medio nublados, se acumula 11.5 % de la lluvia y al menos uno de los tres meses no llueve, ocurre 40 % de la evapotranspiración, la temperatura máxima fluctúa de 31.2 a 41 °C y el viento seco alcanza hasta 47 km h⁻¹. La época de lluvias presenta días medio nublados a nublados, se acumula 58.5 % de la lluvia y 33.4 % de la evapotranspiración, lluvias máximas de 322 mm en 24 h, la temperatura mínima varía de 10.6 a 22.6 °C y la máxima de 24.6 a 39.4 °C; la velocidad máxima del viento húmedo proveniente del norte y del noroeste es 56.9 km h⁻¹.

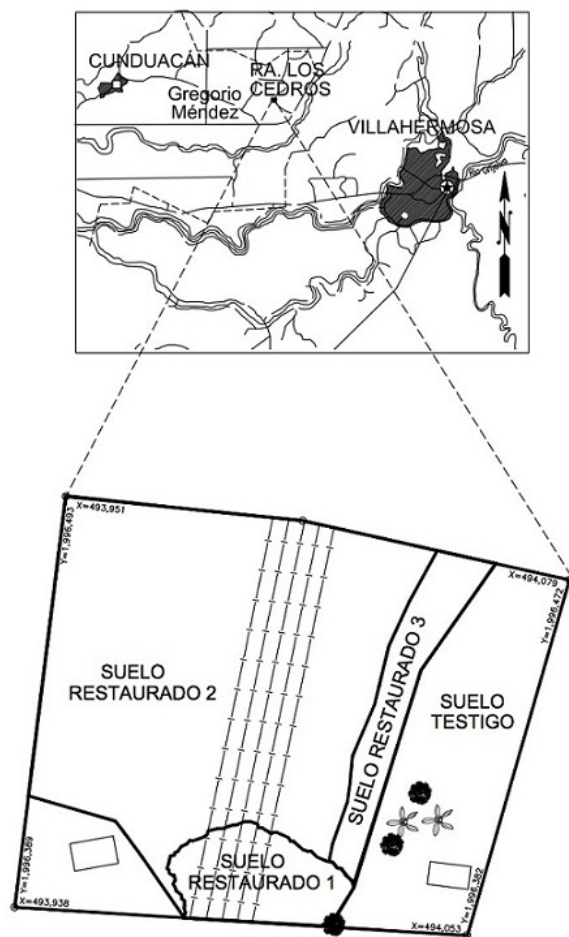


Figura 1. Localización geográfica y política del sitio experimental.
Figure 1. Geographical and political location of the experimental site.

Emergencia ambiental (derrame de petróleo crudo) y tecnología de restauración del suelo

El suelo fue afectado por un derrame de 50 barriles de petróleo el 26 de junio de 2006 (PEMEX 2012) y fue descontaminado por una compañía privada mediante un tren de tratamiento físico y químico *ex situ*, constituido por seis etapas secuenciales (Trujillo-Narcía *et al.* 2012).

Suelos testigo y restaurado

La superficie experimental fue 0.337 ha del suelo testigo (ST) y 0.85 ha del suelo restaurado (SR) (Figura 2), ambos aledaños. El ST es un Fluvisol éutrico inalterado, tiene seis horizontes, el

superficial (0-10/13 cm) con textura migajosa, estructura columnar muy fina a mediana, resistencia a la penetración ≤ 1.3 Mpa, fertilidad media a alta, retiene humedad a capacidad de campo y no está contaminado con HTP. El SR es heterogéneo, se identificaron tres diferentes (SR1, SR2 y SR3) en función de las características morfológicas (Figura 2), químicas y físicas (Tablas 1 y 2) de acuerdo a datos publicados (Trujillo-Narcía *et al.* 2012). El espesor de la capa superficial es variable, de 0-10/12 cm del SR1, 0-33/54 cm del SR2 y 0-10/15 cm del SR3.

Los tres SR tienen olor a petróleo, las concentraciones varían de 21 691 a 29 871 mg kg⁻¹ de HTP, la textura es arcillosa, estructura laminar fina y muy fina, alta resistencia a la penetración (7.2 a 8.2 Mpa), fertilidad baja, 40.6 % menor retención de agua que el ST (Trujillo-Narcía *et al.* 2012) y no tiene contaminación por fracciones media y pesada del petróleo ni por HAP, aunque, si tiene HTP (Tablas 1, 2 y 3).

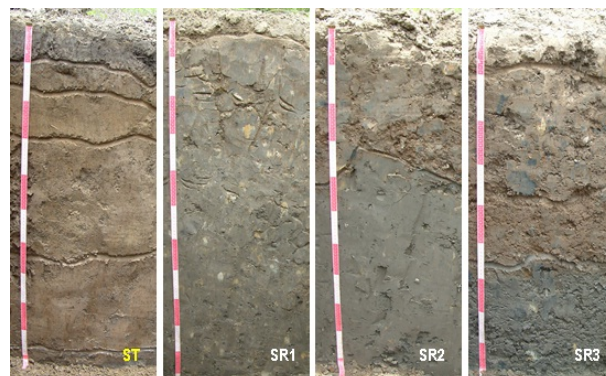


Figura 2. Morfología de los suelos testigo (ST) y restaurados 1, 2 y 3.
Figure 2. Morphology of the control (ST) and restored 1, 2 and 3 soils.

Diseño experimental

Se establecieron tres bioensayos en campo con plantas de rábano (*R. sativus*) basado en el protocolo 208 de la OECD (2006). Cada bioensayo duró seis semanas (42 d). Los experimentos se realizaron durante parte de las épocas denominadas nortes (enero-febrero 2010), sequía (marzo-mayo 2010) y lluvias (octubre-noviembre 2010). Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con

Table 1. Propiedades físicas de los suelos testigo y restaurados.
Table 1. Physical properties of control and restored soils.

Suelo	Prof. (cm)	HTP (mg kg ⁻¹)	Resistencia (Mpa)	Dap (g cm ⁻³)	Humedad cap. Campo (%)	Retención agua (%)	lb (cm ⁻¹)	Arcilla (%)	Limo (%)	Arena (%)
ST	0-15	1 091±392 ^b	1.3±0.20 ^b	1.15±0.07 ^c	29.7±2.5 ^a	98.76±1.26 ^a	8.33±0.79 ^a	27.0±4.2 ^b	49.6±2.4 ^a	23.5±2.1 ^a
ST	15-30	947±306 ^b	1.2±0.11 ^b	1.15±0.09 ^c	29.7±2.5 ^a	97.10±1.33 ^a		27.5±3.1 ^b	49.3±0.5 ^a	23.3±3.2 ^a
SR1	0-15	22 800±2 704 ^a	7.7±1.32 ^b	1.94±0.09 ^{ba}	12.7±2.0 ^b	76.97±3.71 ^b	0.1±0.0 ^b	41.7±5.1 ^a	32.8±6.3 ^b	25.5±6.6 ^a
SR1	15-30	26 591±4 940 ^a	8.2±1.02 ^a	1.93±0.04 ^{ba}	12.8±2.2 ^b	77.68±4.14 ^b		39 ^b ±6.7 ^a	34.7±4.3 ^b	26.3±8.5 ^a
SR2	0-15	21 691±3 037 ^a	7.2±1.21 ^a	1.86±0.06 ^b	12.5±2.4 ^b	77.28±2.82 ^b	0.1±0.0 ^b	41.7±7.4 ^a	35.0±4.4 ^b	23.8±4.9 ^a
SR2	15-30	29 871±7 716 ^a	8.0±1.14 ^a	2.10±0.09 ^a	13.5±2.3 ^b	78.04±5.23 ^b		42.5±8.2 ^a	636.5±5.9 ^b	24.8±3.5 ^a

Medias de tratamientos con letras diferentes dentro de cada columna tienen diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$, $a > b$, $n = 4$). HTP: hidrocarburos totales del petróleo, Dap: densidad aparente, lb: tasa de infiltración básica, Mpa: megapascales, ST: suelo testigo y SR: suelo restaurado. Fuente: Trujillo-Narcía et al. 2012.

Table 2. Propiedades químicas de los suelos testigo y restaurados.
Table 2. Chemical properties of control and restored soils.

Suelo	Prof. (cm)	HTP (mg kg ⁻¹)	pH (1:2, H ₂ O)	CE (dSm ⁻¹)	MO (%)	Ca (cmol (+) kg ⁻¹)	Mg (cmol (+) kg ⁻¹)
ST	0-15	1 091±392 ^b	7.04±0.14 ^{bc}	0.12±0.01 ^b	4.10±0.24 ^a	31.48±4.82 ^a	3.63±0.44 ^a
ST	15-30	947±306 ^b	7.03±0.3 ^c	0.12±0.01 ^b	1.07±0.15 ^b	31.25±3.33 ^a	2.77±0.38 ^b
SR1	0-15	22 800±2 704 ^a	8.28±0.12 ^a	0.36±0.06 ^a	1.05±0.16 ^b	19.25±2.77 ^b	2.76±0.29 ^b
SR1	15-30	26 591±4 940 ^a	8.23 ^b ±0.22 ^a	0.35±0.07 ^a	1.09±0.15 ^b	19.5±3.27 ^b	2.36±0.36 ^b
SR2	0-15	21 691±3 037 ^a	8.25±0.12 ^a	0.37±0.05 ^a	1.16±0.2 ^b	20.65±2.80 ^b	2.57±0.43 ^b
SR2	15-30	29 871±7 716 ^a	8.33±0.15 ^a	0.38±0.05 ^a	1.06±0.14 ^b	19.73±2.22 ^b	2.69±0.30 ^b

Medias de tratamientos con letras diferentes dentro de cada columna tienen diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$, $a > b$, $n = 4$). HTP: hidrocarburos totales del petróleo, Dap: densidad aparente, lb: tasa de infiltración básica, Mpa: megapascales, ST: suelo testigo y SR: suelo restaurado. Fuente: Trujillo-Narcía et al. 2012.

Table 2. Continuación.
Table 2. Continued.

Suelo	Prof. (cm)	Na (cmol (+) kg ⁻¹)	CIC (cmol (+) kg ⁻¹)	N total (%)	P-Olsen (mg kg ⁻¹)	K (cmol (+) kg ⁻¹)
ST	0-15	0.21±0.04 ^b	26.8±2.52 ^a	0.202±0.022 ^a	31.22±2.99 ^a	0.68±0.098 ^a
ST	15-30	0.20±0.03 ^b	13.33±2.22 ^b	0.125±0.021 ^b	11.98±1.56 ^b	0.43±0.08 ^b
SR1	0-15	0.89±0.14 ^a	10.73±1.35 ^b	0.045±0.013 ^c	9.6±1.19 ^{cb}	0.18±0.025 ^c
SR1	15-30	1.02±0.21 ^a	11.15±0.78 ^b	0.058±0.012 ^c	8.93±1.5 ^{cb}	0.16±0.022 ^c
SR2	0-15	1.06±0.18 ^a	11.18±1.32 ^b	0.067±0.009 ^c	7.28±1.57 ^c	0.17±0.014 ^c
SR2	15-30	1.02±0.17 ^a	10.85±1.19 ^b	0.067±0.012 ^c	8.33±0.87 ^{cb}	0.15±0.022 ^c

Fuente: Trujillo-Narcía *et al.* 2012.

con arreglo factorial 4 x 3 (factor uno, tipo de suelo: ST, SR1, SR2 y SR3; y factor dos, época del año: nortes, sequía y lluvias) con cuatro repeticiones por tratamientos por periodo climático y 48 unidades experimentales. La unidad experimental fue de 2.25 m² (1.5 x 1.5 m), la parcela útil fue de un m² en el centro. Se sembró una semilla certificada de rábano cada 10 cm en marco real. La prueba de germinación registró un 95 %. La humedad del ST se mantuvo a capacidad de campo (35 %), se aplicó la misma cantidad de agua a las unidades experimentales de los SR1, SR2 y SR3.

Muestreo, procesamiento y preservación de las muestras de suelo y rizosfera

A los 42 días de establecido cada bioensayo se colectaron muestras compuestas (10 submuestras) de suelo superficial (0-15 cm de profundidad), y se secaron a la sombra para la determinación de HTP. Las muestras para determinar las poblaciones microbianas se colectaron de la rizosfera de la planta de rábano, se introdujeron en recipientes de vidrio y se preservaron a 4 °C. Para el estudio de la densidad y diversidad de la fauna se colectaron núcleos de suelo preservados a temperatura ambiente.

Parámetros evaluados del suelo y de la planta

Los parámetros evaluados fueron siete variables del suelo y siete de la planta. La extracción de petróleo del suelo se realizó con diclorometano 99.5 % de pureza en equipo soxhlet según el método EPA 418.1 (EPA 1986) y cuantificación gravimétrica (DOF 2006). La densidad de las unidades formadoras de colonias (UFC) de los cinco grupos de microorganismos rizosféricos se

realizó con el método de dilución seriada y determinación de cuenta viable en cajas de Petri (Madigan *et al.* 2009). Se utilizaron los siguientes medios de cultivos selectivos: agar nutriente para bacterias totales (BT), papa dextrosa agar para hongos totales (HT) (Johnson y Curl 1972), para bacterias fijadoras de N de vida libre (BFN) carbón combinado (Rennie 1981), las bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP) con el medio Pikovskayas (fosfato tricálcico) (Rao 1982) y las bacterias solubilizadoras de K (BSK) con el medio de cultivo de sucrosa (sucrosa-polvo de vidrio) (Wu *et al.* 2005). La determinación del CO₂ se realizó por volumetría (Jenkinson y Powlson 1970). La microfauna, mesofauna y la macrofauna (Gobat *et al.* 2004) se extrajo de monolitos de suelo de 0.25 x 0.25 m y 0.3 m de profundidad (Anderson e Ingram 1993), el suelo se fragmentó manualmente y se tamizó a través de mallas ASTM nos. 70 (0.212 mm), 40 (0.425 mm), 12 (1.0 mm) y 10 (2.0 mm), las poblaciones se observaron en estereoscopio, se reportaron a nivel de grupos. Los organismos se preservaron en frasco de vidrio con alcohol al 70 %. Las plantas de la parcela útil se cosecharon a los 42 días después de la siembra, se lavaron con agua y se separaron las hojas, el bulbo y las raíces de cada planta. La altura, el diámetro del bulbo y la longitud de la raíz se midieron con un vernier digital con precisión de 0.1 mm, después se introdujeron en bolsas de papel y se secaron en horno a 72 °C durante 72 h. El pesado se realizó en balanza semianalítica con precisión de 0.01 g.

Índice del impacto ecotoxicológico

El IIE es un índice global que mide el efecto del petróleo crudo en la microflora, en la micro-

Table 3. Concentraciones de diferentes fracciones del petróleo crudo en los suelos testigo y restaurados.

Table 3. Concentrations of different fractions of crude oil in soils control and restoreds.

Variable	Suelo Testigo	Suelo Restaurado (mg kg ⁻¹)			LMP
		1	2	3	
Hidrocarburos totales del petróleo	560	22 800	26 591	21 691	NI
Hidrocarburos fracción media	<26.1	<26.1	<26.1	<26.1	1 200
Hidrocarburos fracción pesada	<85	<85	608.3	673.6	3 000
Naftaleno	<0.0077	<0.0077	<0.0077	<0.0077	NI
Acenaftileno	<0.0052	<0.0052	<0.0052	<0.0052	NI
Acenafteno	<0.0080	<0.0080	<0.0080	<0.0080	NI
Fluoreno	<0.0046	<0.0046	<0.0046	<0.0046	NI
Fenantreno	<0.0051	<0.0051	<0.0051	<0.0051	NI
Antraceno	<0.0049	<0.0049	<0.0049	<0.0049	NI
Fluoranteno	<0.0049	<0.0049	<0.0049	<0.0049	NI
Pireno	<0.0071	<0.0071	<0.0071	<0.0071	NI
Criseno	<0.0080	<0.0080	<0.0080	<0.0080	NI
Benzo(a)antraceno	<0.0052	<0.0052	<0.0052	<0.0052	2
Benzo(b)fluoranteno	<0.0122	<0.0122	<0.0122	<0.0122	2
Benzo(k)fluoranteno	<0.0105	<0.0105	<0.0105	<0.0105	8
Benzo(a)pireno	<0.0052	<0.0052	<0.0052	<0.0052	2
Indeno (1,2,3-cd)pireno	<0.0033	<0.0033	<0.0033	<0.0033	2
Dibenzo(a,h)antraceno	<0.0043	<0.0043	<0.0043	<0.0043	2
Benzo(g,h,i)perileno	<0.0049	<0.0049	<0.0049	<0.0049	NI

LMP: límites máximos permisibles para suelo agrícola según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF 2013). NI: variable no incluida en la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF 2013). Fuente: datos no publicados y proporcionados por el MIPA Carlos Salvador Chablé.

fauna, mesofauna, megafauna del suelo, y en la planta. El valor del IIE de cada parámetro se determinó con la siguiente ecuación:

$$IIE_x = \frac{\text{Parametro x del suelo testigo}}{\text{Valor mas pequeño del parámetro x del suelo restaurado}}$$

Si el IIE_x es igual a uno no existe efecto del petróleo, si el valor es mayor que uno existe efecto negativo del petróleo, si el IIE es menor que uno existe efecto positivo (hormesis); en cambio, si el valor no existe, entonces se asignó un valor arbitrario de 700 para representar el efecto tóxico severo en el parámetro debido a la exposición crónica.

Análisis de datos

Se realizó contrastes ortogonales, el ANDEVA de las medias de los tratamientos y las correlaciones múltiples (Tukey $p \leq 0.05$) (SAS 2005) de las variables evaluadas por época.

RESULTADOS

Los resultados del análisis de contrastes ortogonales tienen diferencias entre el ST (suelo

testigo, sin petróleo) y los SR1 y SR3 (suelos restaurados pero contaminados con petróleo). La comparación entre el ST y el SR2 no muestra suficientes evidencias para establecer diferencias entre ambos.

Microflora del suelo

Las densidades de la microflora del suelo variaron de 10^4 UFC g de suelo seco en los hongos totales y 10^8 UFC por g de suelo en las bacterias totales (Tabla 4). Los datos reportados muestran diferencias estadísticas (Tukey, $p \leq 0.05$) de las densidades de bacterias totales, hongos totales, BFN, BSP, BSK y de la cantidad de CO₂ liberado de la respiración microbiana. Las densidades de las bacterias en las épocas nortes y lluvias no disminuyeron por el efecto de los HTP pero si fueron inhibidas en

el periodo de sequía. Destaca que los cinco grupos de la microflora del suelo y la producción de CO₂ fueron menores en la época de sequía, mientras que los hongos totales, BFN y las BSK aumentaron las densidades en las épocas de nortes y/o de lluvias. Con la presencia de HTP aumentó la población de hongos totales 15 veces en la época de nortes, tres en las BFN en la época de lluvias; 15 veces la densidad de BSP y 1.3 de BSK, ambas en la época de nortes. Los HTP afectaron la densidad de hongos totales (-0.45**) y también la producción de CO₂ (-0.663**) (Tabla 5).

Fauna del suelo

La fauna del suelo testigo agrupó moluscos (ortogastrópodos), lumbrícidos, nemátodos, arácnidos, ácaros, diplópodos, quilópodos, isópodos, colémbolos, dipluros, coleópteros, himenópteros (formícidos), dictiópteros (blatodeos), hemípteras, larvas y huevos de insectos y cocones de lumbrícidos; en cambio en los suelos restaurados sólo se encontraron algunas conchas de pequeños moluscos (ortogastrópodos) muertos (Tabla 4). La densidad de la fauna fue afectada severamente por la presencia de los HTP a pesar que el suelo fue restaurado. Se encontraron diferencias de las densidades poblacionales (Tukey, $p \leq 0.01$) entre y dentro de los suelos en las tres épocas experimentales, además se observó alta correlación negativa (-0.729**) entre la densidad de la fauna y la cantidad de HTP (Tabla 5). Al comparar la densidad de la fauna en cada época se identificó que disminuyó, respecto al testigo, 19 veces en la época de sequía y aumentó a 76 en la época lluvias (Tabla 4).

Planta de rábano

Los datos de la Tabla 6 muestran que las variables altura de la planta, diámetro del bulbo, longitud de la raíz, biomasa seca del follaje, del bulbo y de la raíz fueron diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$) por efecto tóxico de los HTP persistentes en el suelo restaurado en las tres épocas experimentales. Si se comparan las siete variables evaluadas dentro de la misma época experimental, por ejemplo en la época de nortes, es claro que a mayor cantidad de HTP la planta fue más afec-

tada, disminuyó la altura (-0.766**) (Tabla 5), fue menor el diámetro del bulbo (-0.496**) por tanto disminuyó la biomasa seca total (-0.691**) por efecto del petróleo. A pesar que la raíz de la planta estuvo en contacto directo con los hidrocarburos, la longitud no tuvo diferencias estadísticas (-0.134) pero sí afectó (-0.66**) la biomasa de la raíz. Observaciones realizadas en campo confirmaron las diferencias de longitud y grosor de la raíz pero se fragmentó durante la cosecha porque el suelo restaurado estaba endurecido, con valores de resistencia a la penetración hasta de 8.2 Mpa (Tabla 1, Trujillo-Narcía *et al.* 2012). Este error experimental no permitió identificar diferencias estadísticas de la longitud radical entre el suelo testigo con el restaurado. En cuanto al efecto de la época experimental se observaron diferencias significativas en las medias de las siete variables de la planta de rábano (Tabla 6). El mayor efecto tóxico de los hidrocarburos del petróleo en la planta ocurrió en la época de sequía, la altura disminuyó 4.1 veces respecto a la planta que creció en el suelo testigo, además no se formó bulbo. Otro efecto dañino en las plantas que crecieron en suelos restaurados fue la necrosis y muerte desde la tercera semana de la siembra, al final del ciclo experimental (día 42) la mortalidad fue 90, 92 y 88 %, en los suelos restaurados 1, 2 y 3, respectivamente. La producción de biomasa fue variable dentro y entre las tres épocas experimentales. La presencia de los HTP causó hasta 318 veces la disminución del follaje de rábano en la época sequía (Tabla 6), no se formó biomasa del bulbo y la biomasa de la raíz fue menor 186 veces respecto al testigo.

Índice de impacto ecotoxicológico

El efecto tanto de los HTP como de la época experimental originó diferencias (Tabla 6, Figura 3) en los valores de los IIE correspondientes a las siete variables de la planta de rábano (altura, diámetro del bulbo, longitud de la raíz, biomasa del follaje, bulbo, raíz y total), de los seis grupos de la microflora del suelo (bacterias totales, hongos totales, BFN, BSP, BSK y producción de CO₂) y de la fauna del suelo (Figura 3).

Table 4. Valores medios de las variables biológicas de muestras de suelo superficial (0-15 cm profundidad) en tres épocas experimentales.
Table 4. Mean values of biological variables of surface soil samples (0-15 cm depth) in three experimental seasons.

Época/ tratamiento	HTP (mg kg ⁻¹)	Densidad de microflora del suelo (UFC g suelo seco)					Resp. microbiana BSP (10 ³)	BSP (10 ³)	BSK (10 ³)	Resp. microbiana (CO ₂ moles)	Fauna suelo (0.0625 m ²)
		BT (10 ³)	HT (10 ²)	BFN (10 ²)	BSP (10 ³)	BSK (10 ³)					
Nortes (nov.-feb.)											
ST	867±249.4 ^b	1 883±554 ^a	49±11 ^b	493±98 ^{ab}	71±11 ^b	385±70 ^{ab}	63.8±12.04 ^a	126±13.59 ^a			
SR1	10 540±1586 ^a	10 566±6097 ^a	46±5 ^b	307±41 ^b	77±2 ^b	137±65 ^c	0±0 ^b	4.67±1.25 ^b			
SR2	11 100±2070 ^a	816±320 ^a	30±9 ^b	421±55 ^{ab}	12±2 ^c	484±181 ^a	0±0 ^b	2.33±2.52 ^b			
SR3	7 400±373 ^a	4 740±306 ^a	727±2 ^a	640±149 ^a	423±30 ^a	387±103 ^{ab}	0±0 ^b	2.33±0.47 ^b			
Sequía (mar.-may.)											
ST	1 050±250 ^c	2 828±851 ^a	1 366±550 ^a	1 907±635 ^a	359±146 ^a	274±48 ^a	87.87±12.19 ^a	31.33±4.04 ^a			
SR1	9 773±666 ^a	13±3 ^c	12±16 ^b	28±4 ^b	35±60 ^b	3±5 ^b	17.80±13.56 ^{ab}	3±2 ^b			
SR2	10 680±1712 ^a	6 401±113 ^b	15±19 ^b	53±92 ^b	3±5 ^b	10±17 ^b	35.57±5.49 ^b	2.33±2.08 ^b			
SR3	6 480±938 ^b	27±6 ^c	15±19 ^b	28±45 ^b	25±42 ^b	6±9 ^b	17.77±5.59 ^c	1.67±0.58 ^b			
Lluvias (jun.-oct.)											
ST	867±321 ^c	1 933±416 ^a	33±88 ^b	8 100±200 ^b	680±115 ^a	267±83 ^a	12.25±7.45 ^a	203±17.56 ^a			
SR1	11 210±1 266 ^a	11 600±8 316 ^a	150±60 ^a	16 600±8 624 ^{ab}	1 253±329 ^a	200±20 ^a	0±0 ^a	3.67±2.08 ^b			
SR2	11 040±1 467 ^a	1 700±781 ^a	10±3 ^b	6 567±1 817 ^b	657±182 ^a	393±70 ^a	7.45±5.1 ^a	3.33±1.15 ^b			
SR3	7 847±673 ^b	4 933±416 ^a	32±13 ^b	24 500±6497 ^a	10 217±12 803 ^a	407±117 ^a	12.65±5.89 ^a	2.67±1.53 ^b			

Medias de tratamientos con letras diferentes dentro de cada columna en cada ciclo tienen diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$, $a > b$, $n = 3$). HTP: hidrocarburos totales del petróleo, BT: bacterias totales, HT: hongos totales, BFN: bacterias fijadoras de N, BSP: bacterias solubilizadoras de fosfatos, BSK: bacterias solubilizadoras de K, ST: suelo testigo y SR: suelo restaurado.

Table 5. Valores de correlación de Pearson entre hidrocarburos, biomasa vegetal, microflora y fauna en suelos testigo y restaurados.
Table 5. Pearson correlation values between hydrocarbons, plant biomass, soil microflora and fauna in control and restored soils.

Variable	AP	LR	DB	BF	BB	BR	BIOT	CO ₂	BT	HT	BFN	BSP	BSK	Fauna suelo
HTP	-0.766**	NS	-0.496**	-0.712**	-0.658**	-0.660**	-0.691**	-0.663**	NS	-0.450**	NS	NS	NS	-0.729**
AP		0.477**	0.731**	0.623**	0.573**	0.591**	0.604**	0.428**	NS	NS	NS	NS	.401*	0.814**
LR			0.614**	0.366*	0.418*	0.390*	0.393*	NS	0.488**	NS	NS	NS	.443**	NS
DB				0.700**	0.726**	0.635**	0.714**	0.358*	NS	0.510**	NS	NS	.541**	.394*
BF					0.981**	0.944**	0.996**	0.802**	NS	0.761**	NS	NS	.336*	NS
BB						0.920**	0.994**	0.745**	NS	0.796**	NS	NS	NS	NS
BR							0.941**	0.732**	NS	0.676**	NS	NS	.351*	NS
BIOT								0.779**	NS	0.779**	NS	NS	.330*	NS
CO ₂									NS	0.688**	NS	NS	NS	NS
BT										NS	NS	NS	NS	NS
HT											NS	NS	NS	NS
BFN												0.406*	NS	NS
BSP													NS	NS
BSK														NS

*Correlación significativa al nivel de $p \leq 0.05$. **Correlación significativa al nivel de $p \leq 0.01$, NS: no existe significancia. $n = 36$. HTP: hidrocarburos totales del petróleo, AP: altura de la planta, LR: longitud de la raíz, DB: diámetro del bulbo, BF: biomasa foliar, BB: biomasa del bulbo, BR: biomasa de la raíz, BIOT: biomasa total, CO₂: respiración microbiana, BT: bacterias totales, HT: hongos totales, BFN: bacterias fijadoras de N, BSP: bacterias solubilizadoras de fosfatos y BSK: bacterias solubilizadoras de K.

Los IIE de la fauna fueron los más altos, con valores cercanos a 80 en los tres suelos restaurados en las épocas de nortes y de lluvias. La menor sensibilidad de los cinco grupos de la microflora a la exposición de los HTP originó valores menores a cinco en las épocas de norte y de lluvias pero aumentó hasta 220 en bacterias totales en el periodo de sequía. No se pudo calcular el IIE del bulbo en la época de sequía porque no se formó en las plantas que crecieron en los suelos restaurados 1, 2 y 3 (Tabla 6), de manera arbitraria se asignó un valor de IIE de 700 (Figura 3).

DISCUSIÓN

Microflora del suelo

La correlación entre la cantidad de HTP con la densidad de hongos totales fue negativa y altamente significativa (-0.45**) y también con la producción de CO₂ microbiano (-0.663**) pero no hubo correlación con la densidad de BT, BFN, BSP y ni con las BSK (Tabla 5). Esta ausencia de efecto puede ser atribuida a que a pesar de que se encontró hasta 11 210 mg de HTP en el suelo, el petróleo se adsorbe en la materia particulada, lo que disminuye su toxicidad, igualmente porque a corto plazo el petróleo y las fracciones del mismo que contienen asfalto no se degradan significativamente (Atlas y Bartha 2002), de modo que disminuye la biodisponibilidad. En cuanto a la humedad en el suelo testigo fue menor a 30 % y en los tres restaurados fue aún menor, varió de 12.5 a 13.5 % (Tabla 1), estas cantidades son bajas, se recomienda al menos 35 % para que los microorganismos tengan condiciones adecuadas para su multiplicación en suelos contaminados con petróleo (Riser-Roberts 1998). En la época experimental de sequía todos los microorganismos evaluados disminuyeron sus densidades (Tabla 4), quizá se asocia a que cuando una célula se encuentra en un medio con baja actividad hídrica, el agua puede salir de la célula, lo que representa un grave problema pues una célula deshidratada no puede crecer (Madigan et al. 2009). A este factor de

estrés hídrico debe adicionarse el efecto de los bajos contenidos de los nutrimentos N, P y K (Tabla 2) en los tres suelos restaurados, lo que reduce la eficiencia de la oxidación aeróbica del petróleo (Madigan et al. 2009). Por otro lado, sólo un número limitado de especies bacterianas tienen la capacidad combinada de la fijación de N₂ y la oxidación de hidrocarburos. Se ha reportado que ambos procesos bioquímicos pueden ocurrir simultáneamente en bacterias oxidantes del metano pero muy pocas especies pueden fijar N₂ y oxidar hidrocarburos de mayor peso molecular. Esta restricción puede asociarse a incompatibilidades en la fisiología y/o en la regulación de los genes (Foght 2010). Estudios de suelos afectados por derrames de petróleo en áreas de manglares han mostrado la presencia de cepas con potencial de fijación de nitrógeno, para la solubilización de fósforo, también mostraron perfil prometedor de degradación y para la promoción de crecimiento vegetal (Lima et al. 2011). Igualmente, estudios microbiológicos realizados en Gleysoles e Histosoles, localizados en humedales en Tabasco, afectados por derrames crónicos de petróleo, mostraron que los HTP originan la disminución de las densidades poblacionales de *Azospirillum*, *Azotobacter*, de las bacterias solubilizadoras de fósforo y de los hongos totales en rizosferas de gramíneas, ciperáceas, juncáceas y leguminosas (Rivera-Cruz 2011). Las BFN poseen la característica de adaptarse en suelos contaminados con petróleo crudo aunque disminuye la diversidad de colonias (Vázquez-Luna et al. 2011).

La respuesta diferente de estas bacterias a la exposición a los HTP puede estar relacionada con diferencias fisiológicas y de regulación genética (Foght 2010).

Fauna del suelo

La densidad de la fauna del suelo es un parámetro efectivo porque no se encontraron en ninguna de las tres épocas, organismos vivos en los tres SR pero si en el ST (Tabla 4).

Table 6. Efecto de los hidrocarburos totales del petróleo en la planta de rábano en tres épocas experimentales.
Table 6. Effect of total petroleum hydrocarbons in the radish plant in three experimental seasons.

Época/ tratamiento	HTP (mg kg ⁻¹)	AP (cm)	DB (cm)	LR (cm)	BF (g)	BB (g)	BR (g)	BIOT (g)
Nortes (nov.-feb.)								
ST	867±249.4 ^b	26.94±1.1 ^a	2.56±1.02 ^a	7.2±0.95 ^a	126.43±11.25 ^a	90.1±1.2 ^a	8.03±2.55 ^a	224.57±25.39 ^a
SR1	10 540±1 585.6 ^a	5.11±1.1 ^c	0.61±0.26 ^b	5.31±1.1 ^a	10.13±1.1d	4.51±1.1 ^c	2.98±1.28 ^{ab}	17.63±5.86 ^c
SR2	11 100±2 070.1 ^a	7.97±0.57 ^{bc}	1.28±0.14 ^{ab}	6.56±1.47 ^a	33.9±4.7 ^c	22.98±7.24 ^c	2.72±0.8 ^b	59.59±12.54 ^c
SR3	7 400±373.2 ^a	10.71±1.83 ^b	1.73±0.27 ^{ab}	6.81±0.54 ^a	59.19±1.41 ^b	65.53±4.22 ^b	4.26±1.15 ^{ab}	129.08±5.83 ^b
Sequia (mar.-may.)								
ST	1 050±250 ^c	15.73±2.15 ^a	3.31±0.03 ^a	7.25±0.43 ^a	184.42±9.62 ^a	165.37±12.68 ^a	11.17±2.06 ^a	360.96±17.6 ^a
SR1	9 773±666 ^a	4.08±0.64 ^b	0±0 ^b	3.25±2.84 ^a	0.58±0.17 ^b	0±0 ^b	0.07±0.03 ^b	0.65±0.17 ^b
SR2	10 680±1 712 ^a	3.82±0.81 ^b	0±0 ^b	5.27±1.07 ^a	0.96±0.96 ^b	0±0 ^b	0.09±0.09 ^b	1.05±1.06 ^b
SR3	6 480±938 ^b	5.97±0.52 ^b	0±0 ^b	4.77±0.73 ^a	0.65±0.78 ^b	0±0 ^b	0.06±0.06 ^b	0.7±0.84 ^b
Lluvias (jun.-oct.)								
ST	867±321 ^c	22.84±1.53 ^a	2.1±0.16 ^{ab}	6.03±0.19 ^b	30.92±1.23 ^a	24.39±4.05 ^a	2.59±0.56 ^a	57.91±3.97 ^a
SR1	11 210±1 266 ^a	14.03±1.59 ^b	2.75±0.12 ^a	9.37±1.41 ^a	19.29±3.52 ^b	31.36±6.21 ^a	1.65±0.77 ^{ab}	52.31±10.41 ^a
SR2	11 040±1 467 ^a	8.96±3.03 ^b	1.73±0.19 ^{ab}	5.48±1.18 ^b	10.71±6.83 ^{bc}	8.65±1.57 ^b	0.5±0.26 ^b	19.85±5.5 ^b
SR3	7 847±673 ^b	8.89±2.36 ^b	1.32±0.96 ^b	6.42±0.62 ^b	7.46±3.37 ^c	5.39±5.25 ^b	0.5±0.2 ^b	13.35±8.8 ^b

Medias de tratamientos con letras diferentes dentro de cada columna en cada ciclo tienen diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$, $a > b$, $n = 3$). HTP: hidrocarburos totales del petróleo, AP: altura de la planta, LR: longitud de la raíz, DB: diámetro del bulbo, BF: biomasa foliar, BB: biomasa del bulbo, BR: biomasa de la raíz, BIOT: biomasa total.

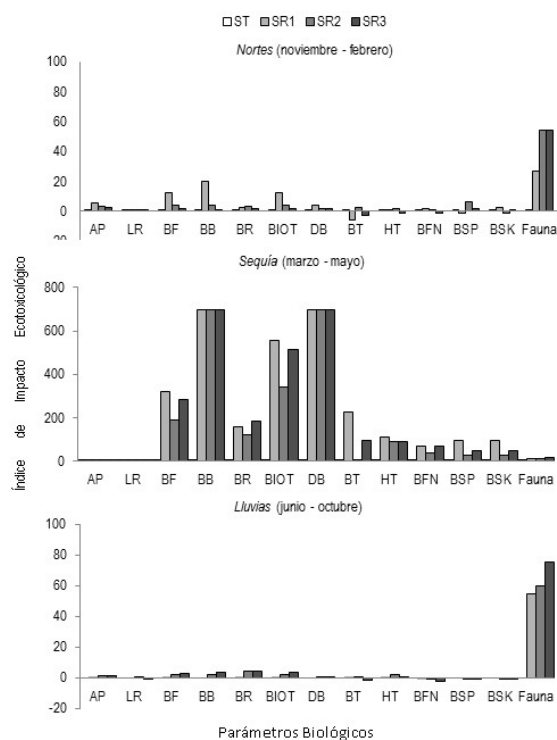


Figure 3. Valores de los índices de impacto ecotoxicológico en las tres épocas del año. ST: suelo testigo, SR1: suelo restaurado 1, SR2: suelo restaurado 2, SR3: suelo restaurado 3, AP: altura de planta, LR: longitud de raíz, BF: biomasa del follaje, BB: biomasa del bulbo, BR: biomasa de raíz, BIOT: biomasa total, DB: diámetro del bulbo, BT: bacterias totales, HT: hongos totales, BFN: bacterias fijadoras de N, BSP: bacterias solubilizadoras de fosfatos, BSK: bacterias solubilizadoras de K.

Figure 3. Values of the ecotoxicological impact indices for the three seasons of the year. ST: control soil, SR1: restored 1 soil, SR2: restored 2 soil, SR3: restored 3 soil, AP: plant height, LR: root length, BF: leaf biomass, BB: bulb biomass, BR: root biomass, BIOT: total biomass, DB: bulb diameter, BT: total bacteria, HT: total fungi, BFN: N-fixing bacteria, BSP: bacteria that solubilise phosphates, BSK: bacteria that solubilise K.

En este trabajo la densidad fauna del suelo se correlacionó negativamente (-0.729**) con la concentración de los HTP y fue positiva (0.814**) con la altura de la planta de rábano (Tabla 5). La lombriz de tierra colectada en el estudio es una especie sensible, se ha reportado que es afectada en forma letal y subletal y mueren a los pocos días después de la exposición a petróleo (Hanna y Weaver 2002, Dawson *et al.* 2007). Los demás grupos de la fauna del suelo, nemátodos, arácnidos,

ácaros, moluscos, diplópodos, quilópodos, isópodos, colémbolos, dipluros, coleópteros, himenópteros, dictiópteros, hemípteros, larvas y huevos de insectos y cocones de lumbrícidos, no se encontraron posiblemente por la modificación del edafocistema, lo que pudo haber ocasionado la disminución de los servicios ambientales de hábitat, refugio y fuentes alimenticias y por la disminución del reciclaje de la materia orgánica (Gobat *et al.* 2004, Lavelle *et al.* 2006). La importancia del estudio de la fluctuación poblacional de la fauna del suelo es porque se recomienda la inclusión de parámetros de los bioindicadores para identificar la dinámica de la remoción de hidrocarburos. Esta información fortalece la evaluación basada en herramientas tradicionales de monitoreo (Maila y Cloete 2005) ya que la degradación o disipación de los contaminantes orgánicos no solo se determina mediante análisis químico, es recomendable la aplicación de pruebas ecotoxicológicas (Mendonça y Picado 2002) con diferentes organismos después de los procesos de descontaminación para identificar los efectos tóxicos en organismos de prueba (Molina-Barahona *et al.* 2005). Se ha reportado que la densidad de la fauna de invertebrados del suelo es un parámetro efectivo para la medición de los efectos tóxicos de diferentes tipos de petróleos crudos y aceite (Efroymsen *et al.* 2004). Estudios recientes confirman que concentraciones de 15 000 mg kg⁻¹ de HTP originan daños en lombrices en el suelo (Tang *et al.* 2011), igualmente estudios realizados en suelos contaminados con petróleo crudo demostraron que la abundancia y diversidad de ácaros y de larvas de dípteros son menos afectados que otros grupos, en cambio la diversidad de colémbolos disminuye por la exposición a los hidrocarburos aromáticos policíclicos (Uribe-Hernández *et al.* 2010).

Planta de rábano

La planta de rábano es sensible a la exposición a HTP, las variables más afectadas fueron el diámetro y la biomasa del bulbo y también la biomasa total vegetal (Tablas 5 y 6). Se sabe que ésta especie vegetal es sensible a factores de estrés toxicológico (OECD 2006). En general, la fitotoxicidad de diferentes tipos de petróleos crudos medio,

pesado y de aceite son ocasionados por concentraciones mayores a $10\ 000\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ pero valores menores de otras mezclas de derivados del petróleo también originan fitotoxicidad (Efroymsen *et al.* 2004). Los derrames y fugas de petróleo crudo en el suelo no sólo producen daños en la planta de rábano sino que también se manifiesta en la disminución de la altura y de la biomasa de especies de gramíneas, ciperáceas y de leguminosas que crecen en suelos hasta con $79\ 457\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ de HTP intemperizado (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía 2004, Rivera-Cruz *et al.* 2005). Estudios han mostrado que otras dicotiledóneas (*Crotalaria incana*, *Leucaena leucocephala* y *Vigna unguiculata*) son también especies sensibles a la exposición a HTP (Vázquez-Luna *et al.* 2010) y al petróleo crudo como el chícharo (*Pisum sp*) y la mostaza (*Brassica sp*) (Dawson *et al.* 2007), de modo que pueden ser considerados como especies bioindicadoras para la identificación de la calidad de la restauración de suelos contaminados con petróleo.

Índice de impacto ecotoxicológico

Estudios toxicológicos efectuados en plantas de gramíneas, ciperáceas, juncáceas y leguminosas expuestas a suelos con petróleos intemperizado y fresco, mostraron la existencia de relación directa entre el incremento de la cantidad de HTP con el grado de la fitotoxicidad (Tabla 6). Los resultados muestran tendencias similares con otros estudios toxicológicos en plantas expuestas a petróleo crudo. Estudios con las leguminosas zarza (*Mimosa sp*) y chipilín silvestre (*Crotalaria sp*), que son especies sensibles a la exposición a petróleo, muestran que los índices de impacto ecotoxicológico más altos correspondieron a la biomasa y la altura de la planta (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía 2004), el número de nódulos y la presencia/ausencia de leghemoglobina dentro del nódulo (Rivera-Cruz *et al.* 2005). Otros estudios evidencian que en otra leguminosa (*Vigna unguiculata*) los parámetros con índices más altos son la biomasa y el número de nódulos. En cuanto a la fauna del suelo los invertebrados son más sensibles que las plantas (Efroymsen *et al.* 2004), en particular la lombriz de tierra porque entra en con-

tacto directo el petróleo con su cuerpo que carece de protección externa, muere a los pocos días (Hanna y Weaver 2002, Dawson *et al.* 2007) de inicio de la prueba o del efecto de un derrame o fuga de petróleo. Los índices más sensibles de la microflora del suelo fueron las densidades de bacterias y los hongos heterótrofos (Figura 3), esto coincide con resultados recientes (Rivera-Cruz 2011) y también con las densidades poblacionales de *Azospirillum* y *Azotobacter* que fueron inhibidas por la exposición a suelos con petróleo intemperizado.

CONCLUSIONES

Es necesaria la inclusión de nuevos parámetros en la normatividad oficial mexicana relacionada con el establecimiento de límites máximos permisibles de hidrocarburos en el suelo y para la remediación de suelos contaminados con petróleo y sus derivados. Los parámetros biológicos del suelo y de la planta de rábano mostraron que el Fluvisol permanece contaminado a pesar de la aplicación del proceso de restauración *ex situ* físico y químico. Las variables más sensibles en la época de *sure*s fueron el bulbo y la biomasa seca de la planta de rábano, en cambio en las épocas de nortes y lluvias fue la densidad de la fauna del suelo. El índice del impacto ecotoxicológico es una herramienta sencilla que muestra la calidad de la restauración de un Fluvisol afectado por derrames o fugas de petróleo crudo según la época climática del año.

AGRADECIMIENTOS

A Fondos Mixtos CONACYT-Gobierno del Estado de Tabasco, por el financiamiento económico a través del proyecto TAB-2009-C18-122174. Igualmente al Colegio de Postgraduados por el apoyo del Fideicomiso Revocable de Administración e Inversión No.167304, convocatorias 2009 y 2010. Al Sr. Rubén Sánchez Torres y a su esposa Leticia García Tiquet por las facilidades para la realización del estudio en el terreno de su propiedad. A los árbitros anónimos por sus aportes valiosos.

LITERATURA CITADA

- Al-Mutairi N, Bufarsan A, Al-Rukaibi F (2008) Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* 74(1): 142-148.
- Anderson MJ, Ingram IJS (1993) *Tropical Soil Biology and Fertility: a Handbook of Methods*. 2nd CAB International. Wallingford, UK. 221 p.
- Atlas RM, Bartha R (2002) *Ecología Microbiana y Microbiología Ambiental*. 4a. ed. Pearson Educación, S.A. Madrid, Esp. 677 p.
- British Petroleum (2012) *BP Statistical Review of World Energy June 2012*. London, UK. 48 p.
- Cébron A, Beguiristain T, Faure P, Norini MP, Masfaraud JF, Leyval C (2009) Influence of vegetation on the in situ bacterial community and polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degraders in aged PAH-contaminated or thermal-desorption-treated soil. *Applied and Environmental Microbiology* 75(19): 6322-6330.
- Cébron A, Cortet J, Criquet S, Biaz A, Calvert V, Caupert C, Pernin C Leyval C (2011) Biological functioning of PAH-polluted and thermal desorption-treated soils assessed by fauna and microbial bioindicators. *Research in Microbiology* 162(9): 896-907.
- Cutz-Pool LQ, Palacios-Vargas JG, Castaño-Meneses G, García-Calderón NE (2007) Edaphic Collembola from two agroecosystems with contrasting irrigation type in Hidalgo State, Mexico. *Applied Soil Ecology* 36(1): 46-52.
- Dawson JJC, Godsiffe EJ, Thompson IP, Ralebitso-Senior TK, Killham KS, Paton GI (2007) Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soil. *Soil Biology and Biochemistry* 39(1): 164-177.
- DOF (2006) NMX-AA-134-SCFI-2006 Suelos hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría método de prueba. 12 de octubre de 2006. 27 p.
- DOF (2013) Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Martes 10 de septiembre de 2013. Segunda sección. 16 p.
- Efroymson RA, Sample BE, Peterson MJ (2004) Ecotoxicity test data for total petroleum hydrocarbons in soil: plants and soil-dwelling invertebrates. *Human and Ecological Risk Assessment* 10(2): 207-231.
- EPA (1986) Method 418.1 mod. Petroleum Hydrocarbon, Total Recoverable. Environmental Protection Agency. Spectrophotometric Infrared. 8 p.
- Foght T (2010) Nitrogen fixation and hydrocarbon-oxidizing bacteria. In: Timmis KN (ed) *Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer-Verlag Part 18. pp: 1661-1668.
- Gobat J-M, Aragno M, Matthey W (2004) *The Living Soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Science Publisher, Inc. Enfield, NH, USA. 602 p.
- Hanna SHS, Weaver RW (2002) Earthworm survival in oil contaminated soil. *Plant and Soil* 240(1): 127-132.
- INEGI (2001) *Síntesis de Información Geográfica del Estado de Tabasco*. 1a. ed. INEGI. Aguascalientes, Ags., Méx. 100 p. + Anexo cartográfico escala 1:500,000
- INIFAP-COFUPRO (2012) Datos históricos estación climatológica Libertad, Cunduacán, Tabasco periodo 2008-2011 [en línea]. <http://clima.inifap.gob.mx/redinifap/historicos.aspx?est=38197edo=26m=1an=2009.14/12/2012>.

- Jenkinson DS, Powlson DS (1970) Residual effects of soil fumigation on soil respiration and mineralization. *Soil Biology and Biochemistry* 2(2): 99-108.
- Johnson LF, Curl EA (1972) *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Min, USA. 147 p.
- Lavelle P, Decaëns T, Aubert M, Barot S, Blouin M, Bureau F, Margerie P, Mora P, Rossi J-P (2006) Soil invertebrates and ecosystem services. *European Journal of Soil Biology* 42(Sup 1): S3-S15.
- Lima do CF, Fragoso dos SH, Ferreira ME, van Elsas JD, Soarez RA (2011) Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from rhizospheres of mangrove plants. *The Journal of Microbiology* 49(4): 535-543.
- Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP (2009) Brock. *Biología de los microorganismos*. 12a. ed. Pearson Educación, S. A. Madrid, Esp. 1259 p.
- Maila MP, Cloete TE (2005) The use of biological activities to monitor the removal of fuel contaminants-perspective for monitoring hydrocarbon contamination: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation* 55(1): 1-8.
- Mendonça E, Picado A (2002) Ecotoxicological monitoring of remediation in a coke oven soil. *Environmental Toxicology* 17(1): 74-79.
- Molina-Barahona L, Vega-Loyo L, Guerrero M, Ramírez S, Romero I, Vega-Jarquín C, Albores A (2005) Ecotoxicological evaluation of diesel-contaminated soil before and after a bioremediation process. *Environmental Toxicology* 20(1): 100-109.
- OECD (2006) *Guideline for the testing of chemicals. Proposal for updating guideline 208. Terrestrial plant test: 208: Seedling emergence and seedling growth test*. 19 p.
- PEMEX (2011) *Anuario Estadístico 2011. Petróleos Mexicanos*. México, D.F. 78 p.
- PEMEX (2012) <http://www.pemex.com/index.cfm?action=newssectionID=8catID=40contentID=4152> [en línea] 15/12/2012.
- Plaza G, Nałecz-Jawaki G, Ulgi K, Brigmon RL (2005) The application of bioassays as indicators of petroleum-contaminated soil remediation. *Chemosphere* 59(2): 289-296.
- Rao NS (1982) *Biofertilizers in Agriculture*. Oxford/IBH. Nueva Delhi, India. 186 p.
- Rennie RJ (1981) A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology* 27(1): 8-14.
- Riser-Roberts E (1998). *Remediation of Petroleum Contaminated Soils. Biological, Physical, and Chemical Processes*. Lewis Publishers. Boca Raton, FL, USA. 542 p.
- Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A (2004) Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29(7): 369-376.
- Rivera-Cruz MC, Trujillo-Narcía A, Miranda de la CMA, Maldonado CE (2005) Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30(6): 326-331.
- Rivera-Cruz MC (2011) Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco. En: Gamboa MA, Rojas HR (eds). *Volumen 1. 1a. ed. Recursos genéticos microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México*. SUBNAGERM. CICY. UADY. SAGARPA. México, D.F. pp: 78-87.

- Rivera-Cruz MC, Maldonado-Chávez E, Trujillo-Narcía A (2012) Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaena leucocephala* and on soil and plant macronutrients. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 15(Sup 2): S30-S39.
- SAS (2005) Users Guide, Version 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC, USA. 664 p.
- Saterback A, Toy RJ, McMMain BJ, Williams MP, Dorn PB (2000) Ecotoxicology and analytical assessment of effects of bioremediation on hydrocarbon-containing soil. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11): 2643-2652.
- Spurgeon DJ, Morgan AJ, Kille P (2008) Current research in soil invertebrate ecotoxicogenomics. *Advances in Experimental Biology* 2: 133-163.
- Tang J, Wang M, Wang F, Sun Q, Zhou Q (2011) Eco-toxicity of petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences* 23(5): 845-851.
- Trujillo-Narcía A, Rivera-Cruz MC, Lagunes-Espinoza LC, Palma-López DJ, Soto-Sánchez S, Ramírez-Valverde G (2012) Efecto de la restauración de un Fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(4): 361-374.
- Uribe-Hernández R, Juárez-Méndez CH, Montes de Oca MA, Palacios-Vargas JG, Cutz-Pool L, Mejía-Recarmier BE (2010) Colémbolos (Hexápoda) como bioindicadores de la calidad de suelos contaminados con hidrocarburos en el sureste de México. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 81(1): 153-162.
- Vázquez-Luna D, Castelán-Estrada M, Rivera-Cruz MC, Ortiz-Ceballos AI, Izquierdo RF (2010) *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): Especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 26(3): 183-191.
- Vázquez-Luna M, Montiel-Flores A, Vázquez-Luna D, Herrera-Tenorio M (2011) Impacto del petróleo crudo en el suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 13(3): 511-523.
- West RC, Psuty NP, Thom BG (1985) *Las tierras bajas de Tabasco en el sureste de México*. 2a. edición. Gobierno del Estado de Tabasco. Villahermosa, Tab., Méx. 409 p.
- Wu SC, Cao ZH, Li ZG, Cheung KC, Wong MH (2005) Effects of biofertilizer containing N-fixer, P and K solubilizers and AM fungi on maize growth: a greenhouse trial. *Geoderma* 125(1-2): 155-166.