

UNIVERSIDAD CATÓLICA SEDES SAPIENTIAE

FACULTAD DE INGENIERÍA AGRARIA

CARRERA DE INGENIERÍA AMBIENTAL

UCSS



TESIS DE INVESTIGACIÓN

“EFECTOS DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *Rhizophagus intraradices* (N.C. SCHENCK & G.S.SM.) C. WALKER & A. SCHÜBLER Y FABÁCEAS NATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO”

EJECUTORA:

Bach. ANA LUCIA RAMOS TORRE

ASESORA:

Mg. HEIDI ISABEL SÁNCHEZ TORRES

LIMA-PERÚ

2019

ACTA DE SUSTENTACIÓN

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

ACTA N° 002 - 2019/UCSS/FIA

Siendo las 11:00 am, del día 29 de marzo de 2019, en el Aula 208 del Local Central de la Sede Lima - Universidad Católica Sedes Sapientiae, el Jurado de Tesis, integrado por:

- | | |
|--|-----------------|
| 1. Dr. Honorio Eloy Munive Jáuregui | Presidente |
| 2. Ing. Julián Alberto Álvarez Paredes | Primer Miembro |
| 3. Mg. Sc. Wilfredo Mendoza Caballero | Segundo Miembro |
| 4. Mg. Sc. Heidi Isabel Sánchez Torres | Asesora |

Se reunieron para la sustentación de la tesis titulada "EFECTOS DE LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE *Rhizophagus intraradices* (N.C. SCHENCK & G.S.SM.) C. WALKER & A. SCHÜBLER Y FABÁCEAS NATIVAS EN EL TRATAMIENTO DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO", que presenta la bachiller en Ciencias Ambientales, la Srta. Ana Lucía Ramos Torre cumpliendo así con los requerimientos exigidos por el reglamento para la modalidad de titulación, la presentación y sustentación de un trabajo de investigación original, para obtener el Título Profesional de **Ingeniero Ambiental**.

Terminada la sustentación, el Jurado luego de deliberar acuerda:

APROBAR

DESAPROBAR

La tesis, con el calificativo de *MOY BUENA*, y eleva la presente Acta al Decanato de la Facultad de Ingeniería Agraria, a fin de que se declare EXPEDITA para conferirle el TÍTULO de INGENIERO AMBIENTAL.

Firmado en Lima, 29 de marzo de 2019.


Dr. Honorio Eloy Munive Jáuregui
PRESIDENTE


Ing. Julián Alberto Álvarez Paredes
1° MIEMBRO


Mg. Sc. Wilfredo Mendoza Caballero
2° MIEMBRO


Mg. Sc. Heidi Isabel Sánchez Torres
ASESORA

DEDICATORIA

A Dios por ser una guía y compañía en mi vida, y por haberme brindado una vida llena de experiencias, aprendizajes y de felicidad.

A mis padres, por sus consejos y motivación constante que me permitieron seguir adelante y nunca desistir de alcanzar mis sueños.

“Debemos tener constancia y sobre todo confianza en nosotros mismos. Debemos creer que estamos dotados para algo”

Marie Curie (1867-1934)

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, por haberme brindado la motivación y fortaleza para seguir adelante y alcanzar mis metas, por su compañía y apoyo incondicional en las noches de constante desvelo para la realización de esta tesis. Sin ustedes no estaría donde ahora me encuentro, los amo demasiado.

También agradezco a mis mejores amigas Paola Ludeña Méndez y Evelyn Melgarejo Gómez por haberme brindado una amistad incondicional y los consejos asertivos que me ayudaron a no desistir de mi meta. Gracias a las dos por haber estado en los momentos más difíciles de mi vida.

Agradezco a la Sra. Rosalía, Marcos Mejía y Kenji Takahashi Sánchez por haberme brindado un apoyo desinteresado e incondicional durante el desarrollo de esta tesis, estaré eternamente agradecida con ustedes.

Un agradecimiento especial a mi asesora de tesis, Mg. Heidi Sánchez Torres por haberme aceptado como tesista, así como también por su apoyo incondicional y sus conocimientos brindados para la culminación de la presente tesis. De igual manera, al Blgo. Armando Chiclla Salazar, agradezco por su aporte académico y sus consejos para la ejecución de esta tesis.

Finalmente agradezco a mis profesores, colegas, amigos que contribuyeron en mi formación profesional y académica.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
CARÁTULA.....	i
ACTA DE SUSTENTACIÓN.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE APÉNDICES.....	xiv
RESUMEN.....	xvi
ABSTRACT.....	xvii
INTRODUCCIÓN.....	xviii
CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO.....	1
1.1. ANTECEDENTES.....	1
1.2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
1.2.1. Petróleo crudo.....	7
a. Composición de los hidrocarburos totales del petróleo.....	8
b. Biodegradación de hidrocarburos.....	9
1.2.2. Alternativas de remediación de suelos.....	13
a. Fitorremediación.....	14
1.2.3. Fitorremediación de hidrocarburos de petróleo.....	18
a. Mecanismos de la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo.....	20
b. El papel de las plantas en la degradación y el efecto de la rizosfera.....	21
c. Metabolismo de los compuestos orgánicos por las plantas.....	22
d. Influencia de los factores físico-químicos y ambientales sobre la fitorremediación.....	24
1.2.4. Micorremediación.....	26
1.2.5. Importancia de las plantas seleccionadas.....	26
a. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. “frejol”.....	26
b. <i>Arachis hypogaea</i> L. “maní”.....	32
1.2.6. Hongos micorrízico-arbusculares.....	37
a. Generalidades de los hongos micorrízico-arbusculares.....	37
b. Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo.....	40
c. Clasificación de los diferentes tipos de hongos micorrízicos.....	41

d. Hongo micorrízico-arbuscular (<i>Rhizophagus intraradices</i>).....	44
e. Asociación entre hongo micorrízico arbuscular y planta en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos	47
CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	49
2.1. MATERIALES	49
2.1.1. Material Biológico	49
2.1.2. Materiales para germinación	50
2.1.3. Materiales para el crecimiento de las plantas	50
2.1.4. Materiales de Laboratorio	50
2.1.5. Equipos	51
2.1.6. Otros.....	51
2.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN	52
2.2.1. Área de Estudio	52
2.2.2. Descripción del experimento.....	53
2.2.3. Tratamientos experimentales.....	56
2.2.4. Diseño estadístico del experimento	57
2.2.5. Unidades Experimentales	58
2.2.6. Desarrollo experimental e identificación de variables y su mensuración	59
a. Fase de campo de la toma de muestras de raíces y suelos de los tratamientos	60
b. Fase de laboratorio de análisis de muestras de suelo y raíces de los tratamientos.....	72
c. Medición de nutrientes (NPK) en los tratamientos.....	79
2.2.7. Análisis estadístico de datos.....	80
CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	81
3.1. RESULTADOS.....	81
3.1.1. Determinación del porcentaje de colonización micorrizica sometidas al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1%) en los tratamientos experimentales	81
3.1.2. Determinación del porcentaje (%) de reducción de petróleo crudo al 1% (PC-1%) en los tratamientos experimentales	85
3.1.3. Variación de los valores promedios de pH en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	87
3.1.4. Variación de la concentración del Nitrógeno Total (NT) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días	90
3.1.5. Variación de la concentración del Fósforo Total (P) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	92
3.1.6. Variación de la concentración del Potasio (K) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	94

3.1.7. Evaluación de la altura de las plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Arachis hypogaea</i> en los tratamientos experimentales.....	96
3.1.8. Correlación entre las variables del porcentaje de CM-PC-1 %, porcentaje de reducción de PC-1 %, NT, P, K, pH y altura de las plantas fabáceas en los tratamientos experimentales.....	98
3.2. DISCUSIONES.....	100
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	107
CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
TERMINOLOGÍA.....	123
APÉNDICES.....	125

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. <i>Características fisicoquímicas del petróleo crudo</i>	7
Tabla 2. <i>Modificación de las propiedades del suelo en presencia de hidrocarburos en el suelo</i>	12
Tabla 3. <i>Principales ventajas y desventajas de la fitorremediación</i>	15
Tabla 4. <i>Especies vegetales utilizadas en la degradación de petróleo</i>	18
Tabla 5. <i>Clasificación de la micorriza Rhizophagus intraradices</i>	45
Tabla 6. <i>Tratamientos experimentales y sus respectivas dosis</i>	55
Tabla 7. <i>Condiciones de invernadero para los tratamientos</i>	56
Tabla 8. <i>Variables, unidades de medida y métodos de análisis</i>	58
Tabla 9. <i>Variables independientes</i>	58
Tabla 10. <i>Características fisicoquímicas del suelo experimental</i>	62
Tabla 11. <i>Preparación del material experimental</i>	63
Tabla 12. <i>Cantidad total de los sustratos contaminados con petróleo</i>	63
Tabla 13. <i>Distribución de las dosis de micorrizas en los tratamientos experimentales</i>	65
Tabla 14. <i>Distribución de las dosis de micorrizas en los tratamientos experimentales</i>	65
Tabla 15. <i>Valores promedio del porcentaje CM-PC-1 % en los tratamientos a los 60 días y 90 días de evaluación. Los resultados evidenciados son las medias de cuatro replicas y la desviación estándar (\pm DS)</i>	82
Tabla 16. <i>Valores promedios del porcentaje (%) de la remoción de la concentración de petróleo crudo a los 60 y 90 días de evaluación. Los resultados evidenciados son las medias de cuatro replicas y la desviación estándar (\pm DS)</i>	84
Tabla 17. <i>Análisis de la varianza del porcentaje (%) de reducción PC-1% en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos</i>	85
Tabla 18. <i>Valores promedios de los resultados de pH y su desviación estándar (\pm DS) en los tratamientos a los 60 y 90 días de evaluación</i>	86
Tabla 19. <i>Análisis de la varianza del pH en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos</i>	87

Tabla 20. <i>Variación promedio de la concentración de nitrógeno total (NT) y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....</i>	89
Tabla 21. <i>Análisis de la varianza de las concentraciones de nitrógeno total (NT) en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos.....</i>	89
Tabla 22. <i>Variación promedio de la concentración de fósforo total (P) y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....</i>	91
Tabla 23. <i>Análisis de la varianza de las concentraciones de fósforo total (P) en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos.....</i>	91
Tabla 24. <i>Variación promedio de la concentración de potasio y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....</i>	92
Tabla 25. <i>Análisis de la varianza de las concentraciones de fósforo en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos.....</i>	94
Tabla 26. <i>Registro promedio de la altura de la plantas (<i>A. hypogaea</i> y <i>P. vulgaris</i>) y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....</i>	96
Tabla 27. <i>Análisis de la varianza de la altura de las plantas fabáceas en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos.....</i>	95

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
<i>Figura 1.</i> Estructura química de los compuestos del petróleo crudo.....	9
<i>Figura 2.</i> Destino de los hidrocarburos en el suelo.....	11
<i>Figura 3.</i> Procesos de la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos.....	13
<i>Figura 4.</i> Transformaciones de compuestos orgánicos en diferentes compartimentos celulares de la planta.....	21
<i>Figura 5.</i> Morfología de la <i>Phaseolus vulgaris</i> (frejol).....	27
<i>Figura 6.</i> Etapas de desarrollo de la <i>Phaseolus vulgaris</i> (frejol).....	30
<i>Figura 7.</i> Morfología de la <i>Arachis hypogaea</i> (maní).....	33
<i>Figura 8.</i> Etapas de desarrollo de la <i>Arachis hypogaea</i> (maní).....	36
<i>Figura 9.</i> Ciclo de vida y fases de desarrollo del hongo micorrizico- arbuscular.....	38
<i>Figura 10.</i> Estructura morfológica del hongo micorrizico-arbuscular.....	41
<i>Figura 11.</i> Clasificación general de los hongos micorrizicos-arbusculares.....	42
<i>Figura 12.</i> Estructura de la <i>Rhizophagus intraradices</i> en raíces de zanahoria. A. Vesículas (Ve). B. Esporas (Sp), Grupo de esporas (Sc), Hifas extraradical (Eh), Hifas intraradicales (Ih). C. Arbúsculos (Ar). D. Vesículas (Ve).E. Esporas (Sp) e Hifa extraradical (Eh).....	44
<i>Figura 13.</i> Fotografía a nivel de microscopio de esporas (50 µm) de la <i>Rhizophagus intraradices</i>	44
<i>Figura 14.</i> Participación de las micorrizas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	47
<i>Figura 15.</i> <i>Rhizophagus intraradices</i> en sustrato inerte (arcilla expandida) de la marca MYCOSYM TRI-TON®.....	48
<i>Figura 16.</i> Localización de las instalaciones donde se desarrolló la investigación.....	51
<i>Figura 17.</i> Diagrama de flujo de la fase de campo de la investigación.....	53
<i>Figura 18.</i> Diagrama de flujo de la fase de laboratorio. Porcentaje de remoción de petróleo crudo, análisis de los parámetros de NPK y de colonización micorrízica.....	54

<i>Figura 19.</i> Tratamientos experimentales en el invernadero. Las macetas conteniendo los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, y sus respectivas repeticiones se ubicaron aleatoriamente	56
<i>Figura 20.</i> A: Se observa 48 unidades experimentales a condiciones de invernadero.....	57
<i>Figura 21.</i> Diseño del invernadero para las unidades experimentales	59
<i>Figura 22.</i> A: Lavado y desinfección de semillas de <i>Arachis hypogaea</i> “maní“. B: Lavado y desinfección de semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> “frejol”.....	60
<i>Figura 23.</i> A: Bandejas de germinación con semillas de <i>Arachis hypogaea</i> “maní“. B: Bandejas de germinación con semillas de <i>Phaseolus vulgaris</i> “frejol”.	61
<i>Figura 24.</i> Esterilización del suelo mediante la técnica de calor seco A: Trasplante de las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> . B. Trasplante de plantas de <i>Arachis hypogaea</i>	61
<i>Figura 25.</i> A. Inoculación de 1 ml de petróleo crudo. B. Adición de 1 kg del suelo experimental. C. Suelo experimental	64
<i>Figura 26.</i> Inoculación de la <i>Rhizophagus intraradices</i> en las macetas experimentales.....	65
<i>Figura 27.</i> A: Trasplante de las plantas de <i>Phaseolus vulgaris</i> . B. Trasplante de plantas de <i>Arachis hypogaea</i>	67
<i>Figura 28.</i> Medida de pH en el suelo de cada tratamiento	67
<i>Figura 29.</i> Medición de la humedad en el suelo	67
<i>Figura 30.</i> Medida de intensidad lumínica.....	68
<i>Figura 31.</i> A. Medición de la altura de la planta de <i>A. hypogaea</i> . B. Medición de la altura de la planta de <i>P. vulgaris</i>	69
<i>Figura 32.</i> A. Recolección de las muestras de suelo de cada tratamiento. B. Almacenamiento de las muestras de suelo	70
<i>Figura 33.</i> A. Recolección de las raíces de las plantas <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Arachis hypogaea</i> . B. Muestras de las raíces de cada tratamiento.....	70
<i>Figura 34.</i> A: Pesaje de las muestras de cada tratamiento. B: Cartuchos de cada muestra. C: Equipo Soxhlet.....	72
<i>Figura 35.</i> A: Lavado de las raíces de las plantas fabáceas estudiadas. B: Selección de las raíces menores a 1 mm.....	73
<i>Figura 36.</i> A. Aclaramiento de las raíces con KOH al 10%. B. Acidificación de las raíces al 10%. C. Tinción de las raíces con Azul de Tripano al 0.05%.....	74

<i>Figura 37.</i> A. Raíces teñidas en placas Petri cuadrículas. B. Cuantificación de la presencia de simbiosis mediante el estereoscopio Labor Tech NHSMCO – LTD ZTX – 20W.....	75
<i>Figura 38.</i> A. Raíces teñidas en caja Petri distribuidas aleatoriamente para marcar la micorrización por el método de intersección de líneas.....	76
<i>Figura 39.</i> A. Conteo de la colonización mediante el Microscopio PRIMO STAR ZEISS. B. Réplicas de segmentos de raíces observadas.....	76
<i>Figura 40.</i> Fotómetro pHotoFlex WTW. Se muestran los resultados de parámetros de la muestra de suelo de cada tratamiento. A. Resultado de NT (Nitrógeno Total), B. Resultado de P (Fósforo Total), C. Resultado de K (Potasio).....	77
<i>Figura 41.</i> Fotografía al microscopio de la CM-PC-1% de <i>Rhizophagus intraradices</i> en tejidos de raíz de la <i>Arachis hypogaea</i> (10X) A. Vesículas (Ve) [10x]. B. Esporas (Es) [100X]. C. Hifas intracelulares (Hi) [10X] D. Microesclereocios endófitos septados (Me) [40X].....	80
<i>Figura 42.</i> Fotografía de la CM-PC-1% de la <i>Rhizophagus intraradices</i> en tejidos de la raíz de la <i>Phaseolus vulgaris</i> (10X) A. Vesículas [10X]. B. Esporas (Es) [100X]. C. Hifas intracelulares (Hi) [10X]. D. Microesclereocios de endófitos septados (Me) [40X].....	80
<i>Figura 43.</i> Resultados de los valores promedio del porcentaje de la CM-PC-1% de la <i>Rhizophagus intraradices</i> y las plantas de <i>Arachis hypogaea</i> y <i>Phaseolus vulgaris</i> evaluados a los 60 y 90 días.....	82
<i>Figura 44.</i> Resultados de los valores promedio del porcentaje de reducción de PC-1% en los tratamientos experimentales evaluados en los dos periodos de 60 y 90 días.....	83
<i>Figura 45.</i> Resultados de los valores de pH en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	86
<i>Figura 46.</i> Resultados de los valores de nitrógeno total (mg.L ⁻¹) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	88
<i>Figura 47.</i> Resultados de los valores promedio de fósforo total (mg.L ⁻¹) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	91
<i>Figura 48.</i> Resultados de los valores promedio de potasio (K) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....	93

Figura 49. Resultados de los valores promedio de la altura de las plantas fabáceas en los
tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.....95

ÍNDICE DE APÉNDICES

	Pág.
Apéndice 1. Caracterización inicial del suelo experimental	126
Apéndice 2. Ficha técnica de la muestra de petróleo crudo	127
Apéndice 3. Ficha técnica de la MYCOSYM TRI-TOM®	128
Apéndice 4. Protocolo de ensayo de análisis de nitrógeno total (N)	129
Apéndice 5. Protocolo de ensayo de análisis de fósforo total (P)	130
Apéndice 6. Protocolo de ensayo de análisis de potasio (K)	131
Apéndice 7. Valores de porcentaje CM-PC-1% en los diferentes tratamientos y replicas	132
Apéndice 8. Porcentaje de petróleo crudo extraído en el suelo por el método Soxhlet a los 60 y 90 días en los diferentes tratamientos	133
Apéndice 9. Valores de porcentaje de reducción de PC-1% en los diferentes tratamientos y replicas	134
Apéndice 10. Valores de pH en los diferentes y replicas	135
Apéndice 11. Valores de nitrógeno total (N) en los diferentes tratamientos y replicas	136
Apéndice 12. Valores de fósforo total (P) en los diferentes tratamientos y replicas	137
Apéndice 13. Valores de potasio (K) en los diferentes tratamientos y replicas	138
Apéndice 14. Valores de tamaño de altura de la planta en los diferentes tratamientos y replicas	139
Apéndice 15. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza del porcentaje de reducción de PC-1%	140
Apéndice 16. Prueba de Tukey y homogeneidad de la varianza y estadístico Levene de pH	141
Apéndice 17. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de la concentración de nitrógeno total	141
Apéndice 18. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de la concentración de fósforo total	142
Apéndice 19. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de la concentración de potasio total	143

Apéndice 20. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de los valores de la altura de las plantas fabáceas (<i>P. vulgaris</i> y <i>A. hypogaea</i>)	144
Apéndice 21. Coeficientes de correlación lineal de Pearson (R) entre los valores de porcentaje de reducción de PC-1%, porcentaje de CM-PC-1%, altura de las plantas, nitrógeno total (NT), fósforo total (P), potasio total (K) y pH. significancia de $p < 0.01$	145
Apéndice 22. Registro fotográfico	146

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue evaluar la asociación simbiótica entre el hongo micorrízico *Rhizophagus intraradices* y dos especies de Fabaceae nativas, el “frejol” (*Phaseolus vulgaris* L.) y “maní” (*Arachis hypogaea* L.) para el tratamiento de suelos contaminados con PC-1 % (petróleo crudo al 1%). El experimento utilizado fue un diseño completamente al azar (DCA) con seis tratamientos y distribuidos en 48 unidades experimentales, sometidos a condiciones de invernadero (25 – 28 °C, 1200 lux, 65-70% humedad de ambiente y un fotoperiodo de 11 horas con luz y 13 horas en oscuridad) durante dos periodos de evaluación de 60 y 90 días. Los resultados indicaron que los tratamientos T3 y T6 con 5,0 g.kg⁻¹ de inóculo de *R. intraradices* redujeron una mayor concentración de PC-1 % a los 90 días del estudio. Se evidenció un incremento de la CM-PC-1% (colonización micorrizica arbuscular sometida al 1 % de petróleo crudo) conforme las plantas de maní y frejol alcanzaban su edad fenológica de madurez (90 días). Las variables de reducción de PC-1 % y CM-PC-1 % presentaron una correlación lineal ($r^2 = 0.769$; $p = 0.000$), evidenciándose mayor reducción del PC-1 % a medida que incrementaba el porcentaje de CM-PC-1 %.

Palabras clave: Asociación simbiótica, colonización micorrizica, hongo micorrízico-arbuscular, fabáceas.

ABSTRACT

The objective of the present investigation was to evaluate the symbiotic association between the mycorrhizal fungus *Rhizophagus intraradices* and two species of native Fabaceae, the *Phaseolus vulgaris* L. "bean" and *Arachis hypogaea* L. "peanut" for the treatment of contaminated soils with PC-1% (crude oil at 1%). The experiment used was a completely randomized design (CRD) with six treatments and distributed in 48 experimental units, subjected to greenhouse conditions (25 - 28 ° C, 1200 lux, 65-70% humidity and a photoperiod of 11 hours with light and 13 hours in darkness) during two periods of evaluation of 60 and 90 days. The results indicated that treatments T3 and T6 with 5.0 g.kg⁻¹ of inoculum of *R. intraradices* reduced a greater concentration of PC-1% at 90 days of the study. An increase of the CM-PC-1% (arbuscular mycorrhizal colonization subjected to 1% of crude oil) was evidenced as the peanut and bean plants reached their phenological age of maturity (90 days). The reduction variables of PC-1% and CM-PC-1% presented a linear correlation ($r^2 = 0.769$, $p = 0.000$), evidencing a greater reduction of PC-1% as the percentage of CM-PC-1 increased %.

Key words: Symbiotic association, mycorrhizal colonization, mycorrhizal-arbuscular fungus, legumes.

INTRODUCCIÓN

En los últimos años la contaminación de suelos con hidrocarburos derivados del petróleo se ha intensificado, como consecuencia de los constantes derrames que se producen a causa de las rupturas de tuberías subterráneas, accidentes en carreteras que involucran el transporte de combustible, así como derrames en procesos industriales, ocasionando daños en los ecosistemas; alterando las propiedades físicas y químicas del suelo, el agua y subsecuentemente de los organismos bióticos. Como consecuencia de ello, se han promovido el desarrollo de diversas investigaciones para recuperar la funcionalidad de los suelos, como es el caso de la biorremediación; la cual ha recibido especial interés debido a que hace uso de plantas (fitorremediación) y microorganismos referidos a los hongos (micorremediación), con capacidad para almacenar, tolerar y degradar hidrocarburos derivados del petróleo.

En la fitorremediación, las especies de plantas más reconocidas por su capacidad indicadora de toxicidad de hidrocarburos de petróleo se encuentra a la familia Fabaceae, las cuales cuentan con ciertas características metabólicas y fisiológicas particulares que les provee de una alta capacidad de tolerancia y degradación de estos contaminantes (Vázquez-Luna, Castelán-Estrada, Rivera-Cruz, Ortiz-Ceballos & Izquierdo, 2010), siendo las más representativas las especies: *Phaseolus coccineus* L., *P. vulgaris* L. y *Medicago sativa* L. (Ferrera-Cerrato et al., 2007; Kaimi et al., 2007; Nwoko et al., 2007; Vázquez et al., 2010 citado por Villegas-Velázquez, 2011, p. 13).

Por otra parte, los hongos micorrízico-arbusculares (HMA), han sido usados en la micorremediación. Estos organismos viven en simbiosis con ciertas especies de plantas; como biotrófos, tienen capacidad de atenuar los efectos tóxicos de los hidrocarburos del petróleo en la planta hospedera, almacenando ciertas cantidades de hidrocarburos en su estructura y favoreciendo su resistencia, crecimiento y supervivencia (Alarcón, Davies, Autenrieth y Zuberer, 2008). Entre las especies con mayor potencial para la reducción de hidrocarburos del petróleo se destaca el género *Glomus*, con las especies: *Glomus versiforme* G. *intraradices*, *G. aggregatum* y *G. mosseae* (Cabello, 1997; Liu & Dalpé, 2009).

Los métodos de fitorremediación han sido ampliamente estudiadas ya que en comparación a las técnicas físicas y/o químicas, ofrecen la misma eficacia a un menor costo (Jones, Sun,

Tang y Robert, 2004). Para potenciar la capacidad biorremediadora de las plantas, recientemente se está utilizando la simbiosis de las plantas con los hongos micorrízico-arbusculares, ya que los hongos presentan mayor eficacia para descontaminar suelos con altas concentraciones de contaminantes, lo que confiere ventajas positivas a las especies vegetales en el establecimiento asociativo sobre suelos contaminados (Villegas-Velázquez, 2011).

La recuperabilidad de los suelos es fundamental para garantizar el crecimiento de las plantas y el desarrollo de los animales que se alimentan de esta; así como la importancia de las funciones y servicios que nos brinda, los cuales tienen repercusión económica y medioambiental, entre los que podemos resaltar el reciclaje de nutrientes, la producción de biomasa (combustible fibra, alimentos), depuración del agua, descomposición de la materia orgánica, eliminación de contaminantes y la regulación de la calidad del aire (Becerril et al., 2007). Es por ello, que el presente estudio busca aprovechar el efecto de la asociación simbiótica de la *Rhizophagus intraradices* y las Fabaceae nativas *Phaseolus vulgaris* L. “frijol” y *Arachis hypogaea* L. “maní” para el tratamiento de suelos contaminados con petróleo crudo.

Objetivo general:

- Evaluar el efecto de la asociación simbiótica de la *Rhizophagus intraradices* y las Fabaceae nativas *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* en el tratamiento de suelos contaminados con petróleo crudo.

Objetivos específicos

- Determinar el porcentaje de la colonización micorrízica de la *Rhizophagus intraradices* y Fabaceae nativas en periodos de 60 y 90 días de tratamiento, en suelos contaminados con petróleo.
- Conocer el porcentaje de reducción de petróleo crudo en las muestras de suelo después de ser tratadas con las Fabaceae nativas en asociación con *Rhizophagus intraradices*, en los periodos de 60 y 90 días.

CAPÍTULO I: MARCO TEÓRICO

1.1. ANTECEDENTES

Joner et al. (2001) evaluaron el efecto de los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) y las plantas de “trébol blanco” (*Trifloium repens* L.) y “raigrás” (*Lolium perenne* L.) en la disipación y degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) aplicados en suelos agrícolas enriquecidos con tensoactivos, así como la influencia de la rizosfera sobre la estructura de la comunidad microbiana y la toxicidad de los HAPs; los mejores resultados se presentaron en el segundo periodo, registrándose en los tratamientos con micorrizas (T3) una tasa del 66 y 42 % de reducción del Criseno y dibenzo (a) Antraceno respectivamente, a comparación del 56 y 20% de los controles no micorrizadas (T2). La colonización micorrízica arbuscular se disminuyó de un 40 a 20% en plantas de “trébol”, mientras que la colonización en “raigrás” no se vio afectado por los HAPs. Los tratamientos con tensoactivos (T4) no afectaron la colonización de micorrizas en ambas plantas y obtuvieron reducciones del 51% y 49% tanto en el primer y segundo periodo respectivamente. El estudio concluye que los tratamientos con plantas micorrizadas, tienen un efecto positivo en la disipación y degradación de los HAPs, determinando mejores resultados en comparación con los demás tratamientos.

La investigación realizada por Joner y Leyval (2001), evaluaron la influencia de los hongos micorrízico-arbusculares (HMA) *Glomus mosseae* sobre el crecimiento y captación de fósforo (P) en plantas de “trébol” y “raigrás híbrido” ante suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), la presencia de un tensoactivo como suministro de P y la toxicidad de HAPs en el desarrollo de las micorrizas. Los resultados mostraron que la capacidad degradativa del “trébol”, el “raigrás” y el crecimiento de la raíz incrementaron por la influencia de los HMA, pero disminuyen por la presencia del HAPs y el agente tensoactivo. La mayor colonización micorrízica arbuscular se registró

en el “trébol” entre 20-40 %, mientras que el “raigrás” presentó menor colonización con un valor de 0,5-5 por ciento, la colonización de ambas plantas fue similar en suelo enriquecido con y sin agente tensoactivo. Sin embargo, el HAPs redujo la colonización de “trébol” a la mitad a diferencia del suelo sin enriquecer. La absorción de P fue constante para el “trébol” en los tratamientos con micorrizas expuestos a HAPs, mientras que, se redujo en las plantas de “trébol” no micorrizada y en los tratamientos con micorrizas más surfactante, estos efectos no se observaron en el “raigrás”. Se concluyó que la *Glomus mosseae* mejora el desarrollo de las plantas de trébol a comparación de las plantas de “raygrás”. No obstante, la colonización micorrízica arbuscular en ambas es inhibida por la presencia de HAPs.

En lo reportado por Joner y Leyval (2003), evaluaron el efecto de la rizosfera de las plantas del “trébol blanco” (*Trifloium repens*) y “raigrás” (*Lolium perenne*) para la disipación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), extraídos de dos zonas contaminadas (fábrica de carbón y coque). Asimismo, determinaron el efecto de la asociación simbiótica entre plantas y hongos micorrízicos-arbusculares (HMA) sobre la degradación de los HAPs en dos periodos. Los resultados demostraron una mayor colonización en ambos tipos de suelo para las raíces de “trébol” en comparación con las plantas de “raigrás”. A las 13 semanas, se evidenciaron que los tratamientos con micorrizas redujeron con mayor eficacia los HAPs en el suelo uno con una concentración final de 298 mg.kg⁻¹, mientras que en el suelo dos no se evidenciaron diferencias significativas en la reducción del HAPs. Luego de 26 semanas, la mayor reducción se registró en el tratamiento con plantas con un valor de 222 mg.kg⁻¹, siendo los mejores resultados alcanzados para el suelo uno, mientras el suelo dos obtuvo un mejor resultado para el tratamiento con micorrizas registrando una reducción superior de 1 042 mg.kg⁻¹ a comparación de los tratamientos sin micorrizas. Se concluye, que las micorrizas mejoran el crecimiento de las plantas y favorece la disipación de los HAPs, así como también estimula la rizosfera de las plantas positivamente para la fitorremediación de contaminantes.

En la investigación por Liu et al. (2004), evaluaron la influencia de los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), en la colonización micorrízica de raíces de plantas de “alfalfa” y el rol que cumplen los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en la degradación de tres concentraciones de benzo (a) pireno (1, 10 y 100 mg.kg⁻¹) en dos tratamientos (con y sin micorriza), y dos tratamientos con y sin “alfalfa” incluyendo un control, siendo evaluados en cinco periodos (30, 40, 50, 60 y 90 días). Los resultados demostraron que la colonización no se vio afectada en bajas concentraciones de benzo (a) pireno (hasta 10 g.kg⁻¹). Mientras que, a concentraciones elevadas (100 g.kg⁻¹) se inhibió la propagación de esporas. A los 90 días, se registraron los mejores resultados, siendo: la mejor tasa de reducción correspondiente a la concentración de 10 g.kg⁻¹ benzo (a) pireno para el tratamiento de plantas con micorrizas, obteniendo una tasa del 87%. Mientras que, en los suelos con solo HMA fue del 53%. De manera similar el mejor resultado de degradación se presentó en la concentración de 10 g.kg⁻¹ de benzo (a) pireno con un valor de 78%, mientras que para las macetas no plantadas el mayor valor de degradación fue de 55% para la concentración de 1 g.kg⁻¹ benzo (a) pireno. Los autores concluyeron, que elevadas concentraciones de HAPs reducen las tasas de degradación de los HMA y las plantas.

En la investigación de Verdín et al. (2006), estudiaron a nivel in vitro el desarrollo de la *Glomus intraradices* y la colonización micorrízica arbuscular en raíces de “achicoria” (*Cichorium intybus* L.) sobre medios contaminados con antraceno, con el fin de evaluar el efecto directo del contaminante sobre la esporulación fúngica de la micorriza, la longitud de las hifas y la germinación de las esporas, así como la disipación del antraceno en las raíces de plantas libres de otros microorganismos. Ellos evidenciaron que la colonización de la raíz por *G. intraradices* se redujo significativamente en presencia de antraceno a 30 y 140 mg.L⁻¹, y la presencia de estructuras micorrízicas (arbúsculos, vesículas e hifas intrarradicales) fue menor en raíces cultivadas sobre medios contaminados a comparación de medios libres de antraceno. No se observaron diferencias sobre la frecuencia de colonización o en las vesículas de las raíces de “achicoria” cultivadas a 30 y 140 mg.L⁻¹ de antraceno. Por otra parte, se inhibió la germinación de esporas al estrés del antraceno a una concentración de 140 mg.L⁻¹ después de 30 días con un registro del 75% en comparación con el control. La concentración reducida de antraceno fue significativamente mayor en raíces

micorrizadas a diferencia de las no micorrizadas con 133 ± 15 y $612,5 \pm 47,5$ $\mu\text{g/placa}$ Petri. Mientras que, en raíces no micorrizadas se registró valores de $55,75 \pm 10$ y $272 \pm 37,5$ $\mu\text{g/placa}$ Petri, siendo resultados muy bajos. Los autores concluyeron que la *G. intraradices* promueve la tolerancia de las raíces al estrés del contaminante. Asimismo, detectaron una acumulación intracelular de antraceno en los cuerpos lipídicos de células tanto de plantas como de hifas fúngicas.

El estudio realizado por Alarcón et al. (2008), quienes evaluaron la capacidad fitorremediadora de la *Lolium multiflorum* Lam. inoculada con *Glomus intraradices* (HMA), así como la interacción entre microorganismos degradadores de petróleo, tales como, la bacteria *Sphingomonas paucimobilis* (Sp) y el hongo filamentoso *Cunninghamella echinulata* Thaxt (Ce). Los resultados demostraron que los tratamientos con micorrizas, SpCe o micorrizas + SpCe, muestran un incremento del área foliar y la masa de hojas secas a diferencia del tratamiento control con $30 \mu\text{g P. ml}^{-1}$. Por otro lado, las poblaciones bacterianas aumentaron en suelos libre de nitrógeno, mientras que los hongos filamentosos se multiplicaron en presencia de HMA y los microorganismos degradadores. La mayor tasa de reducción, se obtuvo en el tratamiento de HMA + SpCe con un valor del 59%, seguido por el tratamiento control – $44 \mu\text{g P. ml}^{-1}$ que registró un 49 % de degradación, mientras que el tratamiento con microorganismos degradadores del petróleo alcanzó un resultado de 46% de reducción y el HMA registro un valor de 45 %, y finalmente los tratamientos control (sin microorganismos) registraron la menor tasa de degradación, obteniendo un valor del 36 %. Respecto a la colonización micorrízica y formación de arbusculos en plantas con HMA en suelos contaminados, se registraron valores de 25% y 8% respectivamente. Se concluye que la fitorremediación con hidrocarburos totales de petróleo mejoró gracias a la intervención de los hongos micorrízicos arbusculares y los microorganismos degradadores del petróleo.

En el estudio de Zhou et al. (2013), evaluaron la capacidad de cuatro especies (*Medicago sativa* L. “alfalfa”, *Apium graveolen* L. “apio”, *Lolium multiflorum* “raigrás” y *Festuca arundinacea* Schreb “festuca alta”) inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular (HMA) en la disipación de fenantreno (PHE), pireno (PYR) y dibenzo (a)

antraceno (DBA), así como el crecimiento de las plantas, colonización micorrizica, y la tasa de biodegradación de HAPs en un periodo de seis semanas. Los resultados demostraron que el porcentaje de reducción se ve afectado a medida que el peso molecular del HAPs aumenta, alcanzando una tasa de degradación en el siguiente orden 89 % de PHE, 55 % de PYR y DBA de 15 %. Las cuatro especies de plantas demostraron un efecto positivo en la disipación de PHE, siendo la “alfalfa” la que presentó una mayor disipación de FHE en el tratamiento con micorriza en comparación con los demás tratamientos. Cabe señalar que, los HAP adsorbidos por las raíces de las plantas fueron inferiores a 0,5 % de la disipación total de HAP en todos los tratamientos, mientras que la concentración de HAP en el tejido de las cuatro especies fue demasiado bajas para ser detectadas. Además, la colonización de HMA promovió la disipación de PHE en todos los tratamientos, siendo la “alfalfa” en asociación con el HMA la mejor disipadora de los HAPs, seguida por la “festuca alta”, el “raygrás” y finalmente el “apio”.

Nwoko, Okeke y Ogbonna (2013), evaluaron la influencia de la clase de textura del suelo y los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el rendimiento de la *Phaseolus vulgaris* L., en suelos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo (HTP). Se observaron que, las unidades experimentales con inóculos de HMA presentaron mayor rendimiento de materia seca y contenido de clorofila, en comparación con las macetas no inoculadas con HMA. En cuanto a la descomposición y remoción total de hidrocarburos totales del petróleo, se reportó que fue mayor en el suelo con 52 % de arcilla y con una concentración de 2.57 mg.g⁻¹ HTP, siendo significativamente diferente en suelos con el 30 % y 8 % de arcilla, obteniendo una remoción de 3.26 mg.g⁻¹ y 4.26 mg.g⁻¹ de HTP respectivamente. En lo que se refiere a la colonización de micorrizas con la *G. moseae* en raíces de *P. vulgaris*, afectó significativamente la descomposición del petróleo crudo ($R^2 = 0.77$), evidenciando disminución de la concentración del TPH en comparación con los tratamientos sin micorrizas. Se concluyó que, a mayor grado de infección y severidad de las micorrizas se mejoró la degradación y eliminación del petróleo crudo.

En estudios recientes de Nwoko (2014), se evaluó el efecto de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) en el rendimiento de *Phaseolus vulgaris* L. en suelos contaminados

con petróleo crudo (2 %, 4 % y 8 % de petróleo crudo y se inocularon con 12 g de inóculo de micorrizas (16 g de esporas de *Glomus mosseae*); mientras que, las macetas no inoculadas se consideraron como control. Se sembraron cuatro semillas de frejol africano por cada maceta. Los resultados evidenciaron que la mayor tasa de descomposición y remoción total de hidrocarburos de petróleo fue mayor en macetas inoculadas con la *G. mossea* y en los tratamientos con menor concentración del petróleo (2%) alcanzando una remoción del 23 % de petróleo, en comparación con las macetas no inoculadas. En tanto, se presentó una relación fuerte negativa entre la colonización de la raíz micorrizadas de *P. vulgaris* y la concentración residual del hidrocarburos del petróleo ($R^2 = 0.77$, $P = 0.002$). Concluyeron que, a mayor grado de infección y severidad de la *G. mosseae* en la raíz de la *P. vulgaris* mejora la degradación y eliminación del petróleo.

Rajtor y Piotrowska (2016), mencionan que los hongos micorrízico-arbusculares tienen el papel fundamental de incrementar el potencial de la fitorremediación, estableciendo el mejor desarrollo de la planta y de las raíces, así como el incremento de la actividad de los microorganismos de la rizosfera, y la mayor bioacumulación de los hidrocarburos en la zona radicular. Se concluye, que el sistema de fitorremediación basado en la interacción entre las raíces de las plantas, hongos micorrízicos y microorganismos nativos tienen la capacidad de disipar compuestos orgánicos del suelo.

Arias-Trinidad, Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2017), evaluaron la toxicidad de un suelo contaminado con petróleo sobre la Fabaceae *Phaseolus vulgaris*. El experimento se realizó bajo condiciones de túnel de plástico y se evaluó los efectos tóxicos del petróleo en la planta durante 100 días. Se empleó un diseño experimental de bloques al azar en condiciones semicontroladas, con seis tratamientos con tres repeticiones por tratamiento, al considerar 1500, 3000, 4500, 6000, 75000 y 9000 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo y un tratamiento testigo (0 mg/kg). Los resultados evidenciaron que a los 68 días de ensayo se observó marchitez de las plantas a concentraciones de 3000 mg/kg HTP. Se concluye, que a concentraciones altas de petróleo crudo el frejol es sensible.

1.2. REVISIÓN DE LITERATURA

1.2.1. Petróleo crudo

El petróleo crudo es una mezcla de líquido oleoso y viscoso, compuesto por varios tipos de cadenas de hidrocarburos, principalmente de moléculas que contienen carbono e hidrógeno de cadenas de átomos largas o cortas con diferentes estructuras (Braibant-Wayens, 2004).

Generalmente se compone por átomos de carbono (80-87%), seguido por átomos de hidrógeno (10-15%). Del mismo modo, se compone por mínimas cantidades de azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y oxígeno (0-5%), en estado elemental o bien como conjuntos funcionales o componentes heterocíclicos (Botello, Rendón-Von, Gold-Bouchot y Hernandez, 2005). En la Tabla 1 se presentan las características fisicoquímicas generales del petróleo crudo:

Tabla 1

Características fisicoquímicas del petróleo crudo

Características	Descripción
Densidad relativa, kg/m ³ a 15/15 °C.	800 a 980
Punto de ebullición inicial °C	30 a 125
Viscosidad cinemática, centistokes	3 a 100 (hasta 20000)
Punto de inflamación (Abel) °C	-18 a 190
Azufre, % en peso	0,08 a 5
Ceras, % en peso	Hasta 15
Asfáltenos, % en peso	Hasta 5
Vanadio, ppm V	5 a 170

Fuente: (Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente [MAGRAMA], 2016).

a. Composición de los hidrocarburos totales del petróleo

Según Howe (1996), la composición de los hidrocarburos de petróleo conforme sus respectivas familias es la siguiente (ver Figura 1):

- Parafinas volátiles: Se caracteriza por ser la parte más volátil del petróleo y por ser la más vulnerable a las pérdidas abióticas por volatilización. En este grupo se identifican a los isoprenoides y los n-alcano (alcanos ramificados) de cadenas cortas de C_1 a C_{10} , constituyen hasta un 30% del petróleo crudo.
- Parafinas no volátiles: Se encuentran la n-alcanos y e isoprenoides de cadenas entre C_{11} y C_{40} . Los n-alcanos constituyen el 15 y 20 % de crudos no degradados; mientras que, los isoprenoides varían de C_{12} a C_{22} y constituyen entre 1-2 % del crudo, alcanzando un 15 % en crudos procesados.
- Naftenos: Constituyen el 30 % del petróleo crudo, siendo los ciclopentanos alquilados los más cuantiosos de esta familia. De este porcentaje, los compuestos mono y dicíclico constituyen el 50 y 55 %, mientras que, los tricíclicos y los tetracíclicos el 20 % y 25 % respectivamente, abarcando a los hopanos.
- Olefinas: Son el producto resultante del proceso de cracking como parte del refinado del petróleo crudo, hallándose en mínimas trazas y se encuentran presentes en la gasolina (30%) y fueles (1%).
- Compuestos aromáticos: Es una mezcla compleja derivado de los hidrocarburos cíclicos poliinsaturados, que representan una gran proporción del crudo. Estos compuestos se estructuran de dos (naftalenos) o tres anillos bencénicos (antraceno y fenantreno), y se unen con cadenas carbonadas lineales (Wauquier, 2004).
- Resinas y asfáltenos: Son mezclas complejas (integradas por núcleos policíclicos o naftenos aromáticos) que representan el 10 % de los crudos

poco degradados o ligeros y el 60 % del crudo degradado. Las cuales, se conforman por cadenas hidrocarbonadas con heteroátomos de oxígeno, nitrógeno y azufre y en ocasiones se le asocia bajas concentraciones de metales como el vanadio y el níquel.

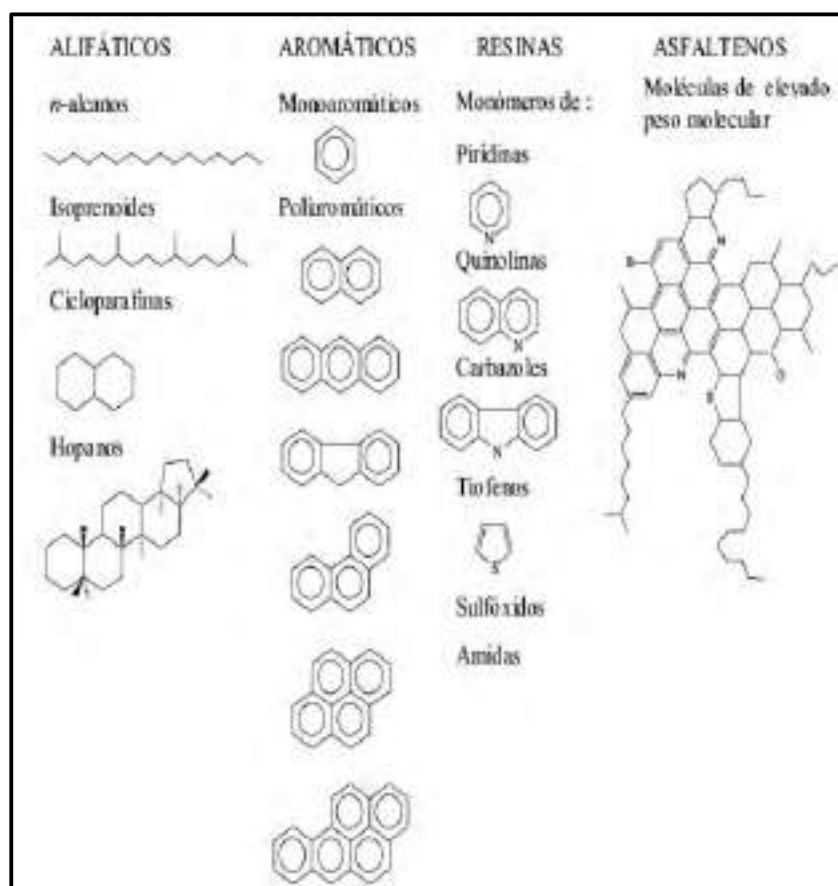


Figura 1. Estructura química de los compuestos del petróleo crudo.

Fuente: (Howe, 1996).

b. Biodegradación de hidrocarburos

Las características de los hidrocarburos en función de su: longitud de cadena, presencia de anillos, ramificaciones, estado físico y toxicidad definen la capacidad de biodegradabilidad (altamente y difícilmente biodegradables), siendo más sencillos de biodegradar aquellos que tienen una estructura molecular simple (Petro & Mercado, 2014). Los hidrocarburos más sencillos de degradar son aquellos que presentan fracciones de *n*-alcanos de bajo y medio peso molecular y los hidrocarburos aromáticos de un anillo; mientras que los de

alto peso molecular son degradados con mayor dificultad, siendo estos los n-alcenos, aromáticos, asfáltenos y resinas (Eweis et al., 1998, citados por Pons, 2010, p. 12).

Existen casos particulares como los alcanos lineales, que a pesar de ser fácilmente biodegradables, en altas concentraciones (especialmente con cadenas de carbono entre C₅ y C₁₀) dificultan la degradación de otros hidrocarburos, debido a que actúan como solventes, desnaturalizando la membrana lipídica de los microorganismos. Mientras que los alcanos con una alta cantidad de carbono en su estructura entre C₂₀ y C₄₀, se degradan con mayor dificultad (Petro y Mercado, 2014).

En el caso de los cicloalcanos, poseen una tasa de degradación inferior de sus isómeros lineales, pero mayor que los hidrocarburos aromáticos. Esto se debe a la cantidad de anillos en su estructura y la presencia de los grupos alquil, metil y etilo como reemplazos (Petro y Mercado, 2014).

c. Petróleo en el ambiente

En las últimas décadas, la contaminación por hidrocarburos del petróleo sobre los diferentes ecosistemas ha incrementado drásticamente, como consecuencia del aumento en la actividad de exploración y producción de la industria del petróleo. En la actualidad, los suelos contaminados por derivados de petróleo conforman el 70 % del total de los ecosistemas impactados (Swannell, Lee y McDonagh, 1996).

Las principales fuentes de polución por petróleo sobre los suelos, provienen de la rotura de oleoductos, descarga de instalaciones de procesamiento y petroquímicas, fosas de pozos petroleros y su inadecuado mantenimiento. Por otro lado, la degradación de la materia y su posterior acumulación en los sedimentos marinos,

en el suelo, son la fuente que producirá petróleo (Trujillo et al., 1995, citados por Hernández-Acosta, Rubiños-Panta y Alvarado-López, 2004, p. 7).

De acuerdo a la investigación realizada por McGill, Rowell y Westlake (1981), los hidrocarburos adheridos a los suelos pasan por una serie de etapas: la volatilización y la fotooxidación. Posteriormente, pasan por una fase de descomposición biológica, por medio de la interacción entre los microorganismos, el oxígeno, la textura, los nutrientes y el pH, obteniendo productos intermedios, células microbianas que participaron en la descomposición y CO₂ el cual se libera a la atmósfera. Finalmente, los productos derivados de los procesos indicados, pueden: mezclarse con el humus del suelo, o simplemente lixiviarse. En este sentido, según McGill et al. (1981), describieron los componentes del petróleo adheridos al suelo, tal como se observa en la Figura 2.

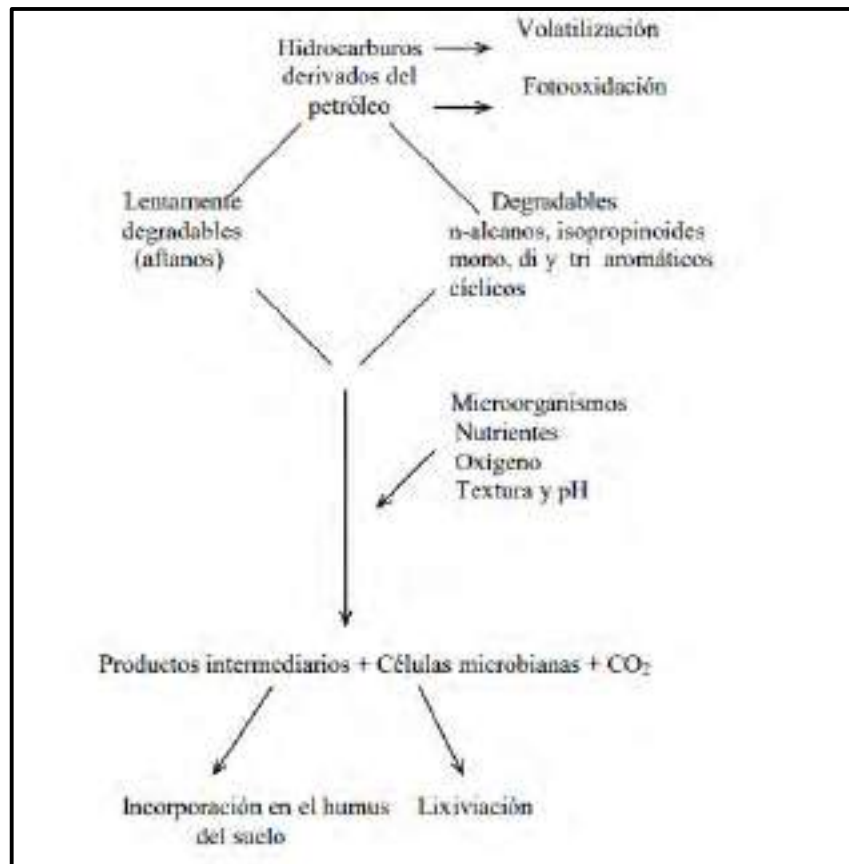


Figura 2. Destino de los hidrocarburos en el suelo.

Fuente: (McGill, 1981).

Dada su relevancia ambiental, la Agencia de Protección Ambiental (USEPA), la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la comunidad Europea (CE) catalogaron determinados compuestos de hidrocarburos tales como, naftalenos, acenaftileno, fluoreno, fenantreno, antraceno y pireno, como contaminantes prioritarios debido a sus efectos dañinos a la salud humana (Menzie et al., 1992, citados por Ortínez, Ize y Gavilán, 2003, p. 88). Debido a su estabilidad química, su baja solubilidad en el agua y su alta adherencia a las partículas del suelo, los hidrocarburos aromáticos policíclicos se acumulan fácilmente en el ambiente (Pothuluri & Cerniglia, 1998, citados por Pulgarin, 2012, p. 19).

En la Tabla 2 se presenta los efectos principales de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo por la presencia de los hidrocarburos del petróleo (Ortinez et al., 2003).

Tabla 2

Modificación de las propiedades del suelo en presencia de hidrocarburos en el suelo

Propiedades físicas	Propiedades químicas	Propiedades biológicas
- Estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados.	- Aumento en el carbón orgánico.	- Se modifica la biomasa microbiana
- Disminución de la aireación.	- Aumento en las concentraciones de fósforo, fierro,	disminuyendo la diversidad pero
- Retención del agua en la capa superficial.	manganeso, sodio, sulfatos.	aumentando la concentración de bacterias tolerantes o
- El potencial hídrico	- Disminución del pH.	biodegradadoras de hidrocarburos.

Fuente: Ortinez et al., 2003.

1.2.2. Alternativas de remediación de suelos

En los últimos años, se ha logrado desarrollar nuevas tecnologías para la remediación de suelos degradados. Sin embargo, aún se está trabajando en la optimización de ciertos aspectos para mejorar la eficacia de las técnicas. En el estudio realizado por Gan, Lau y Ng (2009), plantean las principales técnicas empleadas para la degradación de los contaminantes en el suelo, en los cuales intervienen los procesos físicos, químicos y biológicos:

- **Tratamiento físico-químico:** Es una combinación de técnicas que se efectúan bajo condiciones de presión ambiental y temperaturas bajas. Entre estas, se encuentran a las ciclodextrinas y los aceites vegetales, que son solventes biodegradables y no dañinos para el ambiente, a comparación del lavado convencional del suelo (extracciones de fluido supercrítico y subcrítico) que requieren equipos de alta presión. No obstante, el objetivo de la extracción por solventes es la separación y transferencia de los hidrocarburos, por ello requiere de un proceso secundario y/o adicional de los extractos.
- **Tratamiento químico:** Este método consiste en el uso de diferentes oxidantes para la reducción de hidrocarburos del petróleo. Sin embargo, pueden generarse derivados tóxicos durante su aplicación. Entre los métodos más novedosos para la remediación de suelos contaminados, se encuentran la degradación fotocatalítica y la remediación electrocinética. Para obtener su mayor efectividad, se deben realizar mayores estudios de factibilidad económica sobre estos métodos.

- **Tratamientos físico-térmicos:** Este tratamiento es eficaz para la degradación de los hidrocarburos del petróleo. Sin embargo, necesita de grandes inversiones para aplicarse, debido a las altas temperaturas que se requieren y el posterior tratamiento de los gases generados. Entre estas técnicas las que más destacan son: la incineración, la desorción térmica y el suelo térmicamente mejorado por extracción a vapor.
- **Tratamiento biológico:** Son aquellos procesos que demandan periodos prolongados para su realización. Se caracteriza principalmente por llevarse a cabo in situ y no requiere de tratamientos posteriores, debido a que los productos resultantes del tratamiento biológico son dióxido de carbono, agua y biomasa. Entre las técnicas más empleadas, se resaltan a la biorremediación in situ como la biolabranza, compostaje, tratamiento aeróbico, anaeróbico, y la fitorremediación (Gan et al., 2009).

a. Fitorremediación

Es un tratamiento biológico que emplea plantas que posean capacidades de acumulación, absorción y/o tolerancia ante altas concentraciones de contaminantes de compuestos orgánicos, inorgánicos y radioactivos (Por qué Biotecnología [PQB], 2003).

El estudio realizado por Cunningham, Berti y Huang (1995), indica que la fitorremediación es una alternativa para depurar los suelos contaminados por hidrocarburos, debido a la capacidad de las plantas en la absorción y transporte de contaminantes al interior de sus raíces y hojas (Figura 3).

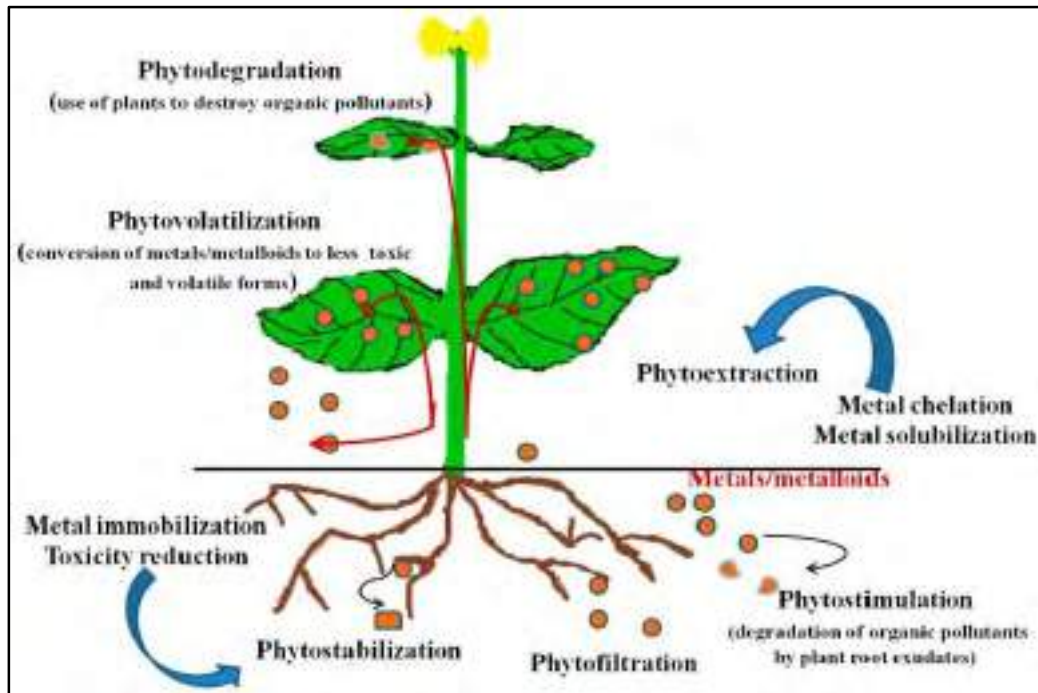


Figura 3. Procesos de la fitorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos.

Fuente: (Ojuederie y Babalola, 2017).

- **Ventajas y desventajas de la fitorremediación**

En la Tabla 3, se describen las principales ventajas y desventajas que ofrece la fitorremediación.

Tabla 3

Principales ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas	Desventajas
Tecnología sustentable	Proceso relativamente lento
Eficiente para tratar diversos tipos de contaminantes <i>in situ</i> .	Dependiente de las condiciones climatológicas
Requiere bajos costos y su manejo es sencillo.	El desarrollo de la vegetación puede estar limitado por altas concentraciones de contaminantes.
Puede tratar una gama diversa de contaminantes.	Se requiere áreas relativamente grandes
Algunas plantas tienen la habilidad de resistir altas concentraciones de contaminantes orgánicos que la mayoría de microorganismos.	Alcanzan únicamente hasta la profundidad a la cual llegan las raíces.
	Requiere de condiciones adecuadas para el crecimiento de las plantas (suelo fertilizado y parámetros fisicoquímicos del suelo óptimos etc.)

Fuente: (Torres y Zuluaga, 2009).

- **Procesos de la fitorremediación**

Los procesos que comprenden las diferentes técnicas de la fitorremediación son:

- **Fitoextracción:** Este proceso consiste en la absorción y acumulación de contaminantes en las estructuras radicales, tallos o follajes de ciertas especies de plantas. Es una tecnología económicamente viable mediante el uso de plantas de biomasa alta, capaces de acumular más del 1% de metales en sus tejidos (Huang, Chen, Berti y Cunningham, 1997). En este mecanismo se reconocen a la familia Brassicaceae, como la *Brassica juncea* (L. Czernae), la cual acumula plomo en su tallo (entre 0.04 a 3.5 %) y raíces (7 a 19 %) (Cunningham y Ow, 1996).

- **Rizofiltración:** Es un proceso que aprovecha la zona de las raíces, la microflora asociada y/o los productos excretados para la destrucción de los contaminantes en la zona rizosférica de las metalofitas (Torres y Zuluaga, 2009). Los investigadores Pivetz, Cochran y Huling (1997), mencionaron que existen especies de pastos que se desarrollan bajo estrés con pentaclorofenol e hidrocarburos aromáticos policíclicos, y demostraron la capacidad de la biomasa vegetal para la reducción de la erosión del suelo y optimizar la biodegradación de los contaminantes del suelo en la zona radicular. De igual forma, en un estudio realizado por Siciliano, Germida, Banks y Greer (2003), demostraron que las asociaciones microbianas en la rizosfera de la *Festuca arundinacea Schreb.* fitoestimularon la capacidad degradadora de los hidrocarburos, al impulsar el potencial catabólico de la rizosfera del suelo.

- **Fitoestabilización:** Es un proceso que utiliza plantas para desarrollar un sistema denso de raíces, que se encargan de estabilizar la movilidad de los contaminantes, con el objetivo de restaurar el suelo (López, Gallegos, Pérez y Gutiérrez, 2005). En el estudio de Rotkittikhun, Chaiyarat, Kruatrachue, Pokethitiyook y Bayer (2007), se demostró que la planta *Vetiveria zizanioides* tiene las características adecuadas para ser utilizada en procesos de fitoestabilización de plomo.

- **Fitovolatilización:** Proceso por el cual se utilizan las enzimas excretadas por las plantas, en conjunto con la actividad microbiana asociada, para degradar, transformar y volatilizar los contaminantes desde el suelo (Torres y Zuluaga, 2009). Una de las especies empleadas en este proceso, se encuentra a la *Populus deltoides* W. Bartram ex Marshall la cual, fue evaluada en el estudio realizado por Orchard, Doucette, Chard y Bugbee (2000), donde volatilizó el 90% de tricloretileno, a través de las hojas después de un periodo de 26 días. Además, se encontró mayor captación y traslocación de 1,4-dioxano en los tejidos de plantas de “álamo” que en su zona radicular (Aitchison, Kelley, Álvarez y Schnoor, 2000).

- **Fitodegradación:** En este proceso las plantas captan el contaminante y lo metabolizan en un material inerte para el ambiente (Torres y Zuluaga, 2009). Según

la investigación realizada por el EPA (2000), las plantas como “papagayo” (*Myriophyllum aquaticum*), “sauce” (*Salix nigra*), “álamo” (*Populus deltoides*) y “álamo amarillo” (*Liriodendron tulipifera*) tienen alto potencial fitorremediador para tratar sitios contaminados con disolventes clorados, tricloroetileno, herbicidas, insecticidas y fenoles.

1.2.3. Fitorremediación de hidrocarburos de petróleo

La investigación realizada por Germida, Frick y Farrell (2002), señalan que la fitorremediación de suelos con hidrocarburos, es una tecnología que se ha ido innovando progresivamente, y que apunta a convertirse en una alternativa efectiva para la mayor parte de las técnicas de ingeniería y convencionales de la biorremediación de hidrocarburos de petróleo. Esta técnica aprovecha el sistema radicular con capacidad de explorar grandes volúmenes de suelo, la actividad microbiana de la zona radicular y las secreciones que interactúen directamente con la dinámica de las rizobacterias. Tomando como base que los hidrocarburos poseen mayor disposición de degradación a nivel microbiano. Por su parte, López et al. (2005), demuestran que algunas características de las plantas incrementan la efectividad biodegradativa de una diversidad de compuestos orgánicos presentes en los suelos.

Algunos estudios han identificado el potencial de algunas variedades de plantas que facilitan la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo. El estudio realizado por April y Sims (1990), quienes evaluaron la capacidad de diferentes tipos de pastos de praderas en el tratamiento de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) en suelos francos arenosos, alcanzaron una mayor tasa de disipación de HAPs en suelos con vegetación a diferencia de los suelos no vegetados. A continuación, se detallará una lista de algunas plantas que han sido usadas en la fitorremediación de hidrocarburos de petróleo (Tabla 4):

Tabla 4

Especies vegetales utilizadas en la degradación de petróleo

Nombre común	Nombre científico	Referencia
“alfalfa”	<i>Medicago sativa</i> L.	(Yateem et al., 2000)
“big bluestem”	<i>Andropogon gerardi</i> Vitman	(Aprill & Sims, 1990)
“avena”	<i>Boutelona curtipendula</i> (Michx.) Torr.	(Aprill & Sims, 1990)
“grama azul”	<i>Boutelona gracilis</i> (Willd. ex Kunth) Lag. ex Griffiths	(Aprill & Sims, 1990)
“maiz”	<i>Zea mays</i> L.	(Chaíneau, Morel y Oudot, 1997)
“grama común”	<i>Cynodon dactylon</i> L.	(Frick, Farrell y Germida, 1999)
“habas”	<i>Vicia faba</i> L.	(Yateem et al., 2000)
“girasol”	<i>Helianthus annuus</i> L.	(Chaíneau, Morel y Oudot, 1997)
“gaygrás”	<i>Lolium multiflorum</i> Lam.	(Zhou et al., 2013)
“frejol arbusto”	<i>Phaseolus vulgaris</i> L.	(Frick et al., 1999)
“indiangrass”	<i>Sorghastrum nutans</i> (L.) Nash	(Aprill & Sims, 1990)
“sorgo”	<i>Sorghum bicolor</i> (L.) Moench	(Aprill & Sims, 1990)
“sudangrass”	<i>Sorghum vulgare</i> L.	(Frick et al., 1999)

Fuente: Elaboración propia.

La investigación llevada a cabo por Qiu, Leland, Shah, Sorensen y Kendall (1997), demostró que en la pradera de *Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm. aceleró la degradación del naftaleno a comparación de suelos arcillosos sin vegetación. Del mismo modo, estos autores ejecutaron un experimento simultáneo para evaluar el desempeño de diversas especies de gramíneas para degradar hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Los resultados demostraron, que distintas especies de praderas aceleraron la degradación de HAPs de bajo peso molecular (naftaleno, fluoreno y fenantreno) en comparación de tratamientos sin vegetación. Por su parte, Reynolds y Wolf (1999), demostraron que los suelos plantados con “festuca roja”

y “raygrás” registraron bajas concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo en comparación con los controles no plantados. Ellos alcanzaron una reducción del 70% del petróleo crudo a los 640 días en el tratamiento con ambas especies; mientras que, el control sin plantaciones alcanzó una tasa de reducción del 60%.

En otra investigación realizada por Yateem, Balba, El-Nawawy y Al-Awadhi (2000), determinaron la capacidad de degradación hidrocarburos totales de petróleo (HTP) en la rizosfera y el suelo no rizosférico de las plantas de “alfalfa” (*Medicago sativa* L.), “habas” (*Vicia faba* L.) y “raygrás” (*Lolium perenne* L.), demostrando que son especies que pueden desarrollarse normalmente en presencia de 1% de HTP. Mientras que, la degradación fue más significativa en las plantas fabáceas, alcanzando un mayor porcentaje de degradación de HTP con plantas de “habas” y “alfalfa” con un valor de 36.6 y 35,8% respectivamente, a comparación del porcentaje degradativo del 24% para el caso de las plantas de “raygrás”. Finalmente, ellos concluyen que existe una correlación entre el tipo de planta y las tasas de degradación de HTP, siendo la mejor elección el empleo de plantas fabáceas.

a. Mecanismos de la fitorremediación de hidrocarburos del petróleo

Las plantas emplean varios mecanismos para remediar los suelos contaminados con compuestos orgánicos. Los principales mecanismos que intervienen en la fitorremediación son:

El primer mecanismo se basa en la segregación de enzimas secretadas por exudados de las raíces de las plantas, las cuales se generan para optimizar la absorción de nutrientes y establecer relaciones con la microflora pertinente que interviene en la reducción directa de los compuestos orgánicos. Este exudado contiene compuestos de bajo peso molecular; tales como, ácidos orgánicos, azúcares simples y aminoácidos. Además, de proteínas de polisacáridos y células muertas. Asimismo, varias enzimas vegetales, incluyendo la deshalogenasa, nitroreductasa, peroxidasa, lacasa y nitrasa (Schnoor, 2002).

El segundo mecanismo, consiste en la liberación de una amplia gama de sustancias orgánicas no enzimáticas por medio de las raíces de las plantas, (células desprendidas, lisados y las secreciones), las cuales sirven como sustrato y estimulan la actividad microbiana de la rizosfera (Aprill y Sims, 1990).

El último mecanismo, se basa en la capacidad de las plantas para bioacumular contaminantes dentro de sus tejidos (fitoacumulación), seguido por la degradación de los contaminantes (fitoderadación), o volatilización (Fitovolatilización). La disposición de los contaminantes fitoacumulados es variable y está relacionado a las interacciones específicas del contaminante con las plantas (White y Newman, 2011).

b. El papel de las plantas en la degradación y el efecto de la rizosfera

En el estudio de Gunther, Dornberger y Fritsche (1996), señalan que las plantas participan de manera indirecta en la reducción de hidrocarburos del petróleo, es por ello que ponen mayor énfasis en la actividad microbiana de la rizósfera, la cual se explica de la siguiente manera:

- Proporcionando exudados radiculares, lo que originan el efecto rizosférico e incrementan la degradación cometabólica.
- Por medio de la segregación de enzimas asociadas en el sistema radicular, capaces de transformar los compuestos orgánicos.
- Por los efectos físicos y químicos de las plantas y su sistema radical sobre las condiciones del suelo.

Además, Gunther et al. (1996), señalan que los parámetros microclimáticos del suelo deben ser óptimos para una adecuada estimulación del efecto rizosférico el cual contribuye en la degradación de los hidrocarburos del petróleo.

De acuerdo a Hegde y Fletcher (1996), indican que el tipo y cantidad de exudados radicales depende del estado de crecimiento y especie de la planta. Además, los exudados forman el enlace entre las plantas y la población microbiana que conllevan al efecto rizosférico. De este modo, demostraron que las plantas de mora (*Morus rubra* L.) generan mayor cantidad de compuestos fenólicos cuando la planta está en etapa temprana a diferencia de la liberación que sucede durante su estado de madurez. Finalmente, ellos concluyen que los compuestos fenológicos de la rizósfera pueden crear un ambiente propicio para mejorar la biodegradación de los contaminantes recalcitrantes.

c. Metabolismo de los compuestos orgánicos por las plantas

En la investigación de Sanderman (1992), menciona que la fitorremediación de sustancias químicas xenobióticas por las plantas generalmente se desarrolla en tres etapas:

- **Etapa I:** Se basa en una cadena de reacciones (oxidación, reducción e hidrólisis) en el cual los compuestos orgánicos pierden parte de su estructura, creándose metabolitos polares e hidrosolubles. Para esta etapa, las células poseen dos sistemas enzimáticos (las aminooxigenasas y los citocromos P450, ubicados en el retículo endoplásmico), los cuales se encargan de introducir en el contaminante un átomo de oxígeno obtenido de la atmósfera. En función de la localización y la transformación, las reacciones de oxidación se dividen en: microsómicas, citosólicas y mitocondriales. En la Figura 4, se exponen las reacciones que suceden durante la fracción microsomal y en la citosólica, formando reacciones de oxidación consecutivas o simultáneas (Kvesitadze, Gordeziani, Khatisashvili, Sadunishvili y Ramsden, 2001).

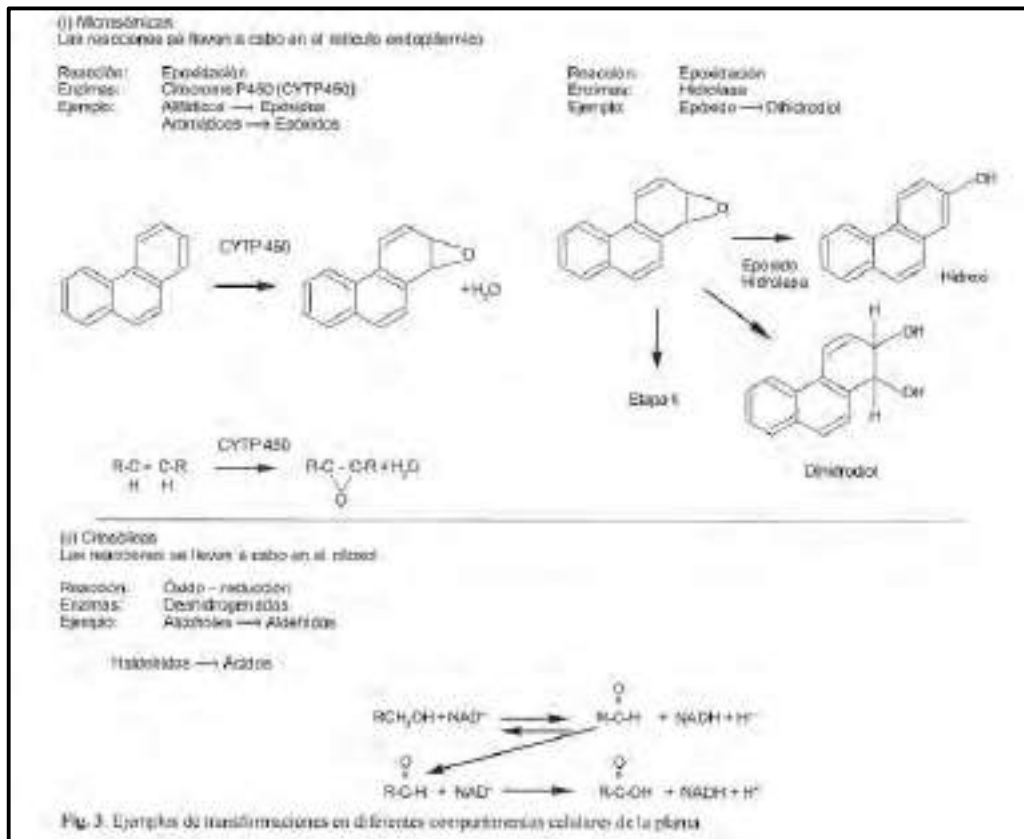


Figura 4. Transformaciones de compuestos orgánicos en diferentes compartimentos celulares de la planta.

Fuente: (López et al., 2005).

- Etapa II:** La conjugación se basa en mecanismos de desintoxicación, enlazando el contaminante con carbohidratos, aminoácidos, péptido y proteínas, a causa de la enzima transferasa. Como resultado de la transformación, la toxicidad del contaminante disminuye a medida que aumenta la hidrofobicidad de las moléculas, dándole una mayor movilidad y promoviendo su depósito en las vacuolas. Este proceso metabólico, es considerado la etapa final de la fitoacumulación y se considera como la transformación incompleta de los contaminantes (Shäffner, Messner, Langebartels y Sanderman, 2002).
- Etapa III:** Es la etapa subsiguiente de la transformación y conjugación, donde los compuestos tóxicos aumentan su polaridad, permaneciendo almacenadas en las vacuolas. Para la adaptación del contaminante se introducen las siguientes enzimas desintoxicadoras; tales como, glutatión peroxidasa, carbonil reductasas,

aldehido oxidasa, alcohol deshidrogenasas, aldehido deshidrogenasas, epóxido hidrolasa, quinona, reductasa, fenoloxidasa, peroxidasa, lacasa, monoxigenasas dependiente de CYTP4550 amino N-metiltransferasa, alcohol sulfotransferasa, entre otras (Jakoby y Ziegler, 1990).

d. Influencia de los factores físico-químicos y ambientales sobre la fitorremediación

- **Temperatura:** este parámetro incide en la velocidad degradativa de los microorganismos sobre los compuestos orgánicos. El estudio realizado por Scheneider y Billingsley (1990), demuestra que una temperatura entre 15 a 35 °C acelera los procesos de degradación de los compuestos orgánicos. En otro estudio, por Simonich y Hites (1995), se afirma que las estaciones afectan la tasa de degradación de hidrocarburos, alcanzando sus mejores resultados en la época de verano con un valor del 72 % de reducción, a diferencia del 56 % registrado durante el invierno.
- **pH:** Es esencial para la capacidad de degradación de las bacterias y hongos introducidos en el suelo. Además, se sabe que las bacterias optan por un pH neutro o alcalino, mientras que los hongos toleran mejor las zonas ácidas (Hernández et al., 2004). En el estudio de Kästner, Breuer-Jammali y Mahro (1998), mencionaron que el rango óptimo de pH para llevar a cabo los procesos de biorremediación se encuentra entre 6 y 8.
- **Textura del suelo:** La disponibilidad de los contaminantes hacia las plantas es influenciada por la textura. En suelos arcillosos, las moléculas se compactan con mayor facilidad y rapidez a comparación de un suelo arenoso, lo que implica que habrá menor disponibilidad del contaminante en suelos con alto contenido de arcilla (Huang, 1990).

- **Materia orgánica:** Este factor puede disminuir la actividad degradativa sobre los contaminantes debido que se unen a los compuestos lipofílicos del suelo. En el estudio de Senesi (1993), se menciona que grandes cantidades de carbono en el suelo se da una mayor adsorción, provocando una baja disponibilidad, mientras que cantidades moderadas de carbono orgánico (1-5%) permiten una disponibilidad limitada.
- **Disponibilidad de nutrientes:** Son importantes para el desarrollo de las plantas y la población microbiana. Los contaminantes orgánicos limitan la disponibilidad de nutrientes del suelo para las plantas. No obstante, incrementan la disponibilidad de nutrientes para el desarrollo de los microorganismos, al acoplar los nutrientes en las capas más bajas del suelo (Xu y Johnson, 1997).
- **Disponibilidad de agua y oxígeno:** Una adecuada disposición del agua (50 – 80 % de saturación) garantiza el intercambio gaseoso y promueve la formación de zonas anoxicas, incrementando el efecto degradativo de los microorganismos anaerobios (Bossert y Bartha, 1984). Existen plantas capaces de retener la humedad conservando numerosas colonias de bacterias en la rizosfera, las cuales apoyan la degradación de hidrocarburos (Hernández et al., 2004).
- **Radiación solar:** La luz solar tiene la capacidad de transformar a los contaminantes en compuestos de mayor polaridad y solubilidad, pero aumentando la toxicidad con respecto a su composición original. La degradación parcial de hidrocarburos por las plantas se efectúa con mayor velocidad en presencia de luz solar. Sin embargo, una asimilación total, tanto para contaminantes de composición inicial como los modificados, se da en ambientes oscuros (Duxbury, Dixon y Greenberg, 1997).

1.2.4. Micorremediación

Es una técnica de biorremediación que tiene como finalidad utilizar el micelio de los hongos para remover o degradar contaminantes en un área determinada. Los micelios se encargan de segregar enzimas extracelulares para descomponer los hidrocarburos en fertilizantes orgánicos de un modo económico (Moreno, López, Zavala, Velázquez y Hernández, 2015).

1.2.5. Importancia de las plantas seleccionadas

a. *Phaseolus vulgaris* L. “frejol”

- **Origen**

El origen del “frejol” se remonta hace 7000 años a. c. cultivados principalmente en la América Tropical (México, Guatemala y Perú) y en zonas de los hemisferios norte y sur. Las primeras evidencias de la diversidad genética del “frejol” que existen en esta región, junto con los hallazgos arqueológicos comprueban la antigüedad de su cultivo en México y Perú. Su distribución en diversas partes del mundo se dio después del descubrimiento de América (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], 1980).

- **Descripción botánica**

El frejol es una planta herbácea, cuyo nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L., perteneciente de la familia de las Fabaceae (CIAT, 1980). Presenta un crecimiento variado, que puede ser: determinado (enano) o arbustivo (erectos como arbolitos), y un crecimiento indeterminado, presentando características rastreras que requieren de un soporte vertical para trepar por medio de sus zarcillos, los cuales se enrollan al soporte (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA],

1989). Se describen las partes de las plantas de frejol de la siguiente manera:

- Raíz: La estructura radicular está formada por una raíz principal y por varias ramificaciones laterales, dándole una apariencia cónica. Siendo características peculiares de las fabáceas. Por medio de las raíces, el frejol puede hacer simbiosis con bacterias del género *Rhizobium*, formando nódulos de tamaños muy variados (IICA, 1989).
- Tallo: Constituye el eje central de la planta, se caracteriza por ser delgado, débiles, angulosos y de sección cuadrangular. Estos órganos almacenan pequeñas cantidades de alimentos fotosintetizados, que luego pasan a ser transportados hacia las vainas (frutos) y que en su etapa final se vuelven huecos (IICA, 1989).
- Hoja: Se caracterizan por ser de dos tipos, simples y compuestas, y enlazadas a los nudos del tallo y las ramas. Las hojas primarias son simples, se encuentran en el segundo nudo del tallo, y se desarrollan en la semilla durante la embriogénesis y se desprenden de la planta cuando está completamente desarrollada. Mientras que, las hojas compuestas trifoliadas, son las hojas características del frejol (IICA, 1989).
- Inflorescencia: Se presenta de forma terminal o axilar y están repartidas en racimos con numerosas flores, la cual es un rasgo propio de las variedades (IICA, 1989).
- Flor: Se caracteriza por ser una papilionácea, identificando dos estados en su desarrollo, el botón floral y la flor totalmente abierta (IICA, 1989).



Figura 5. Morfología de la *Phaseolus vulgaris* “frejol”.

Fuente: (Francesco & Gonzales, 2000).

- Vaina: Es de forma lineal y ligeramente comprimida, cuya placenta se abre en la parte ventral llegada la madurez. Pueden ser de distintos colores, formas y características (IICA, 1989).

- Semilla: La forma más genéricas son aquellas esféricas, redondas, y cilíndricas. Respecto al color se presentan con distintas mezclas. Se encuentran conformados por dos cotiledones (IICA, 1989).

- **Condiciones edafoclimáticas de *Phaseolus vulgaris* “frejol”**

- Distribución geográfica: Se encuentra cultivado desde el nivel del mar (Ecuador) hasta altitudes cercanas a 2500 m.s.n.m. (México, Guatemala, Colombia, Ecuador, Perú, entre otros) (IICA, 1989).

- Suelo: Crece apropiadamente en suelos con textura franco limosa, siendo adaptable a texturas franco arcillosas (IICA, 2009). Respecto al pH ideal para su desarrollo óptimo, se encuentra en un rango entre 6.5 y 7.5, permitiendo una mejor disponibilidad de nutrientes. No obstante, el pH entre 4.5 y 5.5, la planta puede responder positivamente (Escoto-Gudiel, 2004).

- Temperatura: Gran parte de los frejoles se desarrollan a temperaturas entre 17.5 a 25 °C, valores por debajo o sobre el óptimo merman el rendimiento debido a la mortalidad de la planta, temperaturas altas reducen la capacidad fotosintética y disminuye la cantidad de flores que producen las vainas maduras (Instituto de Ciencias y Tecnología Agrícolas [ICTA], 2010). Sin embargo, puede soportar temperaturas de hasta 33 °C, pero no temperaturas muy bajas, siendo la mínima 8 °C, causando que la planta fácilmente sufra daños irreversibles (IICA, 1989).

- Luz: Fuente lumínica primordial para la fotosíntesis de las plantas, debido a que afecta la fenología y morfología de las plantas por reacciones de fotoperiodo y elongación, en intensidades altas afecta la temperatura ideal para el desarrollo de la planta. El frejol es una especie de días cortos; mientras que, los días largos tienden a causar demora en la floración y la madurez (White, 1985).

- Disponibilidad de agua: La demanda de agua varía de acuerdo al crecimiento de la planta, principalmente en la etapa de la floración; posteriormente, la cantidad requerida para el crecimiento de los frutos se reduce. No tolera bien los excesos de agua en la fase de maduración, así como sequías prolongadas en la primera fase de crecimiento (IICA, 1989).

- Nutrientes: Para asegurar el apropiado desarrollo de las plantas de frejol, se debe suministrar altas cantidades de N, K y Ca, y en menor cantidad S, Mg y P (Arias-Restrepo, Rengifo-Martínez y Jaramillo-Carmona, 2007).

El estudio de Socorro y Martín (1988), señala que el nitrógeno es un elemento esencial para la división celular, el desarrollo de los órganos y el aumento del área foliar. Su aplicación es vital desde el inicio del desarrollo de la planta debido a que su absorción incrementa rápidamente desde el inicio del crecimiento y se extiende durante y después de la floración hasta el llenado de los granos, y finalmente en la maduración. El fósforo es importante para la formación de los tejidos de la planta y para la actividad biológica. Además, cumple un papel fundamental como transportador de energía sintetizando las proteínas celulares, así como en el metabolismo de los glúcidos. Las plantas que consumen altos niveles de fósforo se desarrollan a una mayor rapidez (Loforte, 2007). El potasio es de gran relevancia para el cultivo, porque interviene en la presión osmótica de las células, reduce la transpiración y contribuye a mantener la turgencia celular. Además, participa en la asimilación clorofílica, en la formación de los glúcidos y la síntesis de las proteínas. La absorción de potasio por la planta durante su ciclo de vida, se encuentra máximo entre los 44 y 53 días (Loforte, 2007).

- **Fenología de la *Phaseolus vulgaris* “frejol”**

En la Figura 6, se explica las fases de crecimiento del “frejol”. La germinación ocurre a los 0 a 5 días, seguidamente emerge la radícula a los 5 – 7 días para formar la raíz primaria al aparecer sobre ella las raíces secundarias; el hipocotíleo también crece, y quedan los cotiledones al nivel del suelo. A los 11 días aproximadamente, los cotiledones comenzaron a separarse y aparecieron las hojas primarias. Posteriormente, entre los 11 a 23 días se formaron completamente el tallo, las ramas y las hojas trifoliadas. En esta etapa se evidenciaron las estructuras vegetativas como el tallo, las ramas y las

hojas trifoliadas que se desarrollan a partir de las tríadas de yemas. A los 23 – 32 días, se formaron el primer racimo floral, seguidamente empezó la floración durante los 23 – 32 días, cuando la planta presentó la primera flor abierta. Seguidamente, continuó con la formación de las vainas a los 36 – 44 días, dicha etapa inicia cuando aparece la primera vaina con la corola de la flor colgada o desprendida, cuando las valvas alcanzan su tamaño final, se inicia el llenado de las vainas a los 44 – 62 días, de crecimiento de la planta. Finalmente, el ciclo biológico del frejol, culmina con la maduración del cultivo entre los 62 - 77 días, presentándose las pigmentación y secado de las vainas (Arias et al., 2007; IICA, 2009).

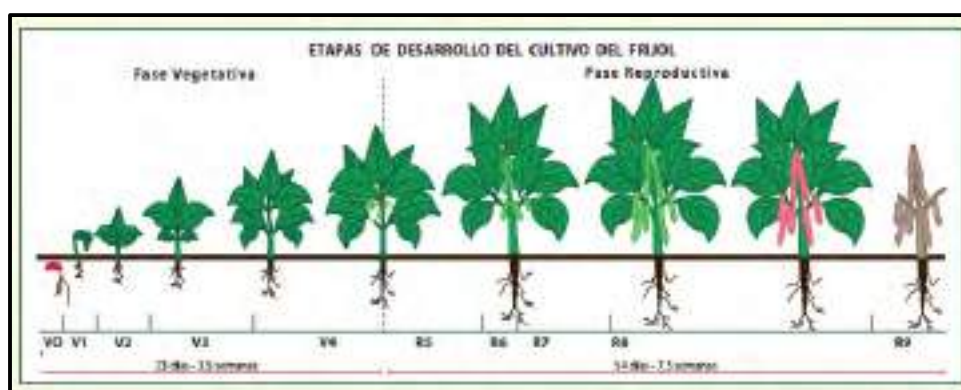


Figura 6. Etapas de desarrollo de la *Phaseolus vulgaris* “frejol”.

Fuente: (IICA, 2009).

- **Característica del frejol como planta fitorremediadora**

- Facilidad de su manejo para su cultivo.
- Se adapta fácilmente a un amplio intervalo en la variación de temperatura.
- Es una planta que crece en suelos contaminados con petróleo crudo (Hernández et al., 2003), antraceno (Perez et al., 2011) y querosene (Hernández, 2013).

b. *Arachis hypogaea* L. “maní”

• **Origen**

Los registros indican que la *Arachis hypogaea*, es una leguminosa nativa a nivel nacional y localizable en los departamentos de Ayacucho, Ancash, La Libertad y Lambayeque. En América latina se ha registrado especímenes de maní en Bolivia, al norte de Argentina y Brasil. Arqueológicamente representaba uno de los frutos en collares de oro y plata en restos de mas 5000 años, los cuales decoraban la tumba del Señor de Sipán en las ruinas de Huaca Rajada, Lambayeque. Principalmente, se cultiva en diversos países tropicales y subtropicales, siendo una planta valiosa como fuente de proteína vegetal tanto para consumo humano y animal. Económicamente, genera ingresos significativos para los pequeños productores de países en vías de desarrollo, donde se produce el 90% de la producción mundial (Burgos, 2006).

• **Descripción Botánica**

Según Álava-Gómez (2012), define al maní como una planta herbácea perteneciente a la familia de las Fabaceae, caracterizaba por sus frutos en forma de vaina, los cuales crecen bajo el suelo y poseen varias semillas, tal como se muestra en la Figura 7. Es una planta de tallo ascendente, pudiendo alcanzar de 15 a 70 cm de altura, el tallo es ligeramente piloso con ramificaciones desde su base. Valladares (2010), describe sus características biológicas de la siguiente manera:

- Raíz: Consta de una raíz primaria de la cual nacen raíces laterales. La profundidad que pueda alcanzar está sujeta a las características de suelo, clima y las prácticas de cultivo. Además, se pueden formar raíces adventicias a partir del tallo, las ramas que tocan el suelo y el pedúnculo de la flor (ginóforo). El maní, al ser una leguminosa, también forma simbiosis con las bacterias fijadoras de nitrógeno, *Rhizobium*.

- Tallo: Presenta características tanto erecta como rastrera, posee una forma cilíndrica y puede alcanzar los 80 cm de alto. Generalmente, es de color verde o con menor frecuencia, púrpura, además de exhibir pelos en su superficie.

- Hojas: Son pinnadas con dos pares de folíolos unidos a un pecíolo de 4-9 cm de longitud; los folíolos opuestos y de forma aproximadamente elíptica. Asimismo, están rodeados en la base por dos estípulas anchas, largas y lanceoladas. Las variaciones de la organización foliar dan cinco, tres, dos e incluso un solo folíolo.

- Inflorescencia: se presenta como unas espigas de tres a cinco flores. Nacen en las ramillas vegetativas, axilas de una flor completa o rudimentaria y manifiestan en cada nudo una hoja primaria (catáfila) en cuya axila se desarrolla una rama floral muy corta que a su vez lleva una hoja rudimentaria o a menudo bífida. En la axila de esta última se ubica la yema floral.

- Flor: se ubica únicamente en las axilas de las hojas inferiores o intermedias de la planta. Generalmente, son amarillas y hermafroditas, su tasa de autofecundación es cerca del 97%. Tras la fecundación, el ginóforo se despliega hacia el suelo, empujando al ovario fecundado que acabará enterrándose.

- Fruto: una vez fecundada, la base del ovario se prolonga para permitir la aparición del ginóforo que es, en sí, parte del propio fruto y en cuyo extremo se desarrolla la vaina después de enterrarse. Los frutos se desarrollan bajo tierra, el color de la cubierta puede ser blanco y cada uno puede contener hasta cinco semillas, aunque generalmente se desarrollan dos o tres.



Figura 7. Morfología de la *Arachis hypogaea* “maní”.

Fuente: (Paleari, 2015).

- **Requerimientos edafoclimáticos**

- Distribución geográfica: *Arachis hypogaea* es una planta termófila y principalmente se distribuye entre latitudes de 44 grados al norte y 35 grados al sur (Funes, Monzote y Marrero, 2003).
- Temperatura: La planta *Arachis hypogaea* requiere una temperatura entre 32° y 34 °C para una adecuada germinación. Sin embargo, esta se puede inhibir si las temperaturas son extremas (15° y 45 °C). Para su desarrollo necesita temperaturas que fluctúan de 24 a 33 °C. A temperaturas inferiores de 10 °C, el crecimiento de la planta se detiene (IICA, 1989).
- Fotoperiodo y Luz: El *Arachis hypogaea* al ser una planta tropical requiere una adecuada luminosidad, desde su sembrado hasta la cosecha (Mendoza, Linzan y Guamán, 2005). La intensidad de la luz es vital, requiriendo de 10 a 13 horas de luz diarias, puesto que influye promoviendo la fotosíntesis y asimilación de nutrientes por parte de la

planta, mejorando su desarrollo y favoreciendo una buena producción de aceite (Heredia, Túchez, Díaz y Ardón, 1989).

- Riego: El *Arachis hypogaea* L. es resistente a periodos de estiaje. Sin embargo, para su óptimo desarrollo requiere de suficiente agua durante las etapas de floración, formación y llenado de frutos. Cabe resaltar, que un exceso de humedad en la etapa de madurez ocasiona una germinación precoz de los granos, desarrollando semillas sin latencia, además, las vainas pueden desprenderse o pudrirse. La constancia del riego dependerá del tipo del suelo, el clima y la época del cultivo (Mendoza et al., 2005).

- Suelos: Se desarrolla en suelos con textura franco-limosa o franco arenoso, con buen drenaje y aireación (Mendoza et al, 2005). Respecto al pH, el maní es sensible a la salinidad, por lo que requiere suelos con pH entre 6.5 y 7.5, pero puede variar entre 4.2 y 8, valores inferiores puede reducir la producción (IICA, 1989).

- Requerimientos Nutricionales: De acuerdo a Burgos (2006), menciona que las plantas de maní requieren un suelo muy fértil y con alto contenido de calcio, fósforo y potasio para garantizar el óptimo crecimiento de la planta. Asimismo, Naturland (2000), reporta que los requerimientos básicos de nutrientes (kg/ha) son N=192, P=22, K=66, Ca=77, Mg=25 y S=15.

Cabe señalar que, debido a la asociación con micorrizas su eficiencia de absorción del fósforo es muy alta (Naturland, 2000). La escasez de nitrógeno no se evidencia durante el estado vegetativo, los síntomas se manifiestan al inicio del estado reproductivo debido a la demanda de nitrógeno para la formación de los frutos y la consecuente transferencia

desde las hojas (tornándose amarillas en los bordes). Así como, la ausencia de calcio afecta la formación de los granos, los cuales son absorbidos por las vainas directamente desde el suelo (Padelini, 2012).

- **Fenología de la *Arachis hypogaea* L. “maní”**

La planta *Arachis hypogaea* L. tiene un hábito de crecimiento indeterminado, por lo tanto, los estados vegetativos y reproductivos presentan un grado de superposición variable. La duración de las distintas etapas es afectada por la temperatura, el contenido hídrico del suelo, el fotoperiodo y el genotipo (Giambastiani, 2000).

Las semillas de maní presentan un crecimiento, tal como se muestra en la Figura 8, y se explica a continuación. La germinación y emergencia de la semilla se manifiesta entre los 5 – 10 días, dependiendo de la profundidad de siembra y la temperatura del suelo. A los 5 – 6 días, se presenta el enraizamiento de numerosas raíces laterales de 10 a 16 cm en profundidad. Paralelamente, el hipocótilo se elonga, los cotiledones alcanzan la superficie del suelo y las primeras hojas comienzan a desplegarse (Meneses, Waijenber y Piérola, 1996). El crecimiento de la parte aérea, al inicio, es lento puesto que la planta prioriza el crecimiento del sistema radicular (Giambastiani, 2000). La emisión de las primeras flores ocurre a partir de los 20-35 días después de la emergencia del cultivo y este periodo puede durar de 20 a 60 días, según las condiciones de humedad del suelo, la radiación solar, la temperatura y el fotoperiodo (Meneses et al., 1996). Finalmente, la madurez fisiológica se presenta a los 85-100 días después de la siembra, observándose el deterioro natural de la vaina (Meneses et al., 1996, citados por Sarmiento, 2013, p. 5).

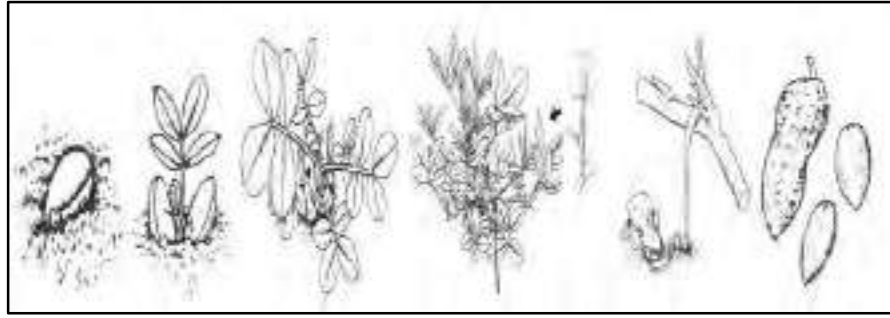


Figura 8. Etapas de desarrollo de la *Arachis hypogaea* L. “maní”.

Fuente: (Yzarra & López, 2011).

- **Características del maní como planta fitorremediadora**

El maní se escogió para este estudio por las siguientes razones:

- Facilidad en el manejo de su cultivo.
- Su adaptabilidad ante amplios rangos de temperatura.
- Es adaptable a condiciones de estrés ambiental.
- La época de la siembra es variable y depende de las características climatológicas de cada región.
- Puede crecer en suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo, por lo que se considera una buena opción para la fitorremediación (Nwoko, Okeke, Agwu y Akpan, 2007).
- Es una planta micotrófica que puede descomponer y eliminar hidrocarburos totales de petróleo presentes en el suelo (Nwoko, 2014).

1.2.6. Hongos micorrízico-arbusculares

a. Generalidades de los hongos micorrízico-arbusculares

La terminología micorriza, fue utilizado por primera vez por el científico alemán Albert Frank en el año 1885, y proviene del griego; “mykes” (hongos) y “rhiza” (raíces) (Harrison, 1997). Constituyen componentes vitales de la microbiota del suelo que interactúan con los microorganismos de la rizosfera, cambiando los aspectos fisiológicos de las plantas, así como algunas propiedades nutricionales y

físicas del suelo rizosférico. A su vez, se va mejorando la absorción de nutrientes que optimiza el crecimiento y aumenta la biomasa de las plantas (Barea, Azcón y Azcón, 2002).

Los hongos formadores de micorrizas arbusculares (HMA) son asociaciones simbióticas entre hongos del Phylum Glomeromycota y las raíces de una extensa variedad de plantas (Perez, Rojas, Montes y Donicer, 2011). Estos organismos biotrófos necesitan de un hospedero autótrofo para completar su ciclo de vida y para la generación de esporas, tal como se muestra en la Figura 9.

Al establecerse la colonización micorrizica arbuscular, la morfología de la raíz hospedera se modifica manifestando: un sistema de hifas vinculado, que se extiende en el interior del suelo; arbusculos intracelulares, los cuales actúan como órganos de transferencia de nutrientes entre la célula vegetal y el huésped; y alargadas vesículas intercalares o terminales, que sirven como almacén orgánico del endófito (Carlin y Brown, 1982). La presencia de arbusculos y vesículas, conllevó que la simbiosis se denominara en un principio como micorriza – arbuscular. Sin embargo, no todas las especies de hongos son capaces de formar vesículas, por lo que actualmente la asociación se llama “micorriza arbuscular” (MA) (Aguilera, Olalde, Arriaga y Contreras, 2007).



Figura 9. Ciclo de vida y fases de desarrollo del hongo micorrizico-arbuscular.

Fuente: (Bucking, Liepold y Ambilwade, 2012).

La colonización comienza con la identificación mutua entre planta-hongo, desde el micelio hacia la raíz de la planta en la rizosfera, en el cual se secreta sustancias exudadas de la raíz, provocando así el desarrollo del micelio en la raíz de la planta. El contacto intercelular se produce cuando las hifas finalmente tienen contacto con la célula epidérmica o un pelo radical y produce un apresorio, en el cual se generan ramificaciones infectivas cortas. Posteriormente, se produce la introducción de la hifa en la pared celular de la raíz, dispersándose intracelularmente a lo largo de la corteza, hasta alcanzar la segunda capa de células corticales. Cuando la hifa degrada la pared de la célula y penetra la membrana para ramificarse, se produce cambios en la estructura de la raíz, generándose arbúsculos y vesículas dentro de la célula. Finalmente, se produce una alteración de las actividades

enzimáticas, las cuales se coordinan entre los simbioses para integrar sus procesos metabólicos (Harley y Smith, 1983).

La colonización por hongos micorrizico-arbusculares se ve beneficiada cuando hay un déficit de nutrientes en el suelo, principalmente de fósforo. Asimismo, existen otros nutrientes y minerales que pueden estar biodisponibles por medio de la asociación planta-hongo, así como la translocación del agua (Abbott y Robson, 1982).

b. Factores que afectan la colonización de micorrizas en campo

La formación y desempeño de los HMA puede verse afectado por cambios en la estructura edáfica (humedad, temperatura y disponibilidad de nutrientes) como consecuencia de las condiciones naturales o contaminación por sustancias tóxicas para los microorganismos y plantas (Augé, 2000). Cuando hay exceso de agua se presenta inhibición de la colonización por HMA, mientras que, en suelos semihúmedos se va incrementado (Miller, 2000).

Los rangos de temperatura ideal para el desarrollo de la simbiosis en el suelo varían entre 18 y 30 °C; mientras que, temperaturas inferiores la simbiosis se ve afectada (Matsubara y Harada, 1966).

Los HMA responden de forma variable a los niveles de pH, notándose respuestas positivas por parte de los HMA en pH ácidos y otros en pH alcalinos (Clark, Zobel y Zeto, 1999). Esta relación puede estar relacionada con la disponibilidad de fósforo, el cual en grandes cantidades disminuye la capacidad del HMA para optimizar la absorción de nutrientes, mientras que niveles moderados de P aumentan los niveles de nitrógeno y la infección por estos hongos (Safir y Duniway, 1991).

c. Clasificación de los diferentes tipos de hongos micorrízicos

Según Strullu, Perrin y Plenchette (1991), menciona que existen tres tipos de micorrizas que se distinguen por la forma en que las hifas del hongo se encuentran dentro de los tejidos corticales de la raíz:

Las ectomicorrizas, se establecen cuando el micelio fúngico no penetra en las células de la raíz. Esta simbiosis, forma la red de Harting y una estructura denominada manto, donde se genera una envoltura de las raíces afectadas en el cual se extiende el sistema hifal que favorece la mayor superficie de absorción de compuestos minerales. Los hongos capaces de formar este tipo de asociación pertenecen a los géneros *Basidiomycetes* o *Ascomycetes* y plantas de los grupos Gimnospermas o Angiospermas, estableciendo una simbiosis entre un 3% y un 5% de las plantas (García-Cuesta, 2010).

Las endomicorrizas, se basa en la penetración de las hifas de manera intra e intercelular en las células corticales y epidérmicas de la raíz, para formar arbuscúlos y vesículas que aseguran una gran superficie de contacto entre ambos asociados (Quilambo, 2003). Se subdivide en tres grupos: ericoides, orquidoides y vesículo-arbusculares. Micorriza de ericoides pertenecen a la familia Ericaceae, son aquellos hongos que forman pelotones dentro de las células corticales. En este tipo de asociación, no se forman vesículas, arbuscúlos y manto de hifas. Los hongos que se encuentran en este grupo son: Asmicotina y Basidimycotina (Smith y Read, 1997).

Las micorrizas de orquídeas, son aquellas que forman una asociación intracelular con una fisiología especial con hongos del género Basidiomycota (Smith y Read, 1997).

Las micorrizas vesícula-arbúscular se establecen cuando el hongo hace contacto con la raíz del hospedero, formándose así, una estructura llamada apresorio sobre la epidermis de la misma, dando lugar a la formación de una estructura de precolonización; luego de dos o tres días, se iniciará la penetración del hongo en la raíz de la planta, siendo esta la zona más activa para la colonización, como se observa en la Figura 10 (Giovannetti, Sbrana, Avio, Citeresi y Logi, 1993).

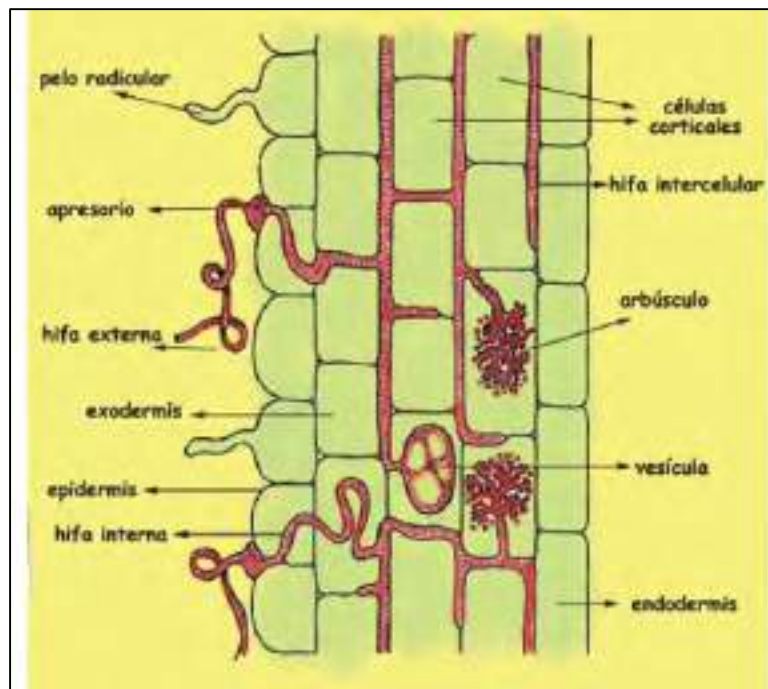


Figura 10. Estructura morfológica de un hongo micorrizico-arbuscular.

Fuente: (Spuny, 2008, citado por García-Cuesta, 2010, p. 73)

Los hongos micorrizico-arbusculares se encargan de colonizar en las células corticales de raíces de las plantas mediante sus micelios, las hifas externas no forman manto, el micelio es inter e intracelulares formando arbusculos y vesículas (Harrison, 1997). Los arbusculos, son hifas que se dividen dicotómicamente, son invaginados por la membrana plasmática de las células corticales y presentan periodos de vida cortos. Mientras que, las vesículas son estructuras de almacenamiento de lípidos que se forman en la parte terminal de las hifas y se forman a partir del hinchamiento de una

hifa, y pueden llegar a engrosar sus paredes y convertirse en esporas (Barker, Tagu y Delp, 1998). Las esporas tienen altos contenidos de lípidos, junto con las hifas, producen fitohormonas u hormonas vegetales como la auxina, giberelina y citoquininas, cuando estas hormonas son secretadas durante la formación de la micorriza, van a contribuir significativamente a los cambios de la fisiología del hospedante (García-Cuesta, 2010).

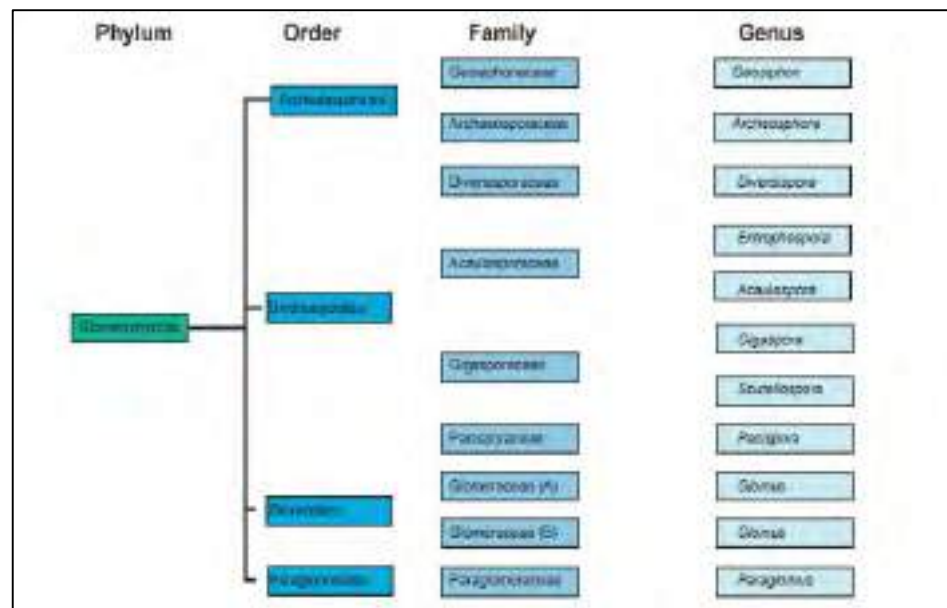


Figura 11. Clasificación general de los hongos micorrizicos-arbusculares.

Fuente: (Montaño, Camargo, García y Monroy, 2007).

Los hongos micorrizico-arbusculares establecen asociación simbiótica en el 80 – 85% de las plantas terrestres. Distribuidas entre los grupos de las familias de las Briófitas, Pteridófitas, Angiospermas y Gimnospermas; se desarrollan principalmente en familias Poaceae (gramíneas) y Fabaceae (fabáceas) (Daniell, Husband, Fitter y Young, 2001). Los hongos formadores de micorrizas arbusculares pertenecen al phylum *Glomeromycota* (Figura 11).

Las ectendomicorrizas establecen una asociación de tipo intermedio entre las ectomicorrizas (el manto y red de Hartig) y las endomicorrizas (colonización de células radicales), teniendo a la vez ambas características. En este grupo, se encuentran las micorrizas de tipo arbutoide en los géneros *Arbutus*, *Arctostaphylos* o *Vaccinium* formada por hongos Basidiomycotina y el tipo Monotropaceae que se caracteriza por tener una red de Hartig y un manto bien desarrollado (Strullu, Perrin y Plenchette, 1991).

d. Hongo micorrízico-arbuscular (*Rhizophagus intraradices*)

La *Rhizophagus intraradices* (N.C.Schenck & G.S.Sm.) C.Walker & A. Schüßler, 2010, anteriormente llamada *Glomus intraradices* N.C.Schenck y G.S.Sm., 1982, es un hongo micorrízico arbuscular de la familia Glomeraceae (Tabla 5), usualmente empleado como inoculante en suelos agrícolas y la horticultura, así como en estudios científicos sobre efectos de los hongos micorrízicos arbusculares en la estimulación del crecimiento de las plantas y mejoramiento de suelos.

Se caracterizan por poseer una morfología propia, que contiene hifas extraradicales, esporas, vesículas y arbuscúlos (Figura 12) (Audet, 2012). En lo que respecta a las esporas de la *Rhizophagus intraradices* posee una característica globosa irregular de color pardo rojizo con un tamaño de 40 – 140 μm , y consta de tres capas (L1: coloración rojo a púrpura pálido, L2: capa hialina y mucilaginosa y L3: capa laminada), tal como se observa en la Figura 13.

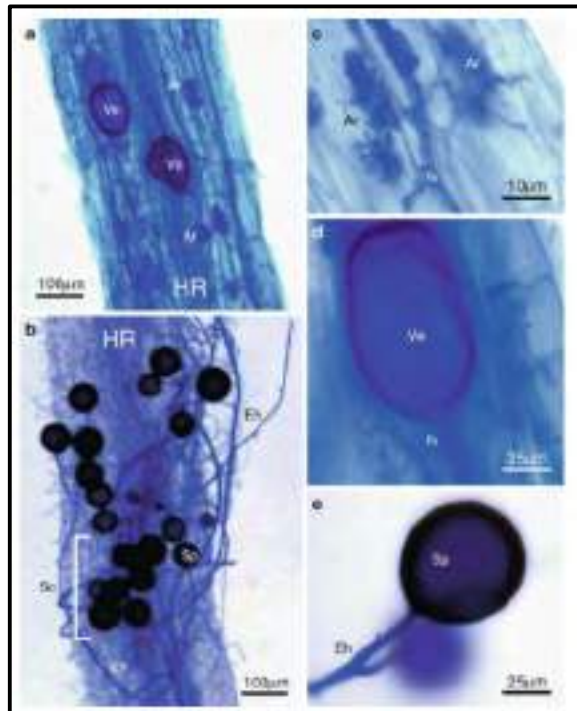


Figura 12. Estructura de la *Rhizophagus intraradices* en raíces de zanahoria. A. Vesículas (Ve). B. Esporas (Sp), Grupo de esporas (Sc), hifas extraradical (Eh), hifas intraradicales (Ih). C. Arbúsculos (Ar). D. Vesículas (Ve). E. Esporas (Sp) e hifa extraradical (Eh).

Fuente: (Audet, 2012).

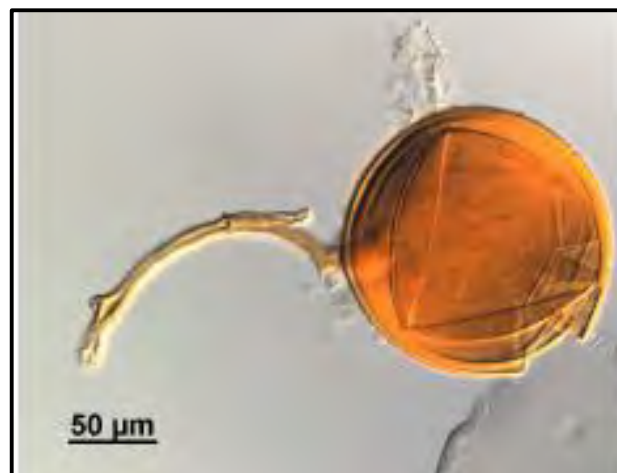


Figura 13. Fotografía a nivel de microscopio de esporas (50 µm) de la *Rhizophagus intraradices*.

Fuente: (Medina, Rodríguez, Torres y Herrera, 2010).

Tabla 5

Clasificación del hongo micorrizico arbuscular Rhizophagus intraradices

Clasificación	Descripción
Reino	Hongos
Filo	Glomeromycota
Clase	Glomeromycetes
Orden	Glomerales
Familia	Glomeraceae
Genero	<i>Rhizophagus</i>
Especie	<i>Rhizophagus intraradices</i>

Fuente: (Schüßler, 2016).

Por otro lado, ha sido muy empleada en estudios de rizorremediación obteniendo eficaces resultados. Tal como, lo menciona Liu y Dalpé (2009), en el cual evidenciaron que la *Rhizophagus intraradices*, no solo favorece el crecimiento de las plantas, sino también ayuda a reducir altos niveles de hidrocarburos aromáticos policíclicos en el suelo.

Estos hongos tienden a colonizar por medio de una extensa red de hifas y esporas intraradicales que se asocian a las raíces de las plantas huéspedes (Giovannetti et al., 1993). En numerosos estudios científicos la *Rhizophagus intraradices* ha demostrado ser eficaz en la absorción de fósforo en varias plantas, así como en la mejor agregación del suelo (Cardoso y Kuyper, 2006).

e. Asociación entre hongo micorrízico arbuscular y planta en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos

El papel fundamental de hongos micorrízico-arbusculares incrementa la eficacia de la fitorremediación, mediante: el mejor desarrollo de la planta y de las raíces, así como el incremento de la actividad de los microorganismos de la rizosfera, y estimulan la mayor adsorción y bioacumulación de los hidrocarburos en la zona radicular (Rajtor y Piotrowska, 2016).

Del mismo modo, Rajtor y Piotrowska, mencionan que la interacción entre las plantas y los hongos micorrízico-arbusculares se establecen de la siguiente manera: (a) Las hifas incrementan la adquisición de nutrientes y absorción de agua hacia las plantas. (b) Las micorrizas estabilizan los agregados del suelo que mejoran significativamente el crecimiento de la planta. (c) Absorción e inmovilización de contaminantes orgánicos localizados en las capas más profundas del suelo. (d) El carbono orgánico disuelto entregado por las hifas en zonas profundas de la rizosfera estimula el desarrollo y la actividad enzimática de los microorganismos degradadores de hidrocarburos. (e) Se establece la colonización micorrizica alterando el patrón de exudación de la raíz, incrementando la actividad de las oxidoreductasas, enzimas que son principalmente responsables de la degradación oxidativa de compuestos aromáticos y protegerá las plantas del estrés oxidativo. (f) Aumentan el contenido de lípidos, el volumen del área total de adsorción del sistema de raíces, que contribuye a mejorar absorción de hidrocarburos hidrófobos, tal como se observa en la Figura 14.

En la investigación de Yu, Wu, Wu y Wong (2011), demostraron el papel fundamental que tienen las micorrizas en la fitorremediación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). A su vez, en el estudio de Tang, Chen, Huang y Tian (2009), evidenciaron que los hongos

micorrizico-arbusculares tienen un efecto estimulador sobre el crecimiento y resistencia de las plantas: *Medicago sativa* y *Zea mays*, ante el estrés de contaminantes, e incrementan las actividades enzimáticas cuando se encuentran expuestas a suelos contaminados con diésel y antraceno.

Por otro lado, los efectos de los hidrocarburos sobre la asociación simbiótica de los HMA y las metalofitas dependen del tipo de planta y hongo, de la concentración y del tipo de contaminante. Por tal motivo, el benzo (a) pireno afecta la colonización, la longitud de hifas extrarradicales y la formación de esporas de *Rhizophagus intraradices* en cultivo in vitro con *Cichorium intybus* (Debiane et al., 2009).

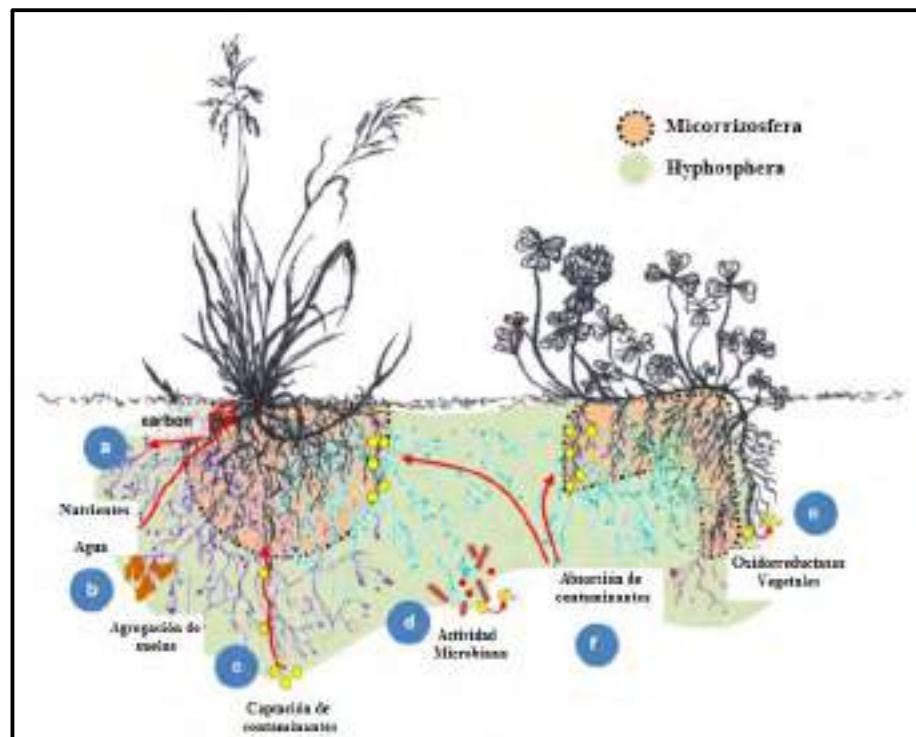


Figura 14. Participación de las micorrizas en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos. Fuente: (Rajtor & Piotrowska, 2016).

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. MATERIALES

2.1.1. Material Biológico

- Semillas de “frejol” (*Phaseolus vulgaris* L.) y “maní” (*Arachis hypogaea* L.) adquiridas de la provincia de Atalaya, departamento Ucayalí.
- Las muestras de petróleo fueron adquiridas de la provincia de Atalaya, departamento Ucayalí.
- Hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices* obtenidas de la empresa AGROMAT Perú, tal como se observa en la Figura 15.



Figura 15. *Rhizophagus intraradices* en sustrato inerte (arcilla expandida) de la marca MYCOSYM TRI-TON®.

2.1.2. Materiales para germinación

- Bandejas germinadoras (55 cm de ancho x 37.5 cm de largo x 12 cm de diámetro) adquiridas del centro de ventas de la Universidad Nacional Agraria La Molina.
- Sustrato de vermiculita fina adquirirá del centro de ventas de la Universidad Agraria La Molina.
- Sustrato de perlita agrícola adquirido de la empresa PERLIQUIM PERU.
- Compost orgánico adquirido del centro de ventas de la Universidad Agraria La Molina.

2.1.3. Materiales para el crecimiento de las plantas

- Tierra preparada adquirida de la empresa MALLKI.
- Macetas (14 cm de diámetro x 15 cm de altura) adquiridas de la empresa MARUPLAST INTERNACIONAL.

2.1.4. Materiales de Laboratorio

- Un balón de vidrio de 250 ml un vaso becker de 100 ml, una probeta de 100 ml, portaobjetos y cubreobjetos.
- Pipetas de plástico de (1,0 ml y 10 ml), placa de Petri con cuadrícula 1x1 cm, una probeta de 1 L.
- Una pinza, aguja y un Bisturí de disección.
- Hidróxido de potasio (KOH al 10%), Peróxido de hidrógeno alcalinizado, Ácido Clorhídrico (HCl al 1%), Azul de tripano (al 0.05% en solución de glicerol), Glicerol y Alcohol etílico (99%), Ácido sulfúrico, Kit de determinación de nitrógeno, Kit de determinación de fósforo, Kit de determinación de potasio, solución hidropónica La Molina®.

2.1.5. Equipos

- Estereoscopio Labor Tech NHSMCO-LTD ZTX-20W, Microscopio PRIMO STAR ZEISS, Baño maría modelo Kertlab Laboratory modelo Series CDK – 522, Equipo Soxhlet para extracción de aceites, pH metro portátil HANNA modelo HI 98103, Sensor de Humedad de marca Arduino modelo Higrómetro FC-28, Luxómetro digital portátil de la marca Duoyi de modelo Lx-1010b, Balanza de precisión de modelo Digital Precisión® de la marca ESJ200-4 y Horno tostador IMACO HE900.

2.1.6. Otros

- Mangueras para riego, fluorescentes, agua destilada, agua desionizada y pliegos de plásticos transparentes.

2.2. DISEÑO DE LA INVESTIGACIÓN

2.2.1. Área de Estudio

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ciencias Básicas de la Facultad de Ingeniería Ambiental de la sede de Huacho (Distrito de Végueta) y en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología, asimismo se usó el centro de investigación (invernáculo) de la sede Lima de la Universidad Católica Sedes Sapientiae, ubicada en Distrito de Los Olivos departamento de Lima, con coordenadas UTM-WGS84 274777.53E, 8672760.6N, como se muestra en la Figura 16.

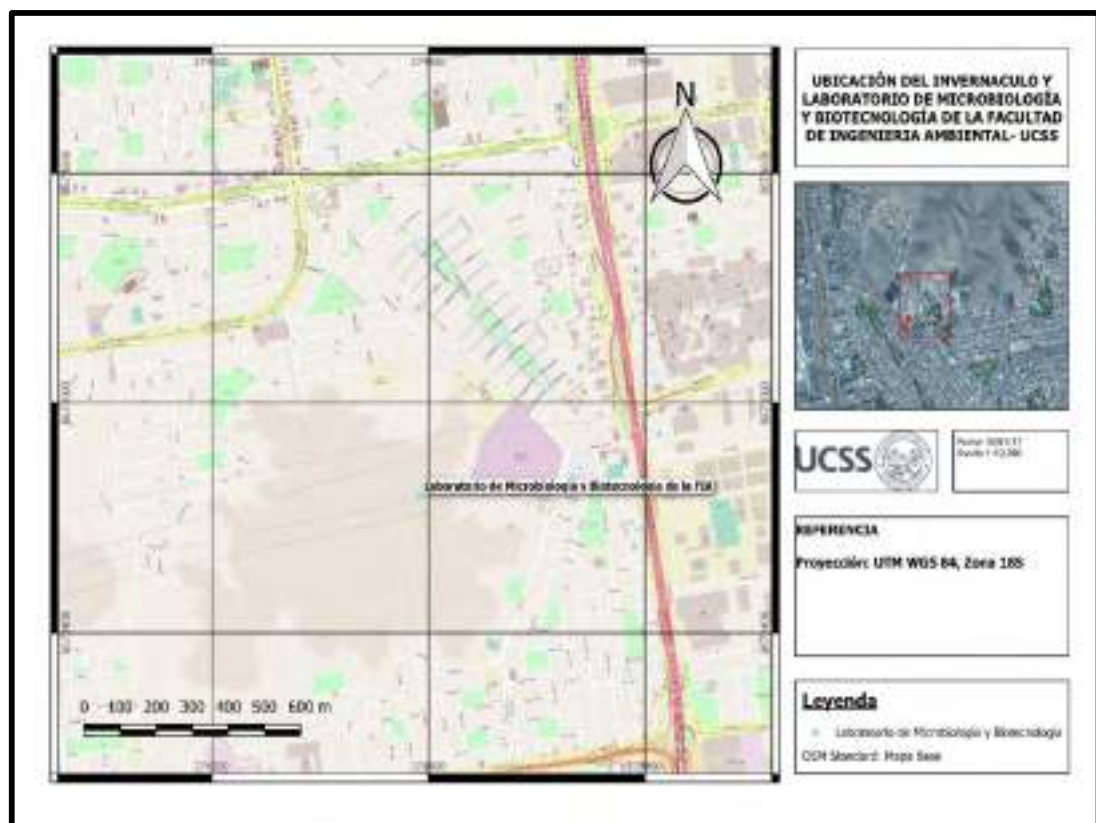


Figura 16. Localización de las instalaciones donde se desarrolló la investigación.

Fuente: Elaboración propia.

2.2.2. Descripción del experimento

La investigación se llevó a cabo en dos fases (campo y laboratorio).

- **Fase I:** La fase de campo consistió en el diseño y acondicionamiento del invernadero, seguido por la desinfección y selección de las semillas de frejol y maní, y posteriormente su germinación. Seguidamente, se preparó el material experimental, inoculando 1 g de petróleo crudo y el hongo micorrizico *R. intraradices* en dosis de 0; 2,5 y 5,0 g.kg⁻¹ a las muestras de suelo, distribuidas en seis tratamientos experimentales evaluados en dos periodos (60 y 90 días), con cuatro réplicas cada una, dando un total de 48 unidades experimentales. A los 15 días, se realizó el sembrado de las dos plantas y se dejaron desarrollar en dos periodos de evaluación (60 y 90 días). Finalmente, se midió los parámetros físicoquímicos periódicamente (altura de la planta, intensidad de luminosidad, pH, y humedad) y se recolectó las muestras de raíces y suelos (Figura 17).
- **Fase II:** La fase de laboratorio involucró la extracción del petróleo crudo por método Soxhlet en muestras de suelo. A su vez, se determinó la cantidad de micronutrientes por Kits- Test NPK, y finalmente se realizó el análisis de la colonización de micorriza en los tejidos de las raíces de las plantas de maní y frejol a los 60 y 90 días (Figura 18).

Finalmente, con los resultados obtenidos de los seis tratamientos experimentales, se procesó la data en el programa estadístico SPSS y STATISTICA, para determinar las siguientes variables dependientes (Tabla 10): el porcentaje de reducción de petróleo crudo (PC-1 %), porcentaje de colonización micorrizica sometida al 1% de petróleo crudo [% CM-1% PC], altura de la planta, concentración de N, concentración de P, concentración K.

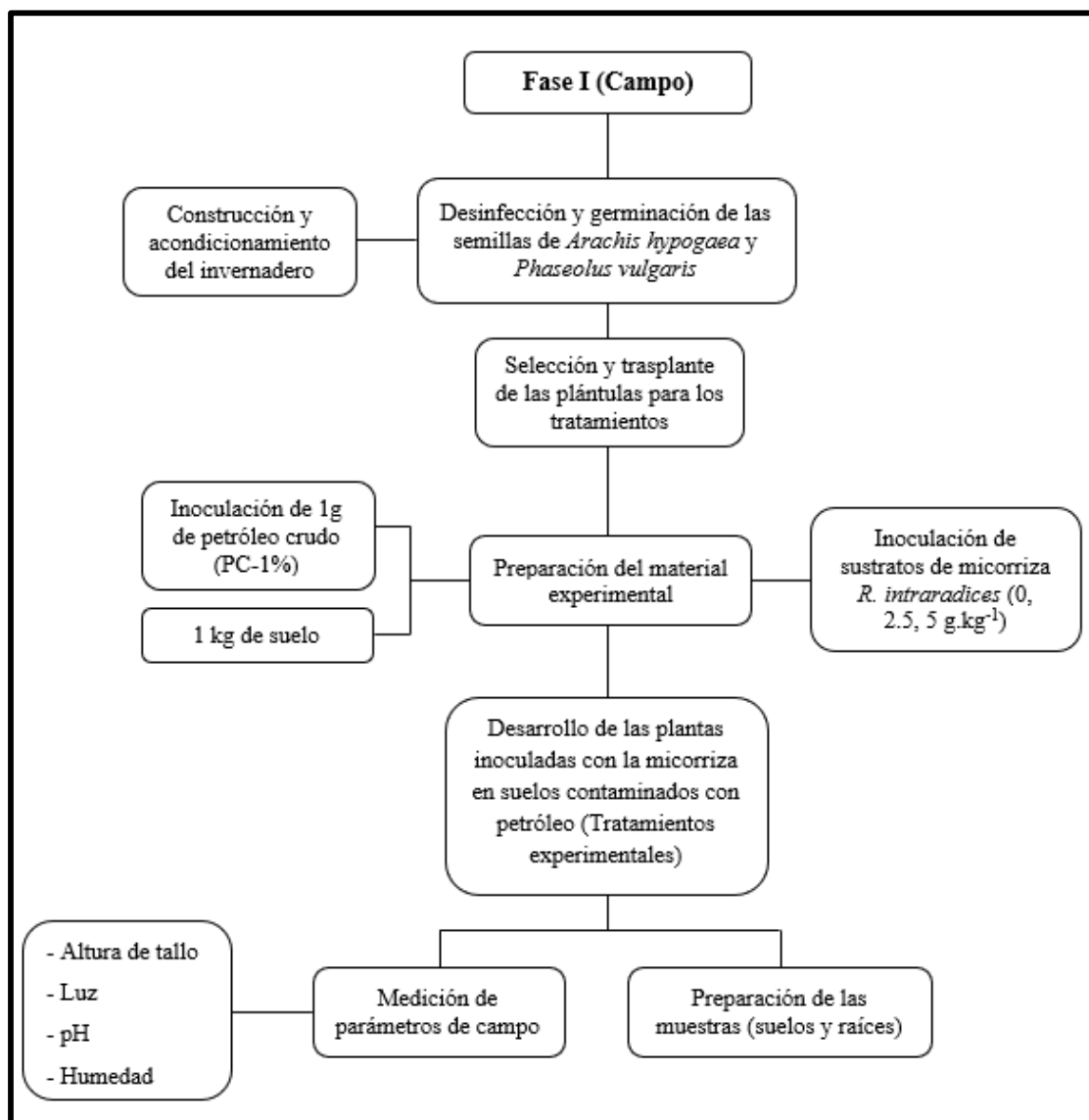


Figura 17. Diagrama de flujo de la fase de campo de la investigación.

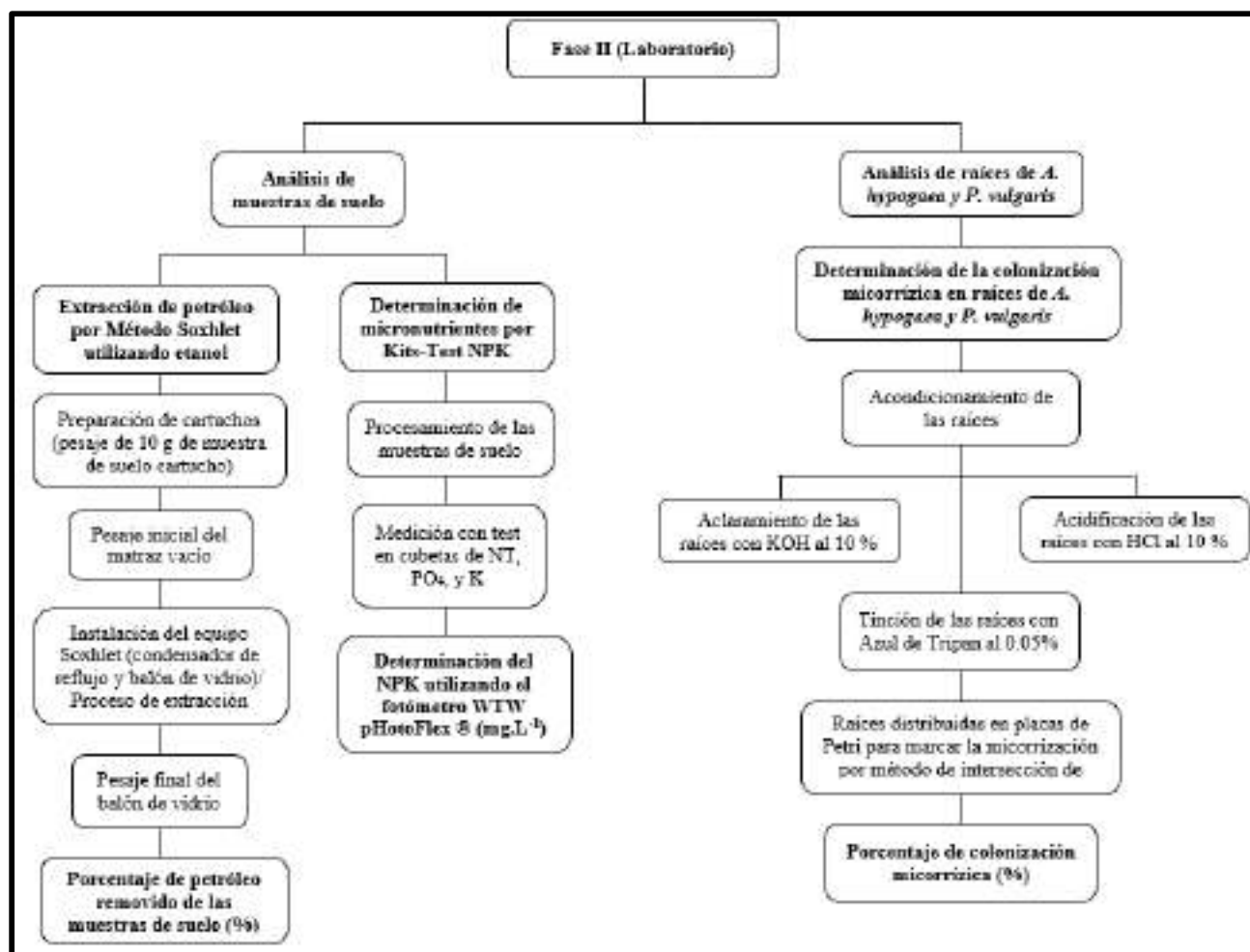


Figura 18. Diagrama de flujo de la fase de laboratorio. Porcentaje de remoción de petróleo crudo, análisis de los parámetros de NPK y porcentaje de colonización micorrizica.

2.2.3. Tratamientos experimentales

Los tratamientos fueron evaluados a los 60 y 90 días bajo a la mismas condiciones descritas en la Tabla 6 y Tabla 7, en cada tratamiento se consideraron cuatro replicas. El tratamiento uno (T1) estuvo formado por la planta de *Phaseolus vulgaris* más 1 kg de suelo contaminado con 1% de petróleo crudo. El tratamiento dos (T2), estuvo formado por la planta de *P. vulgaris* más el inoculo de 2,5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1%). El tercer tratamiento (T3), estuvo formado por la planta de *P. vulgaris* más el inoculo de 5,0 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminado con petróleo crudo (1%). El tratamiento cuatro (T4), estuvo formado por una planta de *Arachis hypogaea* más 1 kg de suelo contaminado con 1 % de petróleo crudo. El tratamiento cinco (T5), estuvo constituido por una planta de *A. hypogaea* más el inoculo de 2.5 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1 %). El sexto tratamiento (T6), estuvo formado por una planta de *A. hypogaea* más el inoculo de 5,0 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1 %) (Figura 19).

Tabla 6

Tratamientos experimentales y sus respectivas dosis

Tratamientos	Leguminosa + Dosis + PC-1% + Periodo
T1	<i>Pv</i> + PC-1% + 60 días
T1	<i>Pv</i> + PC-1% + 90 días
T2	<i>Pv</i> + <i>Ri</i> (2,5 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 60 días
T2	<i>Pv</i> + <i>Ri</i> (2,5 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 90 días
T3	<i>Pv</i> + <i>Ri</i> (5,0 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 60 días
T3	<i>Pv</i> + <i>Ri</i> (5,0 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 90 días
T4	<i>Ah</i> + PC-1% + 60 días
T4	<i>Ah</i> + PC-1% + 90 días
T5	<i>Ah</i> + <i>Ri</i> (2,5 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 60 días
T5	<i>Ah</i> + <i>Ri</i> (2,5 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 90 días
T6	<i>Ah</i> + <i>Ri</i> (5,0 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 60 días
T6	<i>Ah</i> + <i>Ri</i> (5,0 g.kg ⁻¹) + PC-1% + 90 días

Fuente: Elaboración propia.

**Pv*: *Phaseolus vulgaris* “frejol”, *Ri*: *Rhizophagus intraradices* “Hongo Micorrizico Arbuscular”, *Ah*: *Arachis hypogaea*: *Ah*.”mani”. PC-1%: Petroleo crudo al 1%.



Figura 19. A. Tratamientos experimentales en el invernadero. Las macetas conteniendo los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5, T6, y sus respectivas repeticiones se ubicaron aleatoriamente.

Tabla 7

Condiciones de invernadero para los tratamientos

Condiciones de invernadero	Descripción
Duración del ensayo	60 y 90 días
Temperatura Ambiente	25 – 28 °C
Intensidad de luminosidad	1000 – 1200 lux
Humedad de Ambiente	65– 70 %
Fotoperiodo	11 h con Luz y 13 h en oscuridad.
N° de réplicas	4

Fuente: Elaboración de propia.

2.2.4. Diseño estadístico del experimento

Se usó un diseño completo al azar (DCA), empleando seis tratamientos. El tratamiento uno (T1) estuvo conformado por la planta de *Phaseolus vulgaris* más 1 kg de suelo contaminado con 1% de petróleo crudo. El tratamiento dos (T2) estuvo

conformado por la planta de *P. vulgaris* más el inoculo de 2,5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1%). El tercer tratamiento estuvo conformado por la planta de *P. vulgaris* más el inoculo de 5,0 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminado con petróleo crudo (1%). El tratamiento cuatro (T4), estuvo conformado por una planta de *Arachis hypogaea* más 1 kg de suelo contaminado con 1 % de petróleo crudo. El tratamiento cinco (T5), estuvo constituido por una planta de *A. hypogaea* más el inoculo de 2.5 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1 %). Por último, el sexto tratamiento (T6), estuvo conformado por una planta de *A. hypogaea* más el inoculo de 5,0 g.kg⁻¹ de *R. intraradices*/kg de suelo contaminados con petróleo crudo (1 %). Los tratamientos control fueron T1 y T4 sin inoculo de *R. intraradices*.

2.2.5. Unidades Experimentales

En la investigación se consideraron 48 unidades experimentales (Figura 20), cada maceta experimental estuvo conformada por una planta más un 1 kg de suelo contaminado con 1 % de petróleo crudo, evaluadas a los 60 y 90 días.



Figura 20. Se observa las 48 unidades experimentales a condiciones de invernadero.

2.2.6. Desarrollo experimental e identificación de variables y su mensuración

Las variables analizadas en la presente investigación se observan en la Tabla 8 y Tabla 9:

Tabla 8

Variables, unidades de medida y métodos de análisis

Variables	Unidad	Metodología
Reducción de petróleo crudo en el suelo	%	Extracción Soxhlet
Colonización micorrizica	%	Técnica de interceptos
Altura de la planta	cm	Escalímetro
pH del suelo	Unidades de pH	Potenciómetro
Fósforo	ppm	Fotométrico
Nitrógeno	ppm	Fotométrico
Potasio	ppm	Fotométrico

Fuente: Elaboración propia.

*CM: Colonización micorrizica, PC: Petróleo crudo

Tabla 9.

Variables independientes

Variables	Descripción
Tipo de planta	“frejol” y “maní”
Tipo de suelo	Franco arenoso
Concentración de PC	1 g.kg ⁻¹
Dosis de micorrizas	0 g.kg ⁻¹ ; 2,5 g.kg ⁻¹ ; 5,0 g.kg ⁻¹

Fuente: Elaboración propia.

PC: Petróleo crudo

a. Fase de campo de la toma de muestras de raíces y suelos de los tratamientos

- Diseño y acondicionamiento del invernadero

Para la construcción del invernadero se tuvieron en cuenta las siguientes especificaciones: Dimensiones de la base (3 m x 2 m), y elevación del invernadero desde la base teniendo una estructura de (80 cm de altura, 2 m de ancho y 3 m de largo), siendo sellada con una malla raschel y plástico de polietileno transparente genérico. Asimismo, se ubicaron cuatro fuentes lumínicas conectadas a un timer digital blanco Modelo T-digi din 201 marca Completel para el encendido y apagado automático del invernadero, los cuales fueron ubicados a 80 cm de la base utilizando el techo como soporte, los fluorescentes estuvieron separados linealmente en 40 cm y paralelamente en 70 cm. Adicionalmente, se incorporó un sistema de riego por goteo a gravedad, cuya capacidad fue de 20 L, el sistema se distribuyó a lo largo de todo el invernadero, a través de mangueras de PVC que se separaron en seis líneas de riego, compuesto de un gotero ajustable y una llave de mariposa para el control del flujo de la salida de agua hacia las macetas, como se observa en la Figura 21.



Figura 21. Diseño del invernadero para las unidades experimentales.

- Desinfección de las semillas de plantas de *Phaseolus vulgaris* “frejol” y *Arachis hypogaea* “maní”

Las semillas de *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* se desinfectaron por inmersión en alcohol al 70 % durante un minuto, posteriormente se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10 % durante quince minutos (Pineda, 2004). Finalmente, las semillas se enjuagaron ocho veces con agua destilada estéril, tal como se evidencia en la Figura 22.

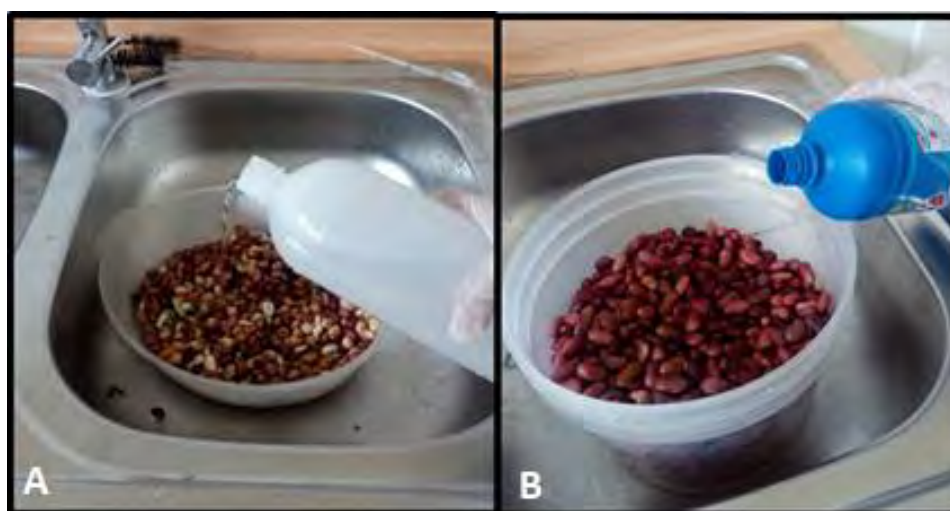


Figura 22. A: Lavado y desinfección de semillas de “maní”. B: Lavado y desinfección de semillas de “frejol”.

- Germinación de la semilla de *Phaseolus vulgaris* “frejol” y *Arachis hypogaea* “maní”

Una vez desinfectadas las semillas, se seleccionaron aquellas que presentaron las mejores condiciones para ser sembradas en los sustratos, el cual estaba constituido por una mezcla de: 60 % de compost orgánico, 20 % de vermiculita y 20 % perla agrícola, con la finalidad de acelerar la germinación de las semillas. Se sembraron en bandejas de germinación de 38.5 x 51.5 x 10 cm de polietileno de alta densidad y con perforaciones de una pulgada para el drenaje y aireación, necesarias para retener la humedad del suelo y promover un óptimo crecimiento de las semillas.

Las semillas del *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* se mantuvieron húmedas utilizando agua destilada estéril y permanecieron en condiciones semicontroladas de invernadero (23-25 °C, 75 % de humedad y una intensidad lumínica de 600 lux) hasta que las plántulas manifestaron el primer par de hojas verdaderas. En el caso del *P. vulgaris*, las primeras hojas verdaderas se presentaron a los ocho días, mientras que, las semillas de *A. hypogaea* se presentaron a los 15 días de germinación (Figura 23).

Las plántulas se desarrollaron normalmente en el semillero, hasta que alcanzaron un porcentaje de germinación al 100 %, y posteriormente se procedió al trasplante hacia las macetas experimentales (Pineda, 2004).

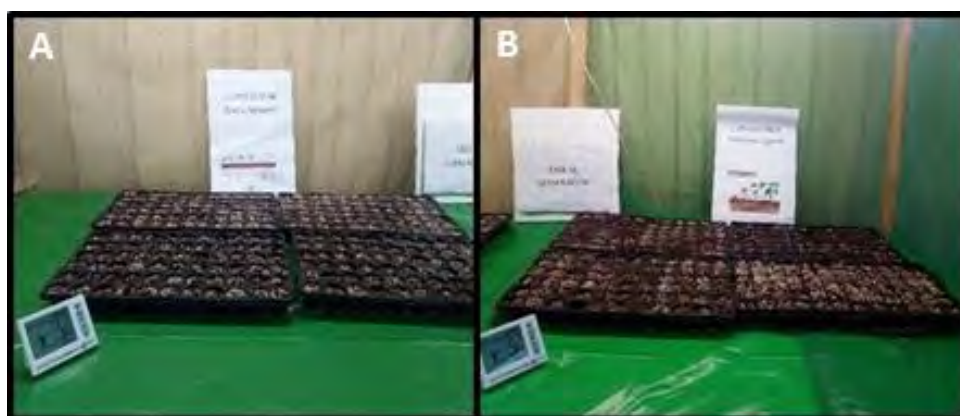


Figura 23. A: Bandejas de germinación con semillas de *Arachis hypogaea* “maní”. B: Bandejas de germinación con semillas de *Phaseolus vulgaris* “frejol”.

- Preparación del suelo experimental

El suelo experimental que se utilizó en las macetas fue obtenida de la empresa San Fernando marca MALKI destinado para uso de jardinería y de acuerdo a la caracterización inicial, el suelo presentó las siguientes características descritas en la Tabla 10 y Apéndice 1. Posteriormente, se sometió a un proceso de esterilización mediante la técnica de calor seco a condiciones de 80 °C a 20 – 30 min. Antes del trasplante (Aguirre-Buenaño, 2013) (Figura 24).



Figura 24. Esterilización del suelo mediante la técnica de calor seco.

Tabla 10

Características fisicoquímicas del suelo experimental

Característica	Valor	Interpretación
pH	7.48	Ligeramente alcalino
Conductividad eléctrica (dS.m ⁻¹)	4.22	Moderadamente salino
Calcio soluble (meq/100 g)	9.51	-
Magnesio soluble (meq/100 g)	3.10	-
Potasio soluble (meq/100 g)	2.34	-
Porcentaje de Sodio intercambiable (meq/100 g)	1.05	-
Carbonatos totales (CaCO ₃ , %)	3.40	-
Materia orgánica (%)	9.36	Alto
Nitrógeno total (%)	0.26	Moderadamente alto
Fosforo disponible (mg/kg)	403.6	Alto
Potasio disponible (mg/kg)	3180	Alto
Arena (%)	58	-
Limo (%)	24	-
Arcilla (%)	18	-
Clase textura		Franco – arenoso

Fuente: Elaboración propia/Apéndice 1.

Según la Tabla 11, el material experimental estuvo conformado por 1 kg de suelo, que fue agregado en macetas de plásticos de 1 kg de capacidad, con dimensiones de 14 cm de diámetro y 12 cm de alto, de esta manera se obtuvo una equivalencia de 1 kg de suelo/maceta, obteniendo 48 macetas experimentales. Posteriormente, con ayuda de una pipeta se agregó en cada maceta 1 g de petróleo crudo, utilizando una cantidad total de 48 g de petróleo crudo para la totalidad de los tratamientos del experimento (Tabla 12 y Figura 25) (Liu et al., 2004). Cabe indicar, que la muestra de petróleo crudo proviene de la Planta “Refinería Talara” estación corvina (Apéndice 2) y tiene las siguientes características fisicoquímicas evidenciadas en la Tabla 13.

Tabla 11

Preparación del material experimental

Preparación suelo experimental	Descripción
Maceta	Dimensiones (14 cm de diámetro y 12 cm de alto).
Suelo	1 kg
Petróleo	1 g
Equivalencia	1 kg de suelo contaminados + 1 g de crudo de petróleo/ maceta
Cantidad	48 macetas experimentales

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 12

Cantidad total de los sustratos contaminados con petróleo

Ítem	Petróleo Crudo (g)	Sustrato de Tierra (kg)	concentración (g.kg⁻¹)
Sustrato	1	1	1

Fuente: (Joner et al., 2001; Joner & Leyval, 2001; Liu et al., 2004).

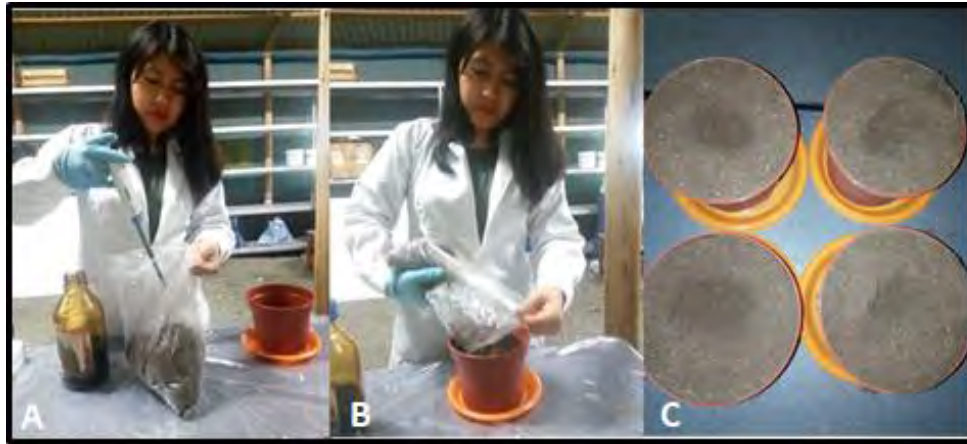


Figura 25. A. Inoculación de 1 g de petróleo crudo. B. Adición de 1 kg del suelo experimental. C. Suelo experimental.

Tabla 13

Caracterización fisicoquímica del petróleo crudo

Propiedades	Descripción
Procedencia	Zona Norte Corvina
Gravedad API	23.2
Gravedad específica	0.9147
BSW %	0.05
Viscosidad cinemática (cSt. @ 122°F)	11.7
Contenido de Azufre (%m/m)	0.20

Fuente: (Almora,2014)

Nota: La muestra de petróleo crudo presenta predominancia en compuestos de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.

- Trasplante de las plantas a los tratamientos y a las condiciones normales

Las plántulas para los tratamientos experimentales fueron seleccionadas basándose en sus características similares, tamaño, diámetro, color y número de hojas. Luego de la selección se trasplantaron a las macetas de plástico que contenían el suelo experimental, según lo descrito por (Pineda-Hernández, 2004).

- Inoculación de hongo micorrízico-arbusculares en los tratamientos y condiciones normales

Se utilizó como hongo micorrízico arbuscular a la especie *Rhizophagus intraradices* obtenida de la empresa Agromat EIRL, mediante la presentación de sustrato inerte de Arcilla expandida de la marca MYCOSYM TRI-TON® (Apéndice 2). Al momento del trasplante, se distribuyeron las dosis de micorrizas en las siguientes cantidades (0; 2,5 y 5 g·kg⁻¹ de suelo) en los seis tratamiento con cuatro repeticiones de cada especie (Tabla 14) (Ortiz-Cano et al., 2009).

Tabla 14

Distribución de las dosis de micorrizas en los tratamientos experimentales

Leguminosa	Dosis de <i>R. intraradices</i>	Periodo	N° macetas/dosis	N° total de macetas
<i>Phaseolus vulgaris</i>	0 g·kg ⁻¹	60	4	24
	0 g·kg ⁻¹	90	4	
	2,5 g·kg ⁻¹	60	4	
	2,5 g·kg ⁻¹	90	4	
	5,0 g·kg ⁻¹	60	4	
	5,0 g·kg ⁻¹	90	4	
	0 g·kg ⁻¹	60	4	
	0 g·kg ⁻¹	90	4	
	2,5 g·kg ⁻¹	60	4	
	2,5 g·kg ⁻¹	90	4	
<i>Arachis hypogaea</i>	5,0 g·kg ⁻¹	60	4	24
	5,0 g·kg ⁻¹	90	4	
	0 g·kg ⁻¹	60	4	
	0 g·kg ⁻¹	90	4	

Fuente: Elaboración propia.

El sustrato de arcilla de la *Rhizophagus intraradices* se distribuyó y se agregó alrededor de las raíces de la *P. vulgaris* y *A. hypogaea* a una distancia de entre 1 y 2 cm, y una profundidad de 5 cm (Figura 26).



Figura 26: Inoculación de la *Rhizophagus intraradices* en las macetas experimentales.

Fuente: Micozim (2014).

Las unidades experimentales se mantuvieron en condiciones de invernadero, con una temperatura que osciló entre 25 y 28 °C, la humedad ambiental entre 65 y 70% y una luminosidad de 1200 lux.; todo esto en intervalos de tiempo de 60 y 90 días. Las plantas se regaron por medio de un sistema de riego por goteo y se aplicó solución hidropónica La Molina © solución simple A (Nitrato de potasio, Nitrato de Amonio y superfosfato triple) y solución simple B (Sulfato de Magnesio, Hierro y solución de micronutrientes) según requiriera.

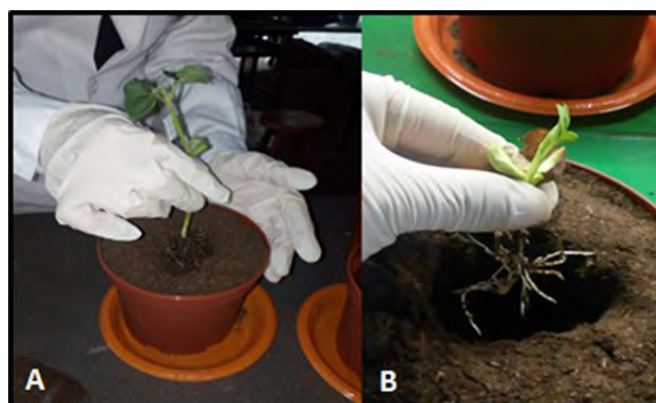


Figura 27. A: Trasplante de las plantas de *Phaseolus vulgaris*. B. Trasplante de plantas de *Arachis hypogaea*.

- Medición de los parámetros fisicoquímicos del suelo

- Medición del potencial hidrógeno (pH) en los tratamientos

El potencial hidrógeno, se evaluó cada dos semanas, mediante un procedimiento estandarizado que consistió en la dilución homogénea de 1 g de suelo de cada tratamiento en 10 ml de agua des ionizada mezclado dentro de un vaso beaker de 50 ml al cual se le introdujo un pH metro portátil marca HANNA modelo (HI 98103) debidamente calibrado, tal como se observa en la Figura 28. Se registraron los valores indicados por el equipo de medición de pH, si el valor registrado no variaba por el lapso de 10 s. Se lavó el sensor con agua destilada entre cada medición de pH. La calibración del pH-metro se realizó con soluciones buffer de pH 4 y de pH 7 (karma, 1993).



Figura 28. Medida de pH en el suelo de cada tratamiento.

- Medición de Humedad en los tratamientos

La humedad se registró interdiariamente para controlar la frecuencia de riego, para cada tratamiento y sus respectivas replicas, para ello se empleó un sensor de marca Arduino modelo Higrómetro FC-28, y se procedió a introducir el sensor de medición

en la muestra de suelo, a una profundidad de 10 cm por un lapso de 10 segundos hasta estabilizarse y evitar la variación de datos. La data registrada se visualizó mediante un programa para sistema operativo *Windows* denominado *Arduino 1.8.4* y se registró el resultado (Figura 29).



Figura 29. Medición de la humedad en el suelo.

- Medición de la intensidad lumínica

Para la medición de la intensidad de luz en el invernadero, se utilizó un luxómetro digital portátil de la marca Duoyi de modelo Lx- 1010b. Se procedió a ubicar el sensor a la altura de las plantas de cada tratamiento y de manera perpendicular a la fuente de luz, se esperó a que se estabilice y finalmente se registró el resultado (Figura 30).



Figura 30. Medida de intensidad lumínica.

- Medición de la altura de las plantas fabáceas en los tratamientos experimentales

Cada dos semanas se llevó a cabo el registro del crecimiento de las plántulas para los tratamientos inoculados y no inoculados mediante una regla milimétrica, se consideró la altura tomando como referencia desde la base de la planta hasta las hojas (Díaz-Martínez, Alarcón, Ferrera-Cerrato, Almaraz-Suarez y García-Barradas, 2013). El resultado obtenido se expresó en centímetros de planta (Figura 31).



Figura 31. A. Medición de la altura de la planta de *A. hypogaea*. B. Medición de la altura de la planta de *P. vulgaris*.

- Preparación y análisis de muestras

Para la toma de muestras de los análisis respectivos, se tuvo la siguiente consideración: dos días antes de la recolección de las muestras, se detuvo el flujo del agua hacia las macetas, con la finalidad de evitar la dilución del petróleo crudo. Posteriormente, se extrajeron 10 g de muestras de suelo de cada tratamiento con y sin inóculo de *Rhizophagus intraradices* de cada planta. Finalmente, se etiquetaron y se guardaron en bolsas de plástico hasta su procesamiento (Figura 32). Para determinar la concentración de hidrocarburos totales de petróleo se empleó el método Soxhlet, tomando como referencia el método 3540C de la US EPA (1996).

Para el análisis de la colonización micorrizica se extrajeron cuidadosamente las raíces de cada uno de los tratamientos con *Rhizophagus intraradices*, para luego ser empaquetados en bolsas de plástico para su análisis en el laboratorio (Figura 33).



Figura 32. A. Recolección de las muestras de suelo de cada tratamiento. B. Almacenamiento de las muestras de suelo.



Figura 33. A. Recolección de las raíces de las plantas *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*. B. Muestras de las raíces de los tratamientos con inoculo.

b. Fase de laboratorio de análisis de muestras de suelo y raíces de los tratamientos

- Determinar la reducción de petróleo crudo después del tratamiento con las plantas inoculadas y no inoculadas con el hongo micorrizico arbuscular *Rhizophagus intraradices* expresado en porcentaje:

Se tomaron 10 g de muestra de suelo de cada tratamiento y se determinó el porcentaje de crudo de petróleo removido en el suelo a los 60 y 90 días de evaluación. El análisis se realizó por medio del método de extracción sólido-líquido con equipo Soxhlet según (EPA, 1996). Las muestras se prepararon pesando 10 g del suelo de cada tratamiento en una balanza de precisión de modelo Digital Precisión® de la marca (ESJ200-4), posteriormente se encapsularon en cartuchos elaborados a base de papel filtro y fueron rotulados respectivamente. Seguidamente, cada muestra se colocó en un condensador a reflujo, mientras que en la parte inferior se colocó un balón de vidrio (obteniendo su peso inicial previamente en la balanza de precisión) que contenía etanol como solvente, el cual se sometió a calor constante, por medio de una estufa hasta que

el solvente alcanzó su punto de ebullición de 78.4 °C y el vapor del solvente ascendió al tubo condensador, haciendo que la muestra y el solvente hagan contacto, con la finalidad de que el analito se deposite en un balón de vidrio. El proceso se realizó en serie y se repitió hasta que el solvente no presentó ningún rastro del analito en el tubo condensador, dando por finalizado el proceso de extracción (Figura 34). Posteriormente, para la obtención del valor del petróleo extraído, se evaporó todo el solvente para obtener el peso final del balón de vidrio y se comparó con el peso inicial del balón vacío. Finalmente, se expresó mediante la siguiente fórmula (EPA, 1996):

$$PC (\%) = \frac{m_2 - m_1}{M} \times 100$$

En donde:

PC: Petróleo crudo extraíble en el suelo (%).

m_1 : masa en g del matraz vacío (g).

m_2 : masa en g del matraz con petróleo tras el secado (g).

M: Masa de la muestra en gramos (g).



Figura 34. A: Pesaje de las muestras de cada tratamiento. B: Cartuchos de cada muestra. C: Equipo Soxhlet.

De acuerdo a la cantidad inicial del petróleo crudo (PC) al 1% de contaminación artificial, se obtuvo el % de reducción de PC en el suelo en cada uno de los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días de evaluación, mediante la resta del valor inicial de la contaminación por petróleo crudo (1%), menos los valores obtenidos del Petróleo crudo (PC) extraídos en el suelo por el método Soxhlet (ver Apéndice 7) y en base a la cantidad inicial de PC, y finalmente multiplicado por cien se determinó el porcentaje de reducción de petróleo crudo, de acuerdo a la ecuación de Llanos (2012) (Tabla 17).

- Determinación de la colonización micorrízica en los tratamientos inoculados con la *Rhizophagus intraradices*

A partir de las muestras de raíces recolectadas de cada uno de los tratamientos inoculadas con *Rhizophagus intraradices*, se procedió a realizar el acondicionamiento de las raíces. Posteriormente, según Philips y Hayman (1970), se realizó la tinción con azul de tripano de las raíces de *P. vulgaris* y *A. hypogaea* para determinar la cuantificación de la colonización micorrízica mediante el método de intersección de líneas.

- Acondicionamiento de las raíces

Las raíces de *P. vulgaris* y *A. hypogaea* recolectadas de cada uno de los tratamientos se lavaron con agua corriente para eliminar todo rastro de suelo e impurezas, teniendo el cuidado necesario para no dañar las estructuras. Cabe resaltar que, se tomaron en cuenta raíces con características menores a un mm de diámetro, para facilitar el ingreso del azul de tripano (Figura 35).



Figura 35. A: Lavado de las raíces de las plantas fabáceas estudiadas. B: Selección de las raíces menores a 1 mm.

- Tinción de raíces para observar la colonización micorrízica

Se colocaron las raíces seleccionadas de cada tratamiento y sus respectivas replicas en tubos de ensayo de plástico con roscas de 15 ml, previamente etiquetadas, y se cubrieron con KOH al 10% de manera que se garantice el clareamiento homogéneo de las raíces (Philips y Hayman, 1970).

Posteriormente, los tubos conteniendo las raíces fueron llevadas a baño maría modelo Kertlab Laboraty (Series CDK-522) a una temperatura de 90 °C por una hora. Luego, se eliminó el KOH y se enjugaron las raíces con agua destilada, debido a que las raíces se encontraban con exceso de pigmentación, se sumergieron en agua oxigenada alcalinizada por un periodo de 10 a 30 minutos. A continuación, las raíces se enjugaron y se sumergieron en ácido clorhídrico (HCL) al 1 % durante cinco minutos, después se retiró el HCL del tubo de ensayo y finalmente se tiñeron las raíces en unas solución de glicerol acido con azul de tripano al 0.05 % a una temperatura de 90 °C por una hora a baño maría. Se mantuvieron las raíces en glicerol acidificado hasta su análisis (Figura 36). Finalmente, las raíces fueron llevadas a portaobjetos para luego ser evaluadas en un microscopio de disección (Philips y Hayman, 1970).

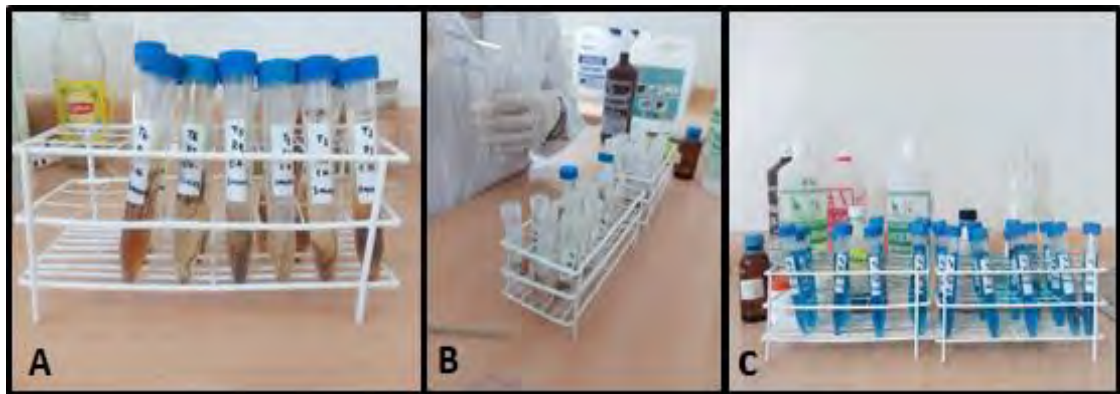


Figura 36. A. Aclaramiento de las raíces con KOH al 10%. B. Acidificación de las raíces al 10%. C. Tinción de las raíces con Azul de Tripán al 0.05%.

- Medición de la colonización micorrízica en los tratamientos

Se procedió a colocar las raíces teñidas de manera aleatoria en una placa de Petri cuadrada de 9 cm de diámetro con cuadrados de 1 x 1 cm, con la finalidad de realizar el conteo de micorrizas presentes en las muestras de las raíces de cada tratamiento a los 60 y 90 días. Seguidamente, se ubicó la placa de Petri bajo el microscopio de disección de modelo PRIMO STAR ZEISS, y se exploró las líneas horizontales y verticales de la cuadrícula, con la finalidad de contabilizar el número total de intersecciones de las raíces y las líneas de la cuadrícula, así como el número de intersecciones con raíces micorrizadas (Marsh, 1971) (Figura 37).

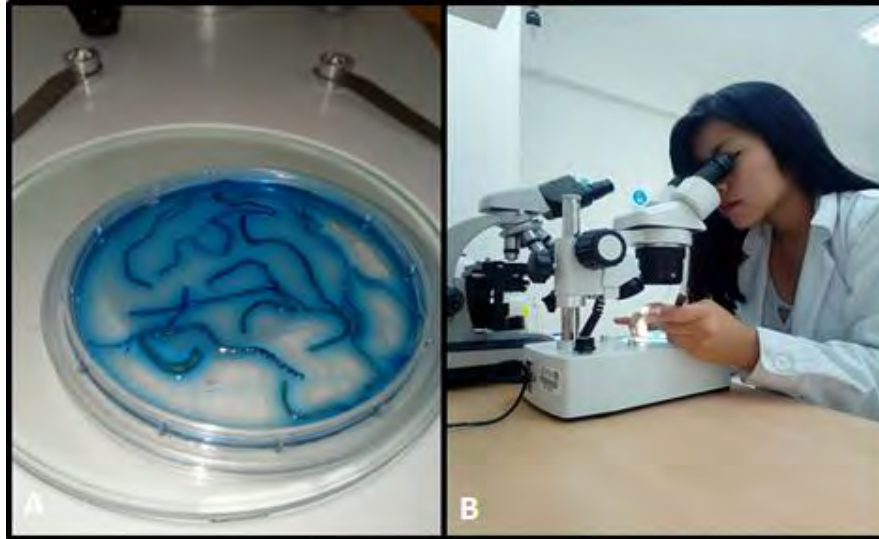


Figura 37. A. Raíces teñidas en placas Petri cuadrículas. B. Cuantificación de la presencia de simbiosis mediante el estereoscopio Labor Tech NHSMCO – LTD ZTX – 20W.

El conteo se inició en la primera línea horizontal y se contó las intersecciones entre raíces y líneas. Luego, se pasó a la siguiente línea y así sucesivamente, teniendo en cuenta de forma separa los segmentos que presentaron colonización y aquellos que no. Este proceso se aplicó de igual manera con las líneas verticales (Figura 38). Cabe indicar, que la longitud total de la raíz correspondió a la suma de intersecciones micorrizadas y no micorrizadas en la cuadrícula (Giovannetti y Mosse, 1980).

Para determinar el porcentaje de colonización micorrizica (% CM), se empleó el método de intersección de cuadrante (Giovannetti y Mosse, 1980), utilizando la siguiente formula:

$$\% \text{ CM} = \frac{\text{N}^\circ \text{ total de intersecciones con raíces micorrizadas}}{\text{Longitud total de raíz}} \times 100$$

En donde:

% CM: Porcentaje de colonización micorrizica.

N° total de intersecciones con raíces micorrizadas: Número total de raíces micorrizadas interceptadas con la línea vertical y la línea horizontal.

Longitud de raíz: Suma total de las intersecciones entre raíces micorrizadas y no micorrizadas, y las líneas de la cuadrícula.

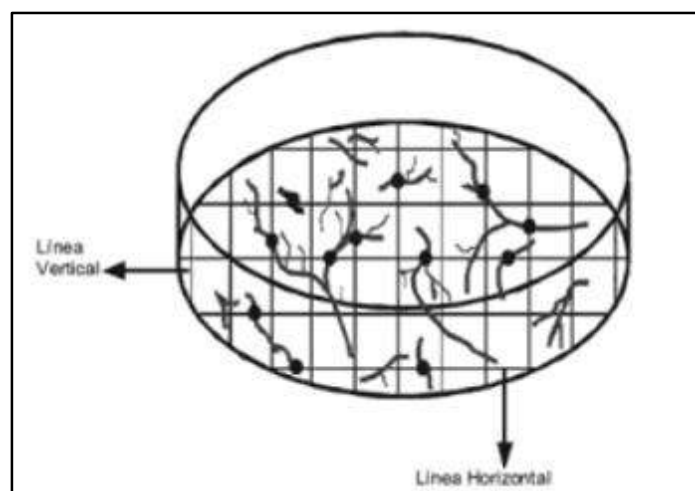


Figura 38. Raíces teñidas en caja Petri distribuidas aleatoriamente para marcar la micorrización por el método de intersección de líneas. *Fuente:* (Giovannetti y Mosse, 1980),

Para asegurar la confiabilidad de los resultados se obtuvo el valor del porcentaje de colonización micorrízica, considerándose lo siguiente: por cada replica se montaron cuatro portaobjetos con cinco segmentos de raíces de aproximadamente 1 cm de longitud. Se consideró positivo y se cuantificó como 1 al presentarse en los segmentos de cada placa las siguientes estructuras: arbuscúlos, esporas, hifas, vesículas (Figura 39).

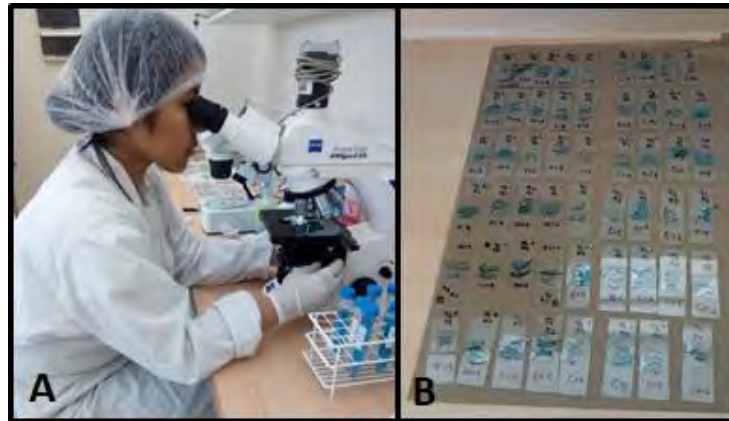


Figura 39. A. Conteo de la colonización mediante el Microscopio PRIMO STAR ZEISS. B. Réplicas de segmentos de raíces observadas.

c. Medición de nutrientes (NPK) en los tratamientos

La medición de la concentración de NT, $P0_4^{3-}$ y K se realizó a los 60 y 90 días para cada tratamiento, empleando el método fotométrico. Se inició con la digestión de las muestras de suelo, la cual consistió en extraer un gramo de suelo de cada tratamiento, previamente se procedió a realizar el lavado de la muestra con alcohol etílico (99%) para eliminar todo rastro de petróleo crudo. Luego, se depositó la muestra lavada de un gramo de suelo y se colocó en un frasco de vidrio de capacidad de 20 ml, se adicionó cinco ml de ácido sulfúrico y se completó lo restante con agua destilada, para su posterior digestión en un horno modelo IMACO (HE900) a una temperatura de 60 °C por una hora. Posteriormente, las muestras pasaron por un filtrado con el fin de obtener una muestra líquida transparente para su respectiva lectura. Después, se empleó el procedimiento establecido en el Test en cubetas nitrógeno total, fosfatos y potasio. La medición de estos parámetros se realizaron utilizando un fotómetro WTW pHotoFlex®, con una absorbancia de 575 nm para la lectura de estos elementos inorgánicos y los resultados se expresaron en $mg.L^{-1}$ (Figura 40).



Figura 40. Fotómetro pFotoFlex WTW. Se muestran los resultados de parámetros de la muestra de suelo de cada tratamiento. A. Resultado de NT (Nitrógeno Total), B. Resultado de P (Fósforo Total), C. Resultado de K (Potasio).

2.2.7. Análisis estadístico de datos

El análisis estadístico se realizó utilizando el programa estadístico *software* SPSS versión 24. Se empleó la prueba Tuckey para determinar diferencias significativas entre los tratamientos T1, T2, T3, T4, T5 y T6. Luego, se efectuó un análisis de varianza (ANOVA) al 5 % del nivel de significancia para cada variable experimental. Se realizó un análisis de los resultados obtenidos en el ANOVA, complementando la presentación de los resultados experimentales a través de tablas y gráficos, empleando el programa Excel versión 16.4

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. RESULTADOS

3.1.1. Determinación del porcentaje de colonización micorrizica sometidas al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1%) en los tratamientos experimentales

Con respecto a los porcentajes de colonización micorrizica sometidas al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1 %), la mayor CM-PC-1 % se presentó en el tratamiento T6, con la planta *Arachis hypogaea* en simbiosis con *Rhizophagus intraradices*; los valores promedios fueron de $34,14 \pm 0,54$ % y $38,79 \pm 0,34$ % en los 60 y 90 días de evaluación, respectivamente; mientras que la menor CM-PC-1% se presentó en el tratamiento T2 con la planta *Phaseolus vulgaris* en simbiosis con *R. intraradices*, presentando valores promedios de $6,97 \pm 0,95$ % y $17,92 \pm 0,71$ % tanto a los 60 y 90 días de evaluación, respectivamente. El valor máximo se registró en el tratamiento T6 con un valor promedio de $38,79 \pm 0,34$ % a los 90 días, mientras que el mínimo valor se reportó en el tratamiento T2, con un valor de $6,97 \pm 0,95$ % a los 60 días (Tabla 15). Los tratamientos T1 y T4 no presentaron inóculos de *R. intraradices* por lo que el porcentaje de CM fue de un valor de 0,00 %. En la Figura 41 y Figura 42 se puede evidenciar las estructuras micorrízicas de la *R. intraradices* en los tejidos de raíz de la *P. vulgaris* y *A. hypogaea*, respectivamente (Figura 43 y ver Apéndice 6).

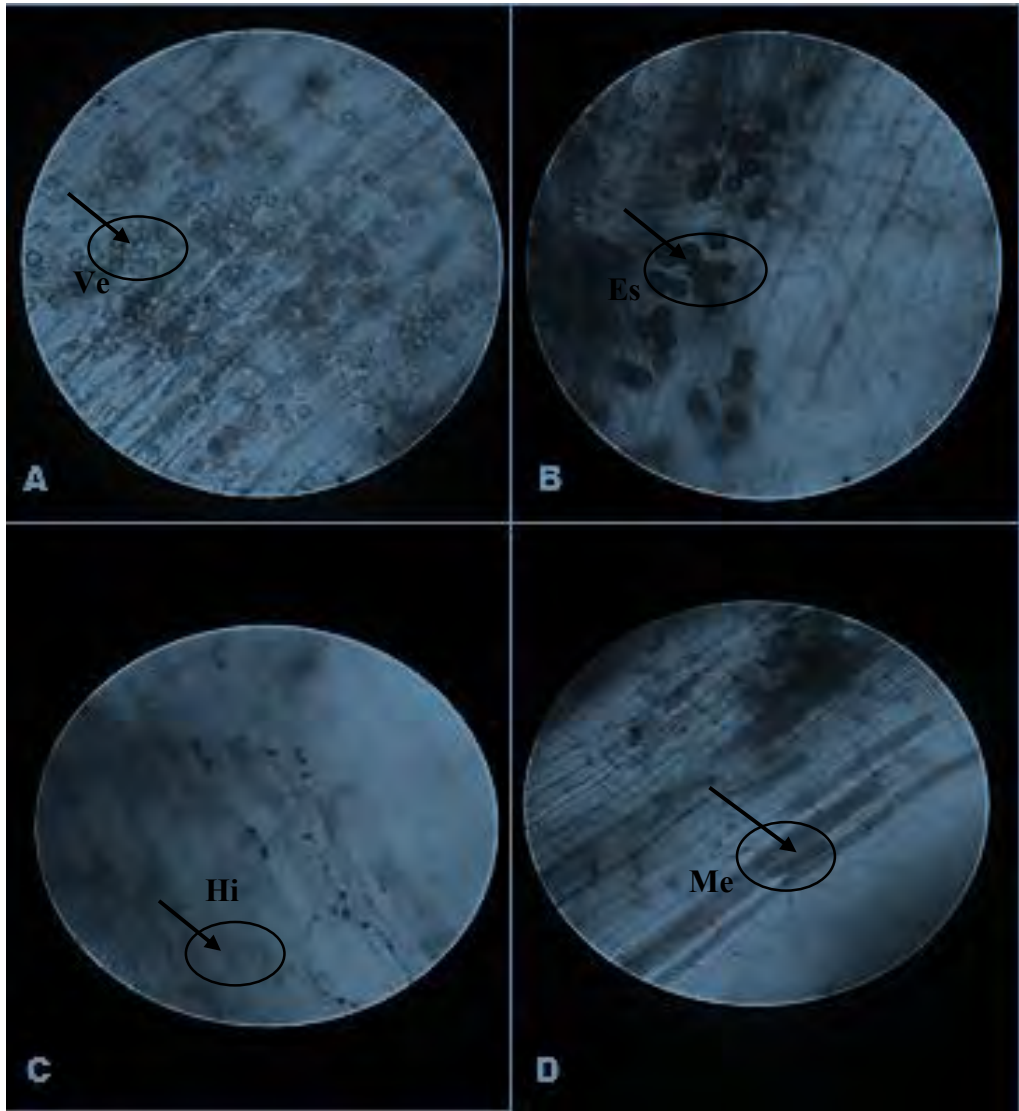


Figura 41. Fotografía al microscopio de la CM-PC-1 % de *Rhizophagus intraradices* en tejidos de raíz de la *Arachis hypogaea* L. A. Vesículas (Ve) [10X] B. Esporas (Es) [100X] C. Hifas intracelulares (Hi) [10X] D. Microesclereocios de endófitos septados (Me) [10X].

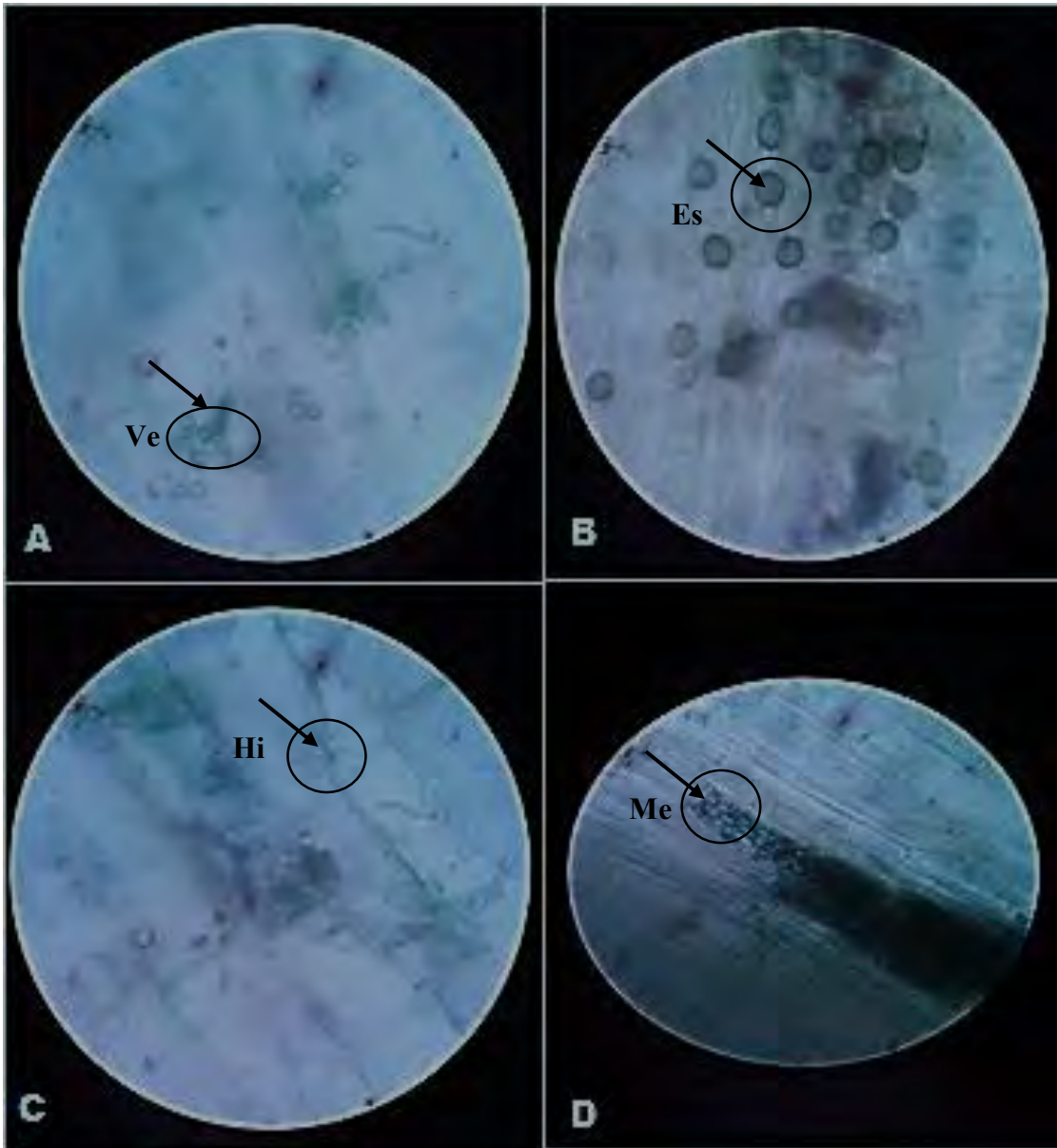


Figura 42. Fotografía de la CM-PC-1% de la *Rhizophagus intraradices* en tejidos de la raíz de la *Phaseolus vulgaris* (10X) A. Vesículas (Ve) [10X]. B. Esporas (Es) [100X]. C. Hifas intracelulares (Hi) [10X]. D. Microesclereocios de endófitos septados (Me) [40X]. *Fuente:* Elaboración propia.

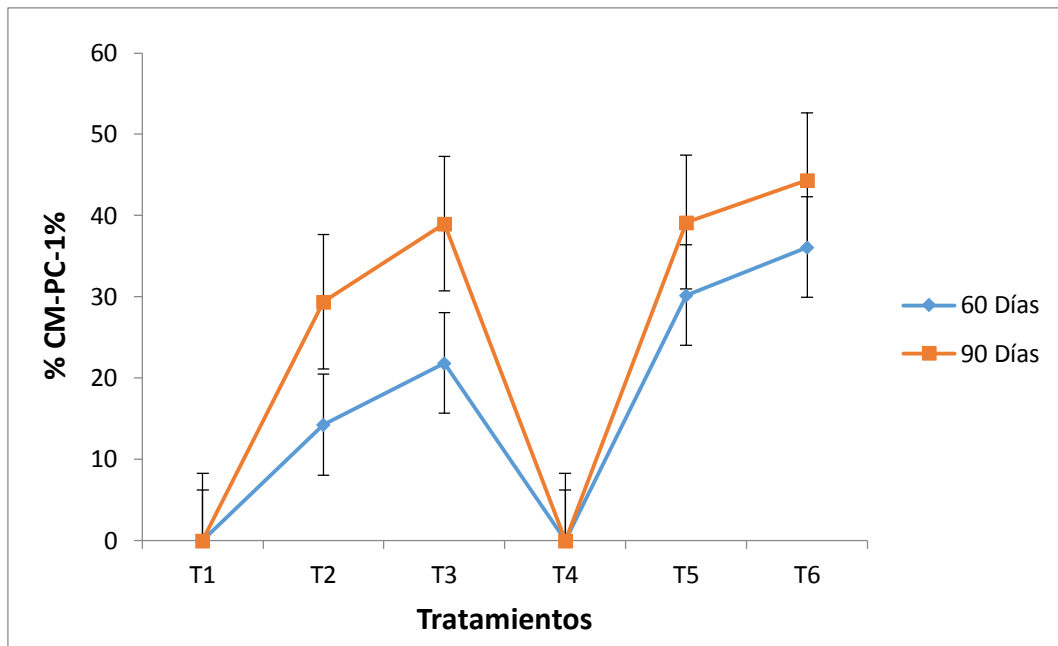


Figura 43. Resultados de los valores promedio del porcentaje de la CM-PC-1% de la *Rhizophagus intraradices* y las plantas de *Arachis hypogaea* y *Phaseolus vulgaris* evaluados a los 60 y 90 días.

Tabla 15

Valores promedios del porcentaje CM-PC-1% en los tratamientos a los 60 días y 90 días de evaluación. Los resultados son las medias de cuatro replicas y la desviación estándar (\pm DS)

Tratamiento	60 días	90 días
T1	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
T2	6,97 \pm 0,95	17,92 \pm 0,71
T3	16,45 \pm 0,43	27,02 \pm 0,71
T4	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
T5	24,80 \pm 0,85	34,96 \pm 0,48
T6	34,14 \pm 0,54	38,79 \pm 0,34

Fuente: Elaboración propia.

3.1.2. Determinación del porcentaje (%) de reducción de petróleo crudo al 1% (PC-1%) en los tratamientos experimentales

En el tratamiento T6, con la planta *Arachis hypogaea* en simbiosis con la *R. intraradices*, se observó la mayor reducción del porcentaje de petróleo crudo con un valor promedio de 86,00 % a los 90 días; mientras que la menor reducción de petróleo crudo al 1 % en el suelo (PC-1 %), fueron registrados en los tratamientos considerados como control, tratamientos T1 y T4, conformados por las plantas *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*, respectivamente (Tabla 16). Ambos tratamientos estuvieron sin inoculo de *R. intraradices*; registraron valores promedio de 24,52 % y 24,77 % respectivamente (Figura 44).

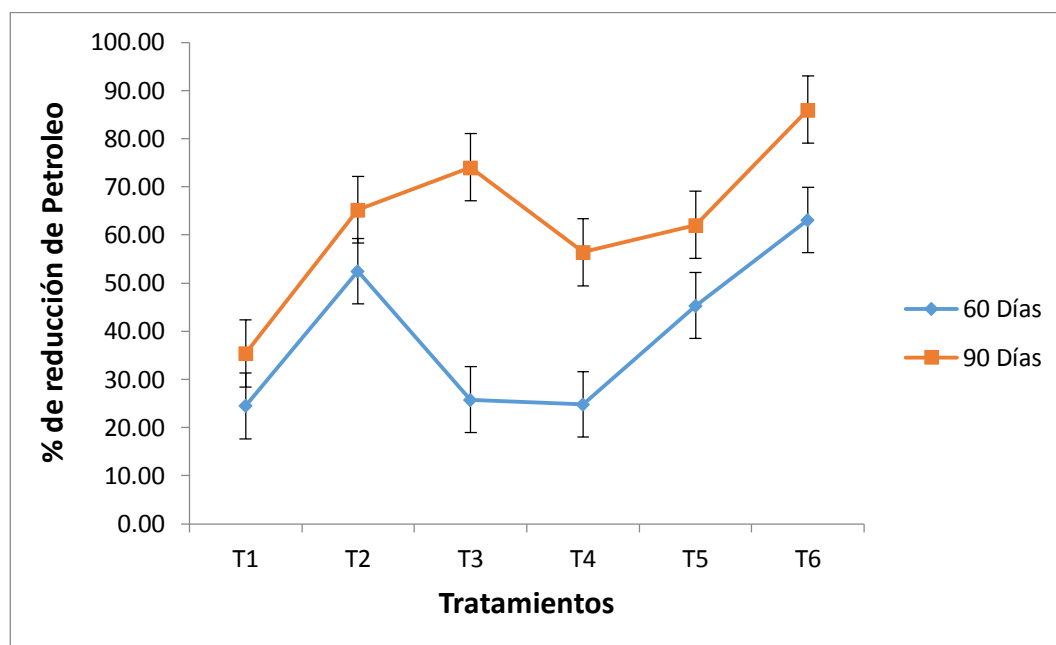


Figura 44. Resultados de los valores promedio del porcentaje de reducción de PC-1 % en los tratamientos experimentales evaluados en los dos periodos de 60 y 90 días.

Tabla 16

Porcentaje de reducción de petróleo crudo en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

Tratamiento	% de reducción de PC (60 días)	% de reducción de PC (90 días)
T1	24,52	35,42
T2	52,45	65,24
T3	52,80	74,05
T4	24,77	56,40
T5	45,35	62,10
T6	63,07	86,00

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que el porcentaje de crudo de petróleo removido frente a los dos periodos de evaluación (60 y 90 días), presentaron diferencias significativas con respecto a los tratamientos sometidos ($p = 0,000$) (Tabla 17). La prueba de Tukey evidencia que los tratamientos T1, T4, T5 y T6 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,000$) de las medias del porcentaje de reducción de PC-1 % en los dos periodos de evaluación, mientras que, se observó que no existe evidencia significativa en el porcentaje de reducción de petróleo crudo al 1 % (PC-1 %) entre los tratamientos T2 (*Phaseolus vulgaris* + 2,5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + 1 % de petróleo crudo) y T3 (*Phaseolus vulgaris* + 5,0 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1 %), ver Apéndice 7 y Apéndice 14.

Tabla 17

Análisis de la varianza del porcentaje de reducción de PC-1% en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos

ANOVA					
Porcentaje de reducción al 1 % (PC-1 %)					
Origen	Tipo II de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	1,543 ^a	12	,129	111,434	,000
Modelo corregido					
Intersección	5,580	1	5,580	4835,332	,000
Tratamientos	1,005	5	,201	174,195	,000
Periodos	,456	2	,228	197,472	,000
Tratamiento*	,060	5	,012	10,381	,000
Periodo					
Error	,040	35	,001		
Total	15,328	48			
Total corregida	1,584	47			

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3. Variación de los valores promedios de pH en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

Los resultados promedios y desviaciones estándar del pH registrado a los 60 y 90 días, muestran fluctuaciones, en donde se observó un pH mínimo de $8,12 \pm 0,04$ para el tratamiento T3 a los 60 días de evaluación, mientras que se registró un ligero incremento de pH de $8,66 \pm 0,12$ en el tratamiento T5 a los 90 días de evaluación (Tabla 18 y Figura 45).

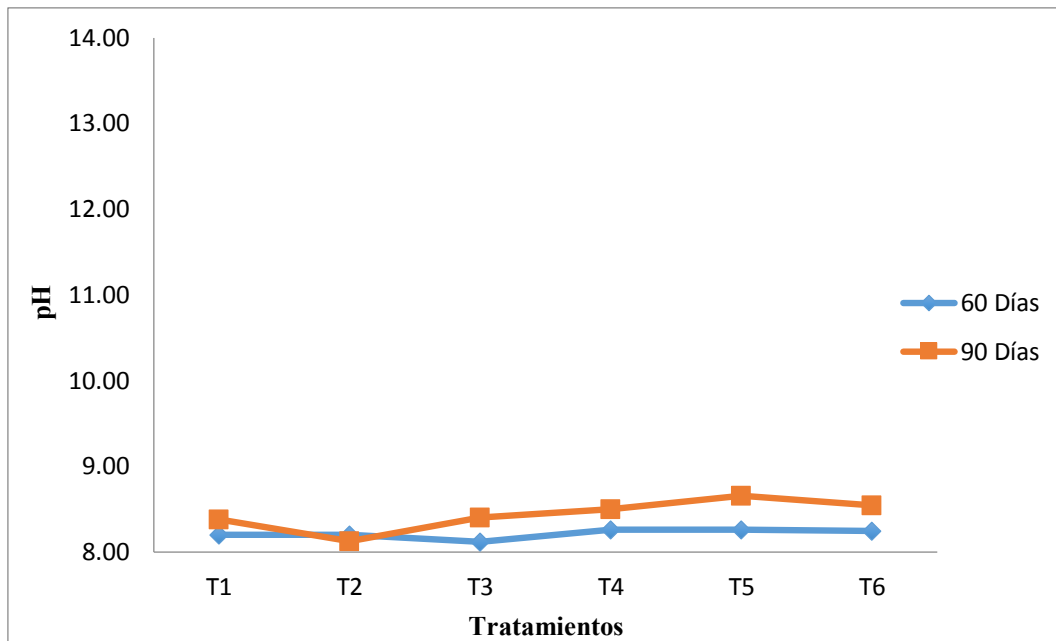


Figura 45. Resultados de los valores de pH en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tabla 18

Valores promedios de los resultados de pH y su desviación estándar ($\pm DS$) en los tratamientos a los 60 y 90 días de evaluación

Tratamiento	60 días	90 días
T1	8,20 \pm 0,05	8,39 \pm 0,123
T2	8,20 \pm 0,04	8,13 \pm 0,28
T3	8,12 \pm 0,04	8,41 \pm 0,10
T4	8,26 \pm 0,05	8,51 \pm 0,06
T5	8,26 \pm 0,09	8,66 \pm 0,12
T6	8,25 \pm 0,09	8,55 \pm 0,12

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la evaluación de los tratamientos experimentales frente al parámetro pH mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,009$). En lo que respecta a la evaluación por periodos a los 60 y 90 días frente a los tratamientos experimentales se observó que hay una influencia significativa con respecto al pH ($p = 0,000$), véase la Tabla 19 y Apéndice 10. Por otro

lado, el análisis del tratamiento y periodo evaluados a la vez no evidenciaron diferencias significativas ($p = 0,107$). La prueba de Tukey de la comparación de medias de los valores de pH en los tratamientos experimentales, mostró que el tratamiento T5 presentó diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,009$) respecto a las medias de pH de los demás tratamientos, siendo este tratamiento el que presentó la media más alta de pH alcanzando un valor de $8,66 \pm 0,018$. Asimismo, se observó que no existe evidencia estadísticamente significativa de las medias de pH entre los tratamientos T3 ($p = 0,16$) y T4 ($p = 0,090$) sean diferentes a los 60 días de evaluación. Finalmente, no se encontró diferencia estadísticamente significativa entre el tratamiento T2 ($p = 0,09$), tratamiento T3 ($p = 0,99$) y tratamiento T4 ($p = 0,928$), registrándose la media del valor de pH más baja en el tratamiento T2 con un pH de $8,13 \pm 0,36$ (ver Apéndice 15).

Tabla 19

Análisis de varianza del pH de los tratamientos de los dos periodos experimentales (60 y 90 días)

ANOVA					
pH					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig
Modelo corregido	1,318 ^a	11	,120	4,727	,000
Intersección	3328,169	1	3328,169	131306,690	,000
Tratamiento	,459	5	,092	3,620	,009
Periodo	,610	1	,610	24,057	,000
Tratamiento * Periodo	,249	5	,050	1,968	,107
Error	,912	36	,025		
Total	3330,399	48			
Total corregido	2,230	47			

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Variación de la concentración del nitrógeno total (NT) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

En la Figura 46 se muestra, que la mayor concentración en promedio de NT ($20,2 \pm 0,10 \text{ mg.L}^{-1}$) fue registrado en el tratamiento T3 a los 90 días, mientras que la menor concentración se evidenció en el tratamiento T2 con un valor promedio de $9,78 \pm 0,08 \text{ mg.L}^{-1}$ a los 60 días, tal como se presenta en la Tabla 20.

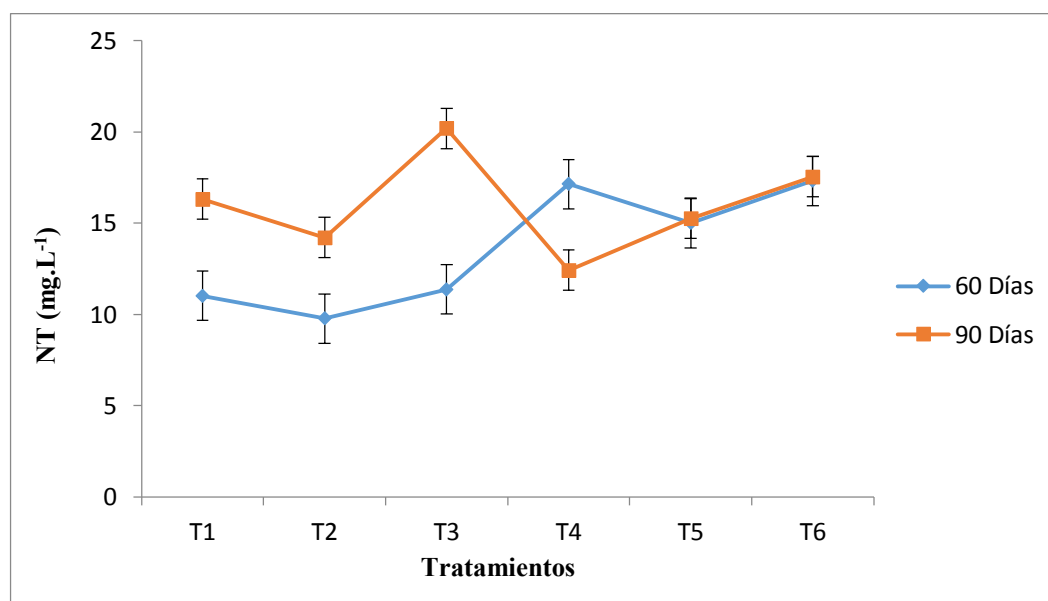


Figura 46. Resultados de los valores promedios de nitrógeno total (mg.L^{-1}) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tabla 20

Variación promedio de la concentración de nitrógeno total (NT) y sus desviaciones estándar ($\pm DS$) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

Tratamiento	60 días	90 días
T1	11,03 $\pm 0,09$	16,33 $\pm 0,28$
T2	9,78 $\pm 0,08$	14,23 $\pm 0,07$
T3	11,38 $\pm 0,37$	20,20 $\pm 0,10$
T4	17,15 $\pm 0,20$	12,43 $\pm 0,07$
T5	15,0 $\pm 0,05$	15,28 $\pm 0,038$
T6	17,33 $\pm 0,07$	17,55 $\pm 0,05$

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del Análisis de Varianza de una vía muestran que la concentración de Nitrógeno Total (NT), frente a los dos periodos de evaluación (60 y 90 días), presentaron efectos significativos en los 6 tratamientos sometidos ($p = 0,000$), véase la Tabla 21. La prueba de Tukey mostró que casi la totalidad de los tratamientos presentaron diferencias significativas ($p < 0,00$) en las medias de NT en los dos periodos de evaluación, siendo la media más alta de NT registrado en el tratamiento T6 (*A. hypogaea* + 5,0 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1 %) con un valor promedio de $17,55 \pm 0,05$ mg.L⁻¹. Mientras que, se observó que no existe evidencia estadísticamente significativa ($p = 0,16$) en las medias de NT del tratamiento T4 (*A. hypogaea* + PC-1 %) y tratamiento T5 (*A. hypogaea* + *Rhizophagus intraradices* 2,5 g + PC-1 %) en ambos periodos de evaluación (ver Apéndice 16).

Tabla 21

Análisis de la varianza de las concentraciones de nitrógeno total (NT) en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos

ANOVA					
Nitrógeno Total (NT)					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig
Modelo	433,659 ^a	11	39,424	972,088	,000
Modelo corregido					
Intersección	10519,841	1	10519,841	259393,336	,000
Periodo	68,641	1	68,641	1692,514	,000
Tratamiento	137,209	5	27,442	676,648	,000
Periodo *	227,809	5	45,562	1123,442	,000
Tratamiento					
Error	1,460	36	,041		
Total	10954,960	48			
Total	435,119	47			
Total corregido					

Fuente: Elaboración propia.

3.1.5. Variación de la concentración del Fósforo Total (P) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

De los resultados de la Figura 47 y Tabla 22, las mayores concentraciones de fósforo Total (P) se registraron con un valor promedio de $8,37 \pm 0,12 \text{ mg.L}^{-1}$ para el tratamiento T1 (*Phaseolus vulgaris* + PC-1%) a los 60 días. Mientras que, a los 90 días se evidenció un fuerte decrecimiento de la concentración de P con valores menores al límite $0,05 \pm 0,00 \text{ mg.L}^{-1}$ en la totalidad de los tratamientos experimentales.

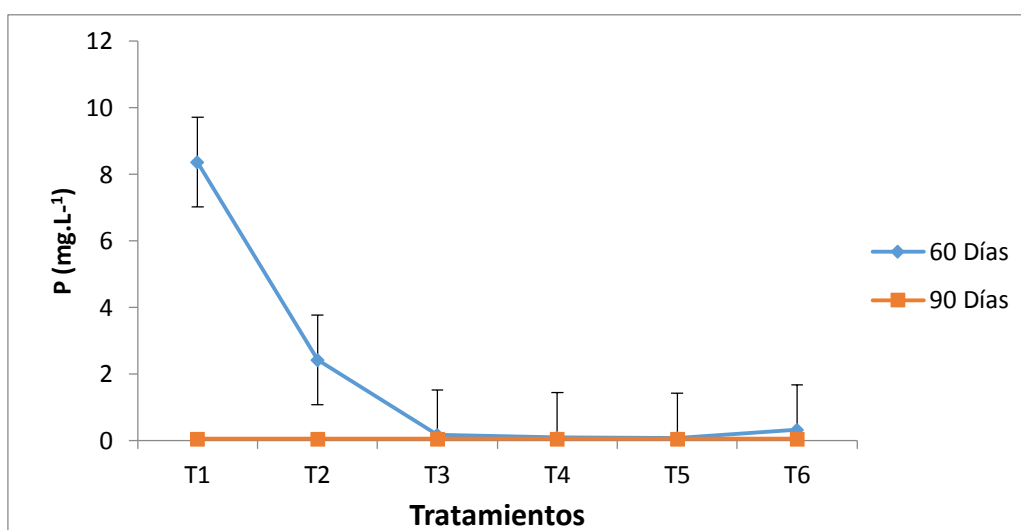


Figura 47. Resultados de los valores promedio de fósforo total (mg.L^{-1}) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tabla 22

Variación promedio de la concentración de fósforo total (P) y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

Tratamiento	60 días	90 días
T1	$8,37 \pm 0,12$	$0,05 \pm 0,00$
T2	$2,43 \pm 0,075$	$0,05 \pm 0,00$
T3	$0,19 \pm 0,019$	$0,05 \pm 0,00$
T4	$0,11 \pm 0,005$	$0,05 \pm 0,00$
T5	$0,09 \pm 0,004$	$0,05 \pm 0,00$
T6	$0,34 \pm 0,013$	$0,05 \pm 0,00$

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la variación de la concentración de Fósforo Total (P) frente a los dos periodos de evaluación 60 y 90 días, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p=0,000$) con respecto a los 6 tratamientos sometidos, véase la Tabla 23. La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de la concentración de P en la totalidad de los tratamientos, no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$) a los 60 días, mientras que a los 90 días de evaluación el tratamiento T1 y tratamiento T2 y tratamiento T6 mostraron diferencias significativas ($p < 0,05$) reflejadas en el descenso de las medias del P presente en el suelo. A su vez, el tratamiento T3 ($p = 0,495$), tratamiento T4 ($p = 0,28$) y tratamiento T5 ($p=0,29$) no presentaron diferencias significativas, evidenciándose una concentración constante en los tres tratamientos antes mencionados, véase Apéndice 17.

Tabla 23

Análisis de la varianza de las concentraciones de fósforo total en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos

ANOVA					
Fósforo Total (P)					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo	258,265 ^a	11	23,479	10874,628	,000
Modelo corregido					
Intersección	46,551	1	46,551	21561,141	,000
Tratamiento	108,160	5	21,632	10019,360	,000
Periodo	41,944	1	41,944	19427,310	,000
Tratamiento * Periodo	108,160	5	21,632	10019,360	,000
Error	,078	36	,002		
Total	304,894	48			
Total corregido	258,343	47			

Fuente: Elaboración propia.

3.1.6. Variación de la concentración del potasio (K) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

En la Tabla 24 se muestran las medias y las desviaciones estándar de las concentraciones de K evaluados a los 60 y 90 días. La mayor concentración se registró a los 90 días para el tratamiento T6, con un valor promedio de $80,8 \pm 0,40 \text{ mg.L}^{-1}$, mientras que la menor concentración de K se registró también en el mismo tratamiento con un valor de $5,32 \pm 0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ a los 60 días (Figura 48).

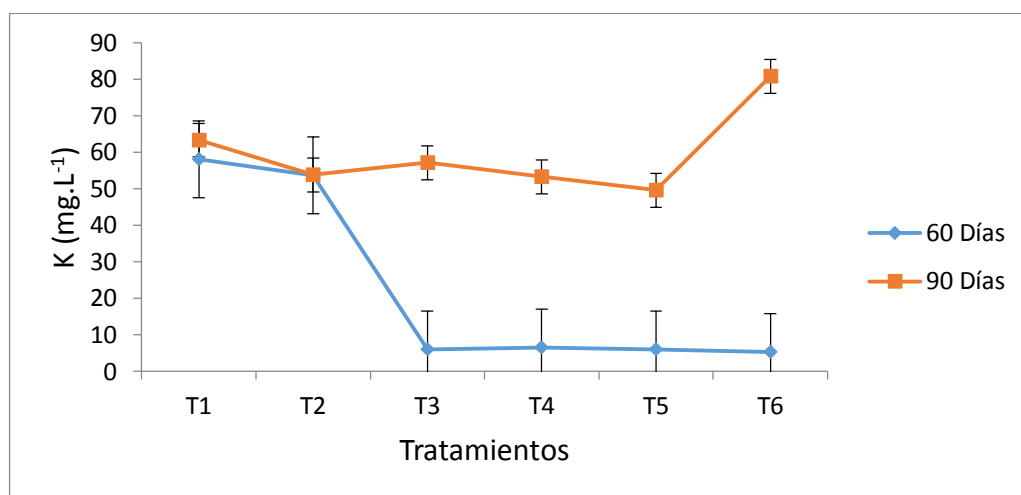


Figura 48. Resultados de los valores promedio de potasio (K) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tabla 24

Variación promedio de la concentración de potasio y sus desviaciones estándar (\pm DS) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días

Tratamiento	60 días	90 días
T1	58,03±0,775	62,93±0,463
T2	53,63±0,422	53,8 ±0,400
T3	6,05±0,121	57,13±0,137
T4	6,52±0,161	53,28±0,125
T5	0,09±0,004	49,63±0,47
T6	5,32±0,02	80,80 ±0,40

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que la concentración de K frente a los dos periodos de evaluación 60 y 90 días, presentaron una influencia significativa con respecto a los tratamientos sometidos ($p=0,000$), véase la Tabla 25. La prueba de Tukey mostró que la comparación de medias de las concentraciones de K de los tratamientos T3, T4, T5 y T6 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) a los 90 días, siendo la media más alta para tratamiento T6 con un valor de $80,8 \pm 0,53 \text{ mg.L}^{-1}$. Mientras que, se observó un comportamiento homogéneo en las medias de la concentración de Potasio en los tratamientos T1 y T2, no evidenciándose diferencias significativas ($p > 0,00$) entre ambos tratamientos, véase Apéndice 18.

Tabla 25

Análisis de la varianza de las concentraciones de potasio (K) en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos

ANOVA					
Potasio (K)					
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	GL	Media cuadrática	F	Sig.
Modelo corregido	30486,144 ^a	11	2771,468	35,399	,000
Intersección	76250,586	1	76250,586	973,910	,000
Tratamiento	5503,296	5	1100,659	14,058	,000
Periodo	14258,171	1	14258,171	182,112	,000
Tratamiento * Periodo	10724,677	5	2144,935	27,396	,000
Error	2818,557	36	78,293		
Total	109555,287	48			
Total corregido	33304,701	47			

Fuente: Elaboración propia.

3.1.7. Evaluación de la altura de las plantas *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea* en los tratamientos experimentales

En los tratamientos con las plantas de *Phaseolus vulgaris* se observó que la altura de la planta va aumentando con los días de experimentación. En el tratamiento tres (T3), la planta alcanza su máxima altura en comparación con los demás tratamientos. A los 60 días el valor promedio de la altura fue de $49,75 \pm 0,35$ cm, mientras que a los 90 días la planta alcanzó una máxima altura con un valor promedio de $143,75 \pm 11,87$ cm. Para el caso de los tratamientos con *Arachis hypogaea*, el crecimiento de la planta fue menor para ambos periodos (60 y 90 días), en comparación con *P. vulgaris*. Se observó que en el tratamiento seis (T6), se alcanzó una mayor altura contrastando con los otros tratamientos (Tabla 26). En dicho tratamiento a los 60 días de evaluación, *A. hypogaea* alcanzó su máxima altura en con un valor promedio de $17,38 \pm 0,37$ cm., mientras que a los 90 días el valor promedio de la altura de la planta fue de $30,25 \pm 0,87$ cm (Figura 49).

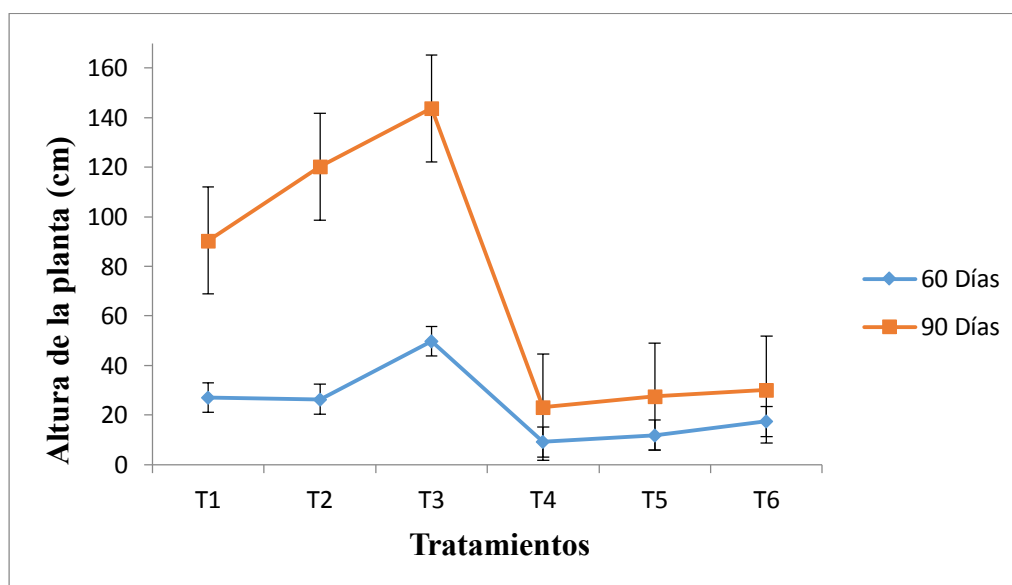


Figura 49. Resultados de los valores promedio de la altura de las plantas fabáceas en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tabla 26

Registro promedio de la altura de la plantas (*A. hypogaea* y *P. vulgaris*) y sus desviaciones estándar ($\pm DS$) en los tratamientos experimentales a los 60 y 90 días.

Tratamiento	60 días	90 días
T1	27,03 \pm 0,52	90,40 \pm 0,35
T2	26,35 \pm 0,32	120,25 \pm 0,37
T3	49,75 \pm 0,35	143,75 \pm 11,87
T4	9,13 \pm 0,11	23,15 \pm 0,17
T5	11,88 \pm 0,18	27,50 \pm 0,50
T6	17,38 \pm 0,37	30,25 \pm 0,87

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 27

Análisis de la varianza de la altura de las plantas fabáceas en dos periodos (60 y 90 días) y tratamientos

ANOVA (Altura de las plantas)						
Origen	Tipo III de suma de cuadrados	de GL	Media cuadrática	F	Sig.	
Modelo corregido	88818,297 ^a	11	8074,391	372,793	,000	
Intersección	110899,413	1	110899,413	5120,207	,000	
Periodo	28772,813	1	28772,813	1328,436	,000	
Tratamiento	44265,882	5	8853,176	408,750	,000	
Periodo * Tratamiento	15779,602	5	3155,920	145,708	,000	
Error	779,730	36	21,659			
Total	200497,440	48				
Total corregido	89598,027	47				

Fuente: Elaboración propia.

Los resultados del ANOVA de una vía muestran que el crecimiento por medio de la altura de las plantas fabáceas *Phaseolus vulgaris* “frejol” y *Arachis hypogaea* “maní” evaluados en dos periodos de 60 y 90 días, presentaron una influencia significativa con respecto a los tratamientos sometidos ($p = 0,000$) véase la Tabla 27.

La prueba de Tukey mostró que las medias de crecimiento de los tratamiento T1 (conformado por *Phaseolus vulgaris* + PC-1%), tratamiento T2 (conformado por *Phaseolus vulgaris* + 2,5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1%) y tratamiento T3 (conformado por *Phaseolus vulgaris* + 5,0 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1%) presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) en los dos periodos de evaluación, siendo la media más alta de crecimiento registrada en el tratamiento T3 con un valor de $143,75 \pm 11,87$ cm. Mientras que, los tratamientos T4 (conformado por *Arachis hypogaea* + PC-1%), T5 (conformado por *Arachis hypogaea* + 5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1%) y T6 (conformado por *Arachis hypogaea* + 5 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* + PC-1%), no reflejaron una variación significativa en los dos periodos de evaluación ($p > 0,05$), ver Apéndice 19.

3.1.8. Correlación entre las variables del porcentaje de CM-PC-1 %, porcentaje de reducción de PC-1 %, NT, P, K, pH y altura de las plantas fabáceas en los tratamientos experimentales

El índice de correlación de Pearson usado para determinar la relación entre el pH, nitrógeno total (NT), potasio total (K), altura de las plantas, el porcentaje de colonización micorrízica (CM-PC-1 %) y el porcentaje de reducción de petróleo crudo al 1 % (PC-1 %) presentaron una correlación positiva. Mientras que, las correlaciones negativas se presentaron entre el Fósforo total (P), porcentaje de reducción de petróleo, altura de las plantas, pH, K y el NT.

Las correlaciones del apéndice 20, muestran que el Nitrógeno Total (NT) y el Fósforo Total (P) presentaron una correlación negativa moderada ($r = -0,513$; $P = 0,000$). Seguidamente, el porcentaje de reducción de petróleo al 1 % (PC-1 %) con el P registraron una correlación negativa moderada ($r = -0,481$; $P = 0,001$). Por otro lado, entre el porcentaje de colonización micorrízica al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1

%) y el P se presentó una correlación negativa baja ($r=-0,393$; $P=0,006$) (Rowntree, 1984).

El porcentaje de reducción de petróleo al 1 % (PC-1 %) y el porcentaje de colonización micorrízica al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1 %) registró una correlación positiva muy fuerte ($r=0,769$; $P=0,00$). Seguidamente, se evidenció que el porcentaje de CM-PC-1 % y el NT registraron una correlación positiva moderada ($r=0,493$; $P=0,00$), a su vez el porcentaje de reducción PC-1% y el K presentaron una correlación positiva moderada ($r=0,379$; $P=0,008$). Por otro lado, la altura de las plantas y el K presentaron una correlación positiva moderada ($r=0,336$; $P=0,020$), mientras que, entre el pH y el K presentaron una correlación positiva moderada ($r=0,335$; $P=0,020$) (Rowntree, 1984).

Del análisis estadístico realizado la correlación más significativa encontrada en la presente investigación fue entre el porcentaje de reducción del petróleo al 1 % (PC-1 %) y el porcentaje de colonización micorrízica sometida al 1 % de petróleo (CM-PC-1 %), presentando una correlación positiva fuerte ($r=0,769$; $P=0,000$).

3.2. DISCUSIONES

La presente investigación reportada en Perú evidencia el potencial biorremediador del hongo micorrízico arbuscular *Rhizophagus intraradices*, en asociación simbiótica con las Fabaceae nativas, *Arachis hypogaea* “maní” y *Phaseolus vulgaris* “frejol”, proveniente de la provincia de Atalaya, Ucayali-Perú. En este experimento se buscó medir la reducción de crudo de petróleo en suelos a nivel de laboratorio. La importancia de emplear plantas de la familia de las fabáceas se debe a sus características metabólicas y fisiológicas, como: facilidad de adaptación, crecimiento rápido y fijación de nitrógeno, que le permite proporcionar una capacidad de tolerancia y degradación de los hidrocarburos en suelos (Ferrera et al., 2007; Kaimi et al., 2007; Nwoko et al., 2007; Vázquez-Luna et al., 2010 citado por Villegas-Velázquez, 2011). Por otra parte, las micorrizas arbusculares tienen la capacidad de reducir la toxicidad de los hidrocarburos del petróleo en la planta, estimulando su resistencia, crecimiento y supervivencia, así como también tienen la capacidad de almacenar pequeñas cantidades de hidrocarburos en su estructura intracelular (Cabello, 1997; Liu & Dalpé, 2009). Estas características antes mencionadas permitieron la reducción del 86,00 % del crudo de petróleo en el suelo por acción de la *R. intraradices* asociada a la *A. hypogaea*.

De acuerdo a Alarcón et al. (2008) la interacción simbiótica entre planta-hongo es eficiente para la reducción de petróleo. En la presente investigación se registró el mayor porcentaje de CM-PC-1% (colonización micorrizica sometida al 1 % de petróleo crudo) en los tejidos de la raíz de la *Arachis hypogaea*, cuando fue inoculada con 5,0 g.kg⁻¹ de *Rhizophagus intraradices* perteneciente al tratamiento T6, con un valor promedio de 38,79 ±0,34% a los 90 días de evaluación (Tabla 14). Este comportamiento se debe al establecimiento micorrízico que se va fortaleciendo en la zona rizosférica de la planta, a medida que alcanzaba su etapa vegetativa máxima en medios contaminados con petróleo crudo, tal como refiere Cabello (1995), quienes alcanzaron la mayor colonización micorrizica al emplear la asociación simbiótica de la *Glomus fasciculatum* en tejidos de la raíz de la *Medicago sativa* conforme alcanzaba su mayor desarrollo vegetativo, registrando un valor del 70 % de colonización micorrizica a los 90 días sometidas a condiciones de laboratorio. En la presente investigación la máxima colonización micorrizica en las plantas de *Arachis hypogaea*, puede deberse a que la

infección de la *Rhizophagus intraradices* tuvo mayor afinidad con las características fisiológicas del maní, así como a los mecanismos de defensa que se activaron en la *A. hypogaea* debido a que se encontraba en condiciones deficientes de Fosforo, permitiendo que el reconocimiento de la colonización sea mayor (Paszkowski, 2006). También favoreció que la planta tuvo mejor potencial adaptativo a la presencia del crudo de petróleo (Rodríguez, Redman y Henson, 2004), mientras que, las plantas del frejol presentaron sensibilidad a la presencia del crudo de petróleo, el cual fue reflejado en la marchitez de la planta antes de cumplir su desarrollo vegetativo, tal como lo refiere en el estudio de Blankenship y Larson (1978), quienes indican que la presencia del hidrocarburo reduce el metabolismo y desarrollo de las plantas, al inhibir la madurez fisiológica de las raíces y al generar la reducción en la biomasa foliar. Es así, como pudo afectar el establecimiento micorrizico de la *R. intraradices* en las raíces de las plantas de *P. vulgaris*, a diferencia de las plantas de *A. hypogaea* quienes presentaron un crecimiento vegetativo estable y mayor colonización.

En el presente estudio la colonización micorrizica no se vio inhibida por la contaminación del crudo de petróleo. Se registraron los picos más altos de colonización micorrizica en las raíces de las plantas de *A. hypogaea* ($38,79 \pm 0,34$ %) para el T6 a los 90 días. Resultados muy similares obtuvo Alarcón et al. (2008), usando a la planta de *L. multiflorum* y la *Glomus intraradices* desarrolladas en suelos contaminados con petróleo, el cual registró una tasa colonización micorrizica mayor a 30 %. Por su parte, Cabello (1997), demostró que altas concentraciones de hidrocarburos tiene un efecto negativo sobre la zona rizosférica donde se establece la simbiosis de los HMA, pero no los inhibe. Estas investigaciones evidencian que el petróleo crudo no impide la actividad simbiótica, debido a que el hongo utiliza al hidrocarburo como fuente de carbono para sus principales vías metabólicas (Solís, 2005).

La reducción de petróleo con especies de plantas ha sido utilizada en la actividad biorremediadora. Así, en la presente investigación, el tratamiento T6 tuvo una alta reducción del petróleo crudo por parte de la planta *Arachis hypogaea* y el hongo micorrizico *R. intraradices*. Este tratamiento tuvo un valor promedio 86,00 % a los 90 días, mientras que el tratamiento T1 sin la presencia de la *R. intraradices* registro la

reducción de petróleo crudo mínima de 24,00 % a los 60 días (Figura 44 y ver Apéndice 8). Los resultados fueron superiores a lo reportado por Nwoko et al. (2014), en el que se empleó a la leguminosa *Phaseolus vulgaris* en asociación simbiótica con la *Glomus mosseae*, registrando una tasa de reducción del petróleo crudo, con un valor de 23,00 % a un pH ácido de 5,68 y a una carga orgánica de 49,70 %. A su vez, Alarcón et al. (2008), emplearon a la gramínea *Lolium multiflorum* en interacción con la *Glomus intraradices* y microorganismos degradadores de petróleo (*Sphingomonas paucimobilis* y *Cunninghamella echinulata* var. *elegans*), quienes alcanzaron una mayor tasa de reducción de petróleo con un valor de 59,00 %. Por su parte, Zhou et al. (2013), lograron una remoción del 89,00 % de hidrocarburo a un pH 7,4 y con carbono orgánico de 16 g.kg⁻¹, empleando a la planta leguminosa *Medicago sativa* junto a la actividad simbiótica con la *G. intraradices*, en comparación de los tratamientos sin el hongo micorrizico arbuscular. Este alto porcentaje de reducción del petróleo crudo puede ser debido al papel fundamental que cumplen las plantas, principalmente del grupo de las fabáceas, debido a sus características metabólicas en asociación con microorganismos que realizan la fijación de nitrógeno, a nivel de la rizosfera y que es promovida por la acción de los hongos micorrízicos arbusculares (Perez, Rojas y Montes, 2011), que en esta investigación es usada para estimular la rizodegradación del petróleo crudo. Asimismo, la modificación de la estructura de las raíces de las plantas por acción de la actividad micorrízica promueve el incremento del nivel de la actividad enzimática (catalasa y peroxidasa) el cual se da como consecuencia de la producción de compuestos oxidativos en la colonización micorrizica (Blilou et al., 2000). Las reacciones oxidativas que ocurren a nivel de la planta (microsómicas, citosólicas y mitocondriales) buscan la transformación de los compuestos orgánicos a metabolitos hidrosolubles (Kvesitadze et al., 2001). Como resultado de la acción metabólica sobre los compuestos contaminantes se incrementa la hidrofiliocidad del hidrocarburo, proporcionando mayor movilidad y permitiendo su depósito en las vacuolas, dando como resultado a la transformación incompleta del contaminante (Schäffer, Messner, Langebartels y Sanderman, 2002). Finalmente, con la transformación y conjugación del compuesto tóxico almacenada en la vacuola, actúan a continuación enzimas desintoxicadoras (glutathion peroxidasa, quinona, monooxigenasa, reductasa y otros) logrando que el hidrocarburo se reduzca en su totalidad (Jakoby y Ziegler, 1990); la exudación de la raíz directamente sobre la degradación del petróleo crudo promueve su reducción (Nwoko, 2014; Jones y Leyval, 2003).

En la presente investigación el comportamiento del pH en los tratamientos no presentaron diferencias significativas en el tiempo ($p=0,107$), encontrándose inicialmente dentro del rango de ligeramente alcalino a los 60 días, para posteriormente alcanzar valores de pH moderadamente alcalinos durante los 90 días de evaluación (Tabla 17 y ver Apéndice 9). En investigaciones actuales por Zhou et al. (2013), mencionan que un pH de 7,4 favoreció la máxima remoción del hidrocarburo. Similares resultados se encontraron en el estudio de Ríos (2005) menciona que para mantener la capacidad degradante, el pH debe encontrarse en rangos de neutralidad con valores que oscilan entre 7,4-7,8 unidades de pH. A diferencia, en la presente investigación, el pH alcalino no fue un factor condicionante para el desarrollo del establecimiento micorrizico entre hongo-planta y la máxima reducción del petróleo crudo presente en el suelo. Otros autores, Martínez y López (2001), mencionan que no existe tendencia definida del comportamiento del pH en el suelo, debido que pueden presentarse de manera irregular dependiendo las concentraciones de hidrocarburos. Esto quiere decir, que los registros de pH en la presente investigación no variaron en una concentración de 1% de crudo de petróleo.

Los hongos micorrízicos arbusculares tienen influencia significativa en la absorción de los minerales en una proporción mayor para fósforo, seguido de nitrógeno y finalmente de potasio de acuerdo a lo reportado por Marchener y Dell (1994). En la presente investigación, las concentraciones de fósforo en los tratamientos T1, T2, T6 presentaron una alta variabilidad ($p < 0,05$) reflejadas en el descenso del fosforo disponible presente en el suelo con valor de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$ a los 90 días. A su vez, los tratamientos T3, T4 y T5 no presentaron variaciones en los periodos evaluados ($p > 0,05$). El tratamiento T6 registró la máxima colonización micorrízica en suelos con bajas concentraciones de P con un valor de $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$, resultados similares se encontraron por Estaún, Camprubí y Joner (2002), quienes reportaron que en suelos con bajas cantidades de P se mejora la colonización micorrizica con las plantas hospedadoras. Por su parte Smith y Read, (1997), demostraron que el incremento de la colonización micorrizica, aumentó la absorción de fósforo en suelos con su baja disponibilidad. Estos autores, también mencionaron que la mayor absorción de fósforo en las raíces colonizadas puede ser de 3 a 5 veces mayor que en las raíces no micorrizadas. En la investigación, el descenso de los niveles de P en suelos con un pH moderadamente alcalino, se explica por la mayor

asimilación de este nutriente por las plantas fabáceas, el cual es reflejado en su buen crecimiento. Según Smith, Gianinazzi, Koide y Cairney (1994), mencionan que el fósforo es el segundo nutriente más importante que es transferido del suelo hacia la planta por acción del hongo micorrizico, y a cambio recibe de la planta carbohidratos para su desarrollo. Cabe indicar, que el fósforo se presenta en menores concentraciones al nitrógeno en el suelo, principalmente se debe a su baja disponibilidad que se fija e inmoviliza en suelos con textura arcillosa y con pH ácidos (< 6.5 unidades de pH), influyendo su absorción hacia las plantas. Por el contrario, en suelos fuertemente alcalinos la disponibilidad del fósforo se incrementa, esto influenciado por las características de la especie vegetal, el tipo de suelo y los factores ambientales (Aristizábal y Cerón, 2012). En algunas investigaciones, evidenciaron que la liberación de ácidos orgánicos por parte de los microorganismos tienen un papel importante en la solubilidad del P favorecida por la actividad de la enzima fosfatasa, junto con la acción simbiótica del hongo micorrizico que son esenciales en la disponibilidad para las plantas (Graham y Miller, 2005). De acuerdo a los resultados obtenidos en esta investigación, la reducción de la concentración del P en el suelo se presentó en suelos con un pH ligeramente alcalino, el cual facilitó la disponibilidad óptima del P y redujo su fijación en las partículas del suelo (franco arenoso), lo que permitió su aprovechabilidad máxima por las raíces de las plantas fabáceas nativas e inoculadas con *Rhizophagus intraradices*.

En la presente investigación se evidenció una correlación positiva moderada ($r=0,493$; $P=0,00$) entre las cantidades de nitrógeno y la colonización micorrizica entre la *R. intraradices* y las plantas fabáceas nativas *P. vulgaris* y *A. hypogaea* tanto a los 60 y 90 días de evaluación. Estos resultados confirman lo encontrado en el estudio de Gonzales et al. (2012), quienes reportaron que existe un efecto sinérgico entre el contenido del Nitrógeno del suelo y la actividad micorrizica, siendo una relación de factores determinantes para garantizar el éxito de la simbiosis entre el hongo micorrizico *Glomus cubense* y una planta leguminosa *Pueraria phaseoloides*. Acuña, Pucci y Pucci (2008), evidenciaron que en medios con bajas cantidades de Nitrógeno Total (NT) la biodegradación de hidrocarburos totales se presenta deficiente. Los resultados del nitrógeno total del suelo contaminado con petróleo crudo sometidos a la actividad biorremediadora del hongo, evidencian una correlación positiva; sin embargo, no se puede establecer el grado de eficiencia de reducción tomando en cuenta la cantidad de

nitrógeno total en el suelo, debido a que no se realizaron análisis en sus formas inorgánicas (NH_4 , NO_2^- , NO_3^-).

El nutriente potasio (K) genera el crecimiento de las raíces y promueve la absorción de otros nutrientes, así como también ayuda a regular la apertura de los estomas aumentando la tasa fotosintética que estimula el rendimiento de las plantas (Sharma, Yadav y Aggarwal, 2016). En la presente investigación se evidenció que el incremento de las concentraciones de K, tuvieron una relación directa con el incremento de la colonización micorrizica de la *R. intraradices* en las raíces de las plantas de *Arachis hypogaea* (tratamiento T6), en comparación con los tratamientos sin inoculo. Estos resultados fueron similares al reportado por Arango, Ruscitti, Ronco y Beltrano (2012), refiriéndose que las concentraciones de K se incrementaron significativamente en los tratamientos con las plantas inoculadas con un valor de $19,60 \text{ g.kg}^{-1}$, en comparación con las no inoculadas con un valor de $13,50 \text{ g.kg}^{-1}$. Asimismo, en lo reportado por Freitas et al. (2006), el aumento del K en el suelo puede tener una relación directa con el incremento significativo de la biomasa de las plantas.

La característica fenotípica, la altura de la planta, fue influenciada por la actividad de las micorrizas en *Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*. Todos los tratamientos tuvieron un crecimiento significativo ($p < 0,00$), siendo los tratamientos con inoculo de *R. intraradices* (T3 y T6) quienes alcanzaron una mayor altura con valores de 143,75 cm y 30,25 cm de altura respectivamente, en comparación con los tratamientos sin la presencia del hongo micorrizico (T1 y T4). Estos resultados fueron similares a los obtenidos por Tang et al. (2009), quienes evidenciaron que la actividad simbiótica de los hongos micorrízicos arbusculares tienen un efecto estimulador sobre el crecimiento y resistencia de las plantas (*Medicago Sativa* y *Zea mays*). Así mismo, Freitas, Martin y Carvalho (2006), reportaron en su investigación que la colonización micorrízica tiene un efecto positivo sobre el crecimiento de las plantas. A su vez, se han investigado la influencia del petróleo crudo sobre el crecimiento de las plantas, tal como lo reporta Arias-Trinidad, Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2017), quienes evidenciaron que el crecimiento de la planta de la *P. vulgaris* registro una altura de 10 cm, debido a que se presentó un retraso de su crecimiento por la exposición de concentraciones altas de

hidrocarburos de petróleo (9,000 mg.kg⁻¹). Por su parte, Vázquez-Luna et al. (2010), observaron que la altura de las plantas fabáceas *Leucaena leucocephala* Lam. y *Crotalaria incana* L. se inhibieron por la presencia del petróleo crudo en el suelo. En la presente investigación la *Phaseolus vulgaris* fue sensible a la presencia del crudo de petróleo (1 %) independientemente de la colonización micorrizica con la *R. intraradices*, esto se atribuye a que la planta presento una baja tasa fotosintética, el cual pudo deberse al bajo contenido de clorofila y síntesis de fitohormonas en la planta, lo que se reflejó en su lento crecimiento durante los 90 días del experimento; así como los cambios físicos y químicos del suelo por presencia del hidrocarburo (aumento del carbono orgánico, concentración de nitrógeno, pH, conductividad eléctrica y contenido de arcilla) (Khan et al., 2013). Por el contrario, el desarrollo fisiológico de las plantas de *A. hypogaea* no se vieron afectadas por la presencia del crudo de petróleo, debido a que la asociación simbiótica con la *R. intraradices* le proporciono mayor tolerancia al estrés del crudo de petróleo durante los 90 días del experimento. Sin embargo, el crecimiento de la *Phaseolus vulgaris* L. fue superior al de la *Arachis Hypogaea* L., debido a las características de desarrollo fenológico que difieren de cada planta (Alava, 2012; IICA, 1989). En tanto, en la investigación la micorriza arbuscular tuvo un efecto positivo en las características fenotípicas de las plantas empleadas.

CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES

1. La mayor colonización micorrízica se presentó en la asociación simbiótica entre *Arachis hypogaea* y *R. intraradices* en el tratamiento T6 con un valor de 38,78% en suelos contaminados al 1 % de petróleo crudo a los 90 días.
2. La mayor tasa de reducción del porcentaje de petróleo crudo al 1 % se registró en el tratamiento T6 con un valor de 86,00 % a los 90 días de evaluación.
3. El nitrógeno resultó ser un elemento importante para estimular la colonización micorrízica de la *Rhizophagus intraradices* y la *Arachis hypogaea* ($R= 0,4493$; $p = 0,00$).
4. El porcentaje de reducción de petróleo al 1 % (PC-1 %) y el porcentaje de colonización micorrízica al 1 % de petróleo crudo (CM-PC-1 %) registró una correlación positiva muy fuerte ($r= 0,769$; $P=0,00$).
5. La dosis de $5,0 \text{ g.kg}^{-1}$ de *R. intraradices* entre las plantas fabáceas nativas (*Phaseolus vulgaris* y *Arachis hypogaea*) T3 y T6, permitió un mejor desarrollo de la altura de la planta a diferencia de las fabáceas en ausencia de micorrizas (T1 y T4).
6. El pH óptimo que se encontró en la presente investigación estuvo dentro de rango de ligeramente alcalino, el cual permitió que se desarrolle el proceso de simbiosis que favoreció a la reducción del petróleo crudo presente en el suelo.

CAPÍTULO V: RECOMENDACIONES

1. Se recomienda extender el experimento hasta culminar todo el estadio fenológico de las plantas, y así poder analizar el efecto del petróleo crudo que puede tener sobre la biomasa de las plantas estudiadas.
2. Evaluar la reducción de petróleo en suelos en consorcio con otros microorganismos como por ejemplo las bacterias del género *Pseudomonas*.
3. Se recomienda no esterilizar el suelo para poder evidenciar el posible efecto de los microorganismos y micorrizas nativas en la biorremediación de suelos contaminados con petróleo crudo.
4. Utilizar otros métodos de mayor sensibilidad para la medición de la reducción del petróleo en el suelo.
5. Realizar una evaluación de la influencia de la textura del suelo en la reducción de petróleo y la asociación simbiótica entre las plantas y micorrizas.
6. Se debe probar a otras plantas fabáceas en el tratamiento de suelos contaminados con diferentes concentraciones de petróleo. Así como, otros géneros de hongos micorrízicos arbusculares en asociación simbiótica con las fabáceas empleadas en la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbott, L. K., & Robson, A. D. (1982). The role of Vesicular Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Agriculture and the Selection of Fungi for Inoculation. *Australian Journal Agriculture Research*, 33, 389-408. 10.1071/AR9820389
- Acuña, A. J., Pucci, O. H. & Pucci, G. N. (2008). Caracterización de un proceso de biorremediación de hidrocarburos en deficiencia de nitrógeno en un suelo de Patagonia Argentina. *Ecosistemas*, 17(2), 85-93. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=54017212>
- Aguilera, L. I., Olalde, V., Arriaga, M. R., Contreras, R. (2007). Micorrizas arbusculares. *Ciencia Ergo-Sum*, 14 (3), 300-306. Recuperado de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10414307>
- Aguirre-Buenaño, N. M. (2013). *Métodos de desinfección de sustrato para el control de Dampinf-off en semillero de teca (Tectona grandis Linn F.), bajo invernadero en la empresa SERAGROFOREST, provincia Santo Domingo de los Tsáchilas* (Tesis de postgrado), Escuela superior politécnica de Chimborazo, Riobamba, Ecuador.
- Aitchison, E., Kelley, S., Alvarez, P., & Schnoor J. (2000). Phytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environmental Research*, 72, 313-321. Recuperado de <https://www.engg.ksu.edu/HSRC/97abstracts/doc44.html>
- Álava-Gómez, J. (2012). *Determinación de las características agronomicas de 15 cultivares de maní (Arachis hypogaea L.) tipo valencia en la parroquia Virgen del Fátima, Yaguachi-Guayas*. (Tesis de postgrado), Universidad de Guayaquil, Ecuador. Recuperado de <http://repositorio.ug.edu.ec/handle/redug/5612>
- Alarcón, A., Davies, F. T., Autenrieth, R. & Zuberer, D. A. (2008). Arbuscular Mycorrhiza and Petroleum-Degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 10, 251-263. 10.1080/15226510802096002
- Almora, G., Miguel, G. (2014). *Evaluación de compatibilidad para la mezcla de petróleos crudos como carga de unidades de procesos en refinería talara* (Tesis de posgrado), Universidad Nacional de Ingeniería, Perú. Recuperado de <http://cybertesis.uni.edu.pe/handle/uni/3425>
- Aprill, W. & Sims, R. C. (1990). Evaluation of the use of prairie grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere*, 20 (1-2), 253-265. doi.org/10.1016/0045-6535(90)90100-8
- Arango, M.C., Ruscitti, M.F., Ronco, M.G. & Beltrano, J. (2012). Mycorrhizal Fungi Inoculation and Phosphorus Fertilizer on Growth, Essential Oil Production and Nutrient Uptake in Peppermint (*Mentha piperita L.*). *Revista Brasileira de Plantas Medicinails*. 4 (4). Recuperado de <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000400018>

- Arias-Restrepo, J. H., Rengifo-Martínez, T., & Jaramillo-Carmona, M. (2007). *Manual Técnico: Buenas practicas Agrícolas en la Producción de Frejol Voluble* [PDF file], Colombia. Recuperado de <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/a1359s/a1359s00.pdf>
- Arias-Trinidad, A., Rivera-Cruz, M., & Trujillo-Narcía, A. (2017). Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (Leguminosae). *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33 (3), 411-419. doi:<http://dx.doi.org/10.20937/RICA.2017.33.03.05>
- Aristizábal-Gutiérrez, F., & Cerón-Rincón, L. (2012). Dinámica del ciclo del nitrógeno y fósforo en suelos. *Revista Colombia de Biotecnología*, 14(1), 285-295. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/32889/38347>
- Audet, P. (2012). Arbuscular Mycorrhizal Symbiosis and Other Plant-Soil Interactions in Relation to Environmental Stress. *Springer Link*, 233-264. 10.1007/978-1-4614-0815-4_11
- Augé, R. M. (2000). Stomatal Behavior of Arbuscular Mycorrhizal Plants. En: *Arbuscular Mycorrhizas: Physiology and Function*. 10.1007/978-94-017-0776-3
- Barea, J. M., Azcón, R. & Azcón A., C. (2002). Mycorrhizosphere interactions to improve plant fitness and soil quality. *Antonie van Leeuwenhoek*, 81, 343-351.
- Barker, S. Tagu, D. & Delp, G. (1998). Regulation of root and fungal morphogenesis in mycorrhizal symbiosis. *Plant Physiology*, 116, 1201-1207.
- Becerril J. M., Barrutia O., García-Plazaola, J. I., Hernández, A., Olano, J. M., Garbisu C. (2007). Especies nativas de suelos contaminados por metales: aspectos ecofisiológicos y su uso en fitorremediación. *Ecosistemas* 2007(2), 51-56.
- Blilou, Ikram, Bueno, Pablo, Ocampo, Juan A. & Garcia-Garrido, J. M. (2000). Induction of Catalase and Ascorbate Peroxidase Activities in Tobacco Roots Inoculated With the Arbuscular Mycorrhizal Fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research*, 104, 722-725.
- Blankenship, D., W. & Larson, R., A. (1978). Plant Growth Inhibition by the Water Extract of a Crude Oil. *Water, Air, and Soil Pollution*, 10, 471-476.
- Botello V. A., Rendón-Von O. J., Gold - Bouchot, G. & Hernandez, A. C. (2005). *Golfo de Mexico, contaminación e impacto ambiental. Campeche*, Mexico. Recuperado de https://books.google.com.pe/books?id=WwuryOF1jUEC&pg=PP10&lpg=PP10&dq=ISBN+N+968-5722374&source=bl&ots=ErshFRWmPr&sig=8IEsNgH5VFe4S1wFawTKriTpxBw&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwjiovHIGu_OAhWBqh4KHXNhCxsQ6AEIHDA#v=onepage&q=ISBN%20968-5722-37-4&f=false
- Bossert, I. & Bartha, R. (1984). The fate of petroleum in soil ecosystems. En *Petroleum microbiology*. 473-690. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/247878648_The_fate_of_petroleum_in_soil_ecosystems

- Braibant-Wayens, C. (2004). *Estudio del potencial de degradación de los hidrocarburos por Acinetobacter sp. y Pseudomonas putida para su aplicación en la biorremediación de suelos contaminados* (Tesis de grado). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Costa Rica. Recuperado de http://bibliodigital.itcr.ac.cr/bitstream/handle/2238/206/potencial_degradacion_hidrocarburos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Bucking, H., Liepold, E. & Ambilwade, P. (2012). *The role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes*. Recuperado de <http://dx.doi.org/10.5772/52570>
- Burgos, O. (2006). Maní (*Arachis hypogaea* L.). Recuperado de <http://www.regionlalibertad.gob.pe/web/opciones/pdfs/manual%20de%20man%C3%AD.pdf>
- Cabello, M. N. (1995). Efecto de la contaminación con Hidrocarburos sobre hongos formadores de Micorrizas Vesículo-Arbuscular (MVA). *Boletín Micológico*, 18 (2), 77-83. dx.doi.org/10.22370/bolmicol.1995.10.0.1083
- Cabello, M. N. (1997). Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). *FEMS Microbiology Ecology*, 22, 233-236
- Carling, D. E., & Brown, M. F. (1982). Anatomy and physiology of vesicular-arbuscular and nonmycorrhizal Roots. *Phytopathology*, 72 (8), 1108-114.
- Cardoso, I. M., & Kuyper, T. W. (2006). Mycorrhizas and tropical soil fertility. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 116, 72-84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.agee.2006.03.011>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT]. (1980). *Diversidad genética de las especies cultivadas del género Phaseolus*. Recuperado de <https://books.google.com.co/books?id=DUG0jfrD51gC&lpq=PP1&pg=PP1&hl=es#v=onepage&q&f=false>
- Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT] (2000). Catálogo de cepas de Micorriza Arbusculares. Recuperado de http://ciat-library.ciat.cgiar.org/ciat_digital/CIAT/books/historical/197.pdf
- Cronquist, A. 1981. An integrated system of classification of flowering plants. New York, US, Columbia University Press, The New York Botanical Garden. 1261 p.
- Chaineau C., H., J. Morel, L., & J. Oudot. (1997). Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Environ. Qual.* 26:1478-1483. [10.2134/jeq1997.00472425002600060005x](http://dx.doi.org/10.2134/jeq1997.00472425002600060005x)
- Clark, C. A., Zobel, R. W. & Zeto, S. K. (1999). Effects of mycorrhizal fungus isolates on mineral acquisition by of *Panicum virgatum* in acidic soil. *Biology and Fertility of Soils*, 9, 167-196.

- Cunningham, S. D., Berti, W. R. & Huang, J. W. (1995). Phytoremediation of Contaminated Soils. *Tibtech September*, (13), 393-397.
- Cunningham, S. D. & Ow, D. W. (1996). Promises and Prospects of Phytoremediation. *PlantPhysiol*, 110, 715-719.
- C.Walker & A.Schüssler. (2010). Rhizophagus intraradices (N.C.Schenck & G.S.Sm). Recuperado de: <https://www.gbif.org/species/8003630>
- Daniell, T. J., Husband, R., Fitter, A. H. & Young, J.P. W. (2001). Molecular diversity of arbuscular mycorrhizal fungi colonising arable crops. *Microbiology Ecology*, 36, 203-209.
- Debiane, D., Garçon, G., Verdin, A., Fontaine, J., Durand, R., Pirouz S., Grandmougin, F. A. & Lounès, S. A. (2009). Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry*, 70, 1421 - 1427. doi: 10.1016/j.phytochem.2009.07.002
- Diaz-Martínez, M. E., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez & García- Barradas, O. (2013) Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinacea) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación. *Biol. Trop.* 61 (3), 1039-1052.
- Dickson, E. M. (1981). Insulating Refractories-Vermiculite,perlite and diatomite-rocks playing an increasing role, Ind. Miner. Refractories Survey, 151-157
- Duxbury, C. L., Dixon, D. G. & Greenberg, B. M. (1997). Effects of simulated solar radiation on the bioaccumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the duckweed lemma gibba. *Environmental Toxicology Chemical*, 16 (8), 1739-1748. doi.org/10.1002/etc.5620160824
- Environmental Protection Agency [EPA]. (1996). *Method 3540C: Soxhlet extraction*. Recuperado de <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3540c.pdf>
- Environmental Protection Agency [EPA]. (2000). *Introduction to Phytoremediation*. Recuperado de <https://clu-in.org/download/remed/introphyto.pdf>
- Escoto-Gudiel, N. D. (2004). El cultivo de Frejol: Manual técnico para uso de empresas privadas, consultores individuales y productores. *Dirección de Ciencia y Tecnología Agropecuario*. Recuperado de <http://cenida.una.edu.ni/relectronicos/REf01e74.pdf>
- Estaún, V., Camprubí, A. & Joner, E. (2002). Selecting arbuscular mycorrhizal fungi for field application. *Mycorrhizal Technology in Agriculture*, 249-259. 10.1007/978-3-0348-8117-3_20
- Franceco, V. & Gonzalez, C. (2000). Embrión y Plántulas de Monocotiledóneas y Dicotiledóneas. Recuperado de <http://www.botanica.cnba.uba.ar/Trabprac/Tp4/Lagerminacion.html>

- Freitas, M. S., Martins, M. A. & Carvalho, A. J. (2006). Crecimiento e composición mineral da menta em resposta à inoculação com fungos micorrízicos arbusculares e adubação fosfatada. *Horticultura Brasileira*, 24, 11-16.
- Frick, C. M., Farrell, R. E. & Germida, J. J. (1999). *Assessment of Phytoremediation as an In-Situ technique for cleaning oil-contaminated sites*. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/228592129_Assessment_of_phytoremediation_as_an_in-situ_technique_for_cleaning_oil-contaminated_sites
- Funes, F., Monzote, M. y Marrero, R. (2003). *Maní (Arachis hypogaea L.). Manual de producción de oleaginosas*. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes, La Habana, Cuba.
- Gan S., Lau, E.V. & Ng, H.K. (2009). Remediation of soil contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials*. 172, 532-549.
- Germida, J. J., Frick, C. M. & Farrell, R. E. (2002). Phytoremediation of Oil-Contaminated Soils. *Developments in Soil Science*, 169-186. doi.org/10.1016/S0166-2481(02)80015-0
- Giambastiani, G. (2000). *Cultivo de Maní*. Recuperado de <http://agro.unc.edu.ar/~ceryol/documentos/mani/mani.pdf>
- Giovannetti, M. & Mosse, B. (1980). An evaluation of techniques for measuring vesicular arbuscular mycorrhizal infection in roots. *New Phytol*, 84, 489-500. 10.1111/j.1469-8137.1980.tb04556.x
- Giovannetti, M., Sbrana, L. A., Citernes, A.S. & Logi, C. (1993). Differential hyphal morphogenesis in arbuscular mycorrhizal fungi during pre-infection stages. *New Phytologist*, 125, 587-593. 10.1111 / j.1469-8137.1993.tb03907.x
- Gonzales, P. J., Pérez, G., Medina, N., Crespo, G., Ramírez, J. & Arzola, J. (2012). Coinoculación de cepas de rizobios y una cepa de hongo micorrízico arbuscular (*Glomus cubense*) y su efecto en kudzú (*Pueraria phaseoloides*). *Revista Cubana de Ciencia Agrícola*. 46(3), 331-334. Recuperado de: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193025294017>
- García-Cuesta, G. J. (2010) *Boletín micológico Lazarillo* (5-12). Salamanca: Sociedad Micológica Salmantina "Lazarillo". Recuperado de <http://asociacionvallisoletanademicrologia.com/wordpress/wp-content/uploads/2015/03/dcbbb57d0287cb818dc253826b09b32e.pdf>
- Graham, J. H. & Miller R., M. (2005). Mycorrhizas: to function, *Plant and Soil*, 274: 04, 49-100. Recuperado de: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/32889/38347>
- Guadarrama-Chávez, P., Sánchez-Gallén, I., Ramos-Zapata, J. & Hernández-Cuevas, L. (2008). *Infectividad, Efectividad y dependencia micorrízica. Técnicas de estudio de las asociaciones micorrízicas y sus implicaciones en la restauración. Las prensas de*

- las ciencias* (Tesis de grado). Universidad Nacional Autónoma de México, México D. F.
- Gunther, T., Dornberger, V. & Fritsche, W. (1996). Effects of ryegrass on biodegradation of hydrocarbons in soil. *Chemosphere*, 33 (2), 203-215. doi.org/10.1016/0045-6535(96)00164-6
- Harrison, M. J. (1997). The arbuscular mycorrhizal symbiosis: an underground association. *Trends in Plant Science*. 2 (2). 54-60. doi.org/10.1016/S1360-1385(97)82563-0
- Harley, J. L. & Smith, S. E. (1983). *Mycorrhizal Symbiosis*. London, UK: Academic Press Inc.
- Hegde, R. S. & Fletcher, J. S. (1996). Influence of plant growth stage and season on the release of root phenolics by mulberry as related to development of phytoremediation technology. *Chemosphere*, 32 (12), 2471-2479. doi.org/10.1016/0045-6535(96)00144-0
- Hernández-Acosta, E., Rubiños-Panta, J. E. & Alvarado-López, J. (2004). *Restauración de suelos contaminados con hidrocarburos: conceptos básicos*. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/272679969>
- Hernández-Cueva, L., Castillo-Aequero, S., Guadarrma-Chávez, P., Martínez-Orea, Y., Romero-Romero, M. A., & Sanchez-Gallén, I. (2003). Hongos Micorrizogenos Arbusculares del Pedregal de San Angel. Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=XYHFZOepKXgC&pg=PA68&lpg=PA68&dq=Simbionte:+Nombre+dado+a+cada+uno+de+los+mienbros+de+una+simbiosis&source=bl&ots=GKaeQBmkbW&sig=BFYAnnY80FW0GNdHxFasZo3Bvo&hl=es-419&sa=X&ved=0ahUKEwiL8N-1mdLbAhWyxVkkHW9aDmAQ6AEIQzAC#v=onepage&q=Simbionte%3A%20Nombre%20dado%20a%20cada%20uno%20de%20los%20miembros%20de%20una%20simbiosis&f=false>
- Hernández, R. I. (2013). *Tecnologías para la restauración de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Veracruzana. Tuxpan, México.
- Heredia, G., Túchez, J. O., Díaz, M. R. & Ardón, C. D. (1989). *Generación de Tecnología apropiada para el cultivo del Maní (Arachis hypogaea L.) en la región Nor-oriental de Guatemala*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Howe, G. M. (1996). *Petroleum encyclopedia of chemical technology*. (4ta ed.) New York, USA: Wiley Interscience Publication.
- Huang, P. M. (1990). Role of soil minerals in transformations of natural organics and xenobiotics in soil. *En Soil Biochemistry*, 29-115.
- Huang, J.W., Chen, J.J., Berti, W.B., Cuningham, S.D., 1997. "Phytoremediation of lead-contaminated soils: role of synthetic chelates in lead phytoextraction". *Environmental Science & Thecnology*, 31: 800-805.

- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (1989). *Compendio de Agronomía Tropical*. (Tomo II). San Jose: Servicio editorial IICA
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura [IICA]. (2009). Guía Técnica para el cultivo de Frejol. Nicaragua. Recuperado de <http://repiica.iica.int/DOCS/B2170E/B2170E.PDF>
- Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola [ICTA]. (2010). *Manual de Producción Comercial y de Semilla de Frejol (Phaseolus Vulgaris L.)*. Recuperado de <http://www.icta.gob.gt/granosBasicos/produccionSemillaFrejol.pdf>
- Jakoby, W. & Ziegler, D. (1990). The enzymes of detoxication. *Journal of Biological Chemistry*, 265 (34), 20715-20718. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov.https.sci-hub.tv/pubmed/2249981>
- Joner, E. J., & Leyval, C. (2001). Influence of arbuscular mycorrhiza on clover and ryegrass grown together in a soil spiked with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Mycorrhiza*, 10(4), 156-159. doi: 10.1007/s005720000071
- Joner, E. J., Johansen, A., Loibner, A. P., De la Cruz, M. A., Solar, O.H., Portal, J. M., & Leyval, C. (2001). Rhizosphere Effects on Microbial Community Structure and Dissipation and Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Spiked Soil. *Environ. Sci Technol*, 35 (13), 2773-2777. 10.1021/es000288s
- Joner, E. J., & Leyval, C. (2003), Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in two Industrial Soils and the Impacto of Arbuscular Mycorrhiza.
- Joner, E. J., & Leyval, C. (2003). Rhizosphere Gradients of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Two Industrial Soils and the Impact of Arbuscular Mycorrhiza. *Environ. Sci. Technol*, 37(11), 2371-2375. 10.1021/es020196y
- Jones, R. K., Sun, W. H., Tang, C. & Robert, F. M. (2004). Phytoremediation of Petroleum Hydrocarbons in Tropical Coastal Soils. Part II: Response to Plant Roots and Contaminant. *Environmental Science & Pollution Research*, 11 (5), 340-341.
- Khan, S.R., Kumar, N. J. I., Kumar, N. R. & Patel, G. J. (2013). An assessment of physicochemical properties, heavy metal content and fungal characterization of an old gasoline-contaminated soil site Anand, Gujarat, India. *Int. J. Environ.* 2 (1), 137-143. DOI: 10.3126/ije.v2i1.9219
- Karma, A. (1993). Chemical properties of organic soils. In: Soil sampling and methods of analysis. Martin R. Carter Editor. Canadian Society of Soil Science. Lewis Publishers. 459-471.
- Kästner, M., Breuer-Jammali, M., & Mahro, B. (1998). Impact of Inoculation Protocols, Salinity, and pH on the Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)

- and Survival of PAH-Degrading Bacteria Introduced into Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 359–362.
- Kvesitadze, G., Gordeziani, M., Khatisashvili, G., Sadunishvili, T. & Ramsden, J. (2001). Some aspects of the enzymatic basic of phytoremediation. *Journal of Biological Physics and Chemistry*, 1, 49-57. doi.org/10.1006/eesa.1996.1448
- Liu, S. L., Luo, Y. M., Cao, L. H., Ding, K. Q., & Christie, P. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*, 26 (2), 285-293. 10.1023/B:EGAH.0000039592.80489.e5
- Liu, A. & Dalpé, Y. (2009). Reduction in soil polycyclic aromatic hydrocarbons by arbuscular mycorrhizal leek plants. *International Journal of Phytoremediation*, 11 (39), 39 -52. 10.1080/15226510802363444
- Llanos, C. (2012). *Eficiencia de la biorremediación de suelos contaminados con petróleo por bacterias nativas en el distrito de Pimentel, departamento de Lambayeque, 2011. (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo, Lambayeque, Perú.*
- Loforte, R. (2007). *Evaluación agronómica de líneas de frejol común (Phaseolus Vulgaris L.) fortificadas en los sistemas locales de producción en el municipio de Mayari, provincia de Holguin. (Tesis de grado). Centro Universitario Vladimir I Lenin. Las Tunas, Cuba.*
- López, S., Gallegos, M. E., Pérez, L. J. & Gutiérrez R., M. (2005). Mecanismos de Fitorremediación de suelos contaminados con Moléculas orgánicas Xenobióticas. *Revista internacional Contaminación Ambiental*, 21 (2), 91-100.
- Marschner, H. & Dell, B. (1994). Nutrient Uptake in Mycorrhizal Symbiosis. *Plant and soil*, 159, 89-102. 10.1007/BF000000098
- Matsubara, Y. & Harada, H. (1996). Effect of constant and diurnally fluctuating temperatures on arbuscular mycorrhizal fungus infection and growth of infected asparagus (*Asparagus officinalis* L.) seedlings. *Journal Japan Society for Horticultural Science*, 65, 565-570.
- Martinez, V. & López, F. (2001). Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*, 19, 9-17.
- Martin-Rodriguez, J. A. (2013). *Estudios del papel del ácido abscísico como señal reguladora del proceso de Micorrización. (Tesis de doctorado). Universidad de Granada. Granada, España.*
- Marsh, B. (1971). Measurement of length in random arrangements of lines. *Journal of Applied Ecology*, 8, 205–207.
- McGill, W., Rowell, M. & Westlake S. (1981). *Biochemistry ecology and microbiology of petroleum components soil. Soil Biochem.* Recuperado de <https://books.google.com.pe/books?id=qtYC715zIboC&pg=PA229&lpg=P>

A229&dq=Biochemistry+ecology+and+microbiology+of+petroleum+components+soil&source=bl&ots=Qew5TkoH3u&sig=N_9IEhyniT0CsbJMKamEotOV7sE&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwi6j7_zwbzYAhXKYd8KHb6UBY4Q6AEIOzAC#v=onepage&q=Biochemistry%20ecology%20and%20microbiology%20of%20petroleum%20components%20soil&f=false

- Medina, L. R., Rodríguez, Y., Torres, Y. & Herrera, R. (2010). Aislamiento e identificación de hongos micorrizicos arbusculares nativos de la zona de las caobas, Holguín. *Cultivos Tropicales*, 31 (3). Recuperado de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362010000300014&lng=es&tlng=es
- Mendoza Z., H., Linzan M., L. & Guamán J., R. (2005). *El Maní tecnología de manejo y usos* (16-28). Guayaquil: Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP).
- Meneses, R.; Waijenber, G.; Piérola, L. (1996). Las fabáceas en la agricultura Boliviana. Proyecto de Bolivia. CIAT-CIF-PNLG-CIFPWAU. Cochabamba, Bolivia. pp. 254-256.
- Miller, S.P. (2000). Arbuscular mycorrhizal colonization of semi-aquatic grasses along a wide hydrologic gradient. *New Phytologist*, 145, 145-155. 10.1046 / j.1469-8137.2000.00566.x
- Ministerio de Agricultura, Pesca, Alimentación y Medio Ambiente [MAGRAMA] (2016). El petróleo y su comportamiento. Recuperado de http://www.mapama.gob.es/es/costas/temas/proteccion-medio-marino/plan-ribera/contaminacion-marina-accidental/petroleo_y_comportamiento.aspx
- Montaño, N. M., Camargo R., S. L., García S., R., & Monroy A. (2007) Micorrizas Arbusculares en ecosistemas áridos y semiáridos. Instituto Nacional de Ecología-SEMARNAT, México.
- Moreno, M. L., López, C. R., Zavala, M. C., Velázquez, F. & Hernández, O. D. (2015). *Tipos de biorremediación de suelos contaminados* (pp. 2-9). Colombia: Nas Jomé.
- Naturland (2000). *Maní (Cacahuete)*. Recuperado de https://azueroproject.org/wp-content/uploads/2013/07/A.C1015_Augstburger_2000_spa.pdf
- Nwoko, C. O., Okeke, P. N., Agwu, O. O. & Akpan, I. E. (2007). Performance of *Phaseolus vulgaris* L. in soil contaminated with spent-engine oil. *African journal of biotechnology*, 6 (16), 1922-1925. 10.5897/AJB07.275
- Nwoko, C. O., Okeke, P. N. & Ogbonna, P. (2013). Influence of soil particle size and Arbuscular Mycorrhizal Fungi (AMF) in the performance of *Phaseolus vulgaris* grown under Crude Oil contaminated soil. *Universal Journal of Enviromental Research and Technology*. 3(2), 300-310.
- Nwoko, C. O., (2014). Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the physiological performance of *Phaseolus vulgaris* grown under Crude Oil contaminated soil.

- Qiu, T. W., Leland, T. W. Shah, S. L., Sorensen, D. L. & Kendall, E. E. (1997). Field Study: Grass remediation for clay soil contaminated with Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants Symposium*, 1, 186-199. 10.1021/bk-1997-0664.ch014
- Ojuederie, O. B.; Babalola, O. O. (2017). Microbial and Plant-Assisted Bioremediation of Heavy Metal Polluted Environments: A Review. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 14, 1504. <https://doi.org/10.3390/ijerph14121504>
- Orchard, J., Doucette, J., Chard, K. & Bugbee, B. (2000). Uptake of Trichloroethylene by Hybrid Poplar Trees Grown Hydroponically in Flow-Through Plant Growth Chambers. *Environmental Toxicology Chemical*, 19 (4), 895-903. 10.1002/etc.5620190416
- Ortínez, B., Oscar, Ize, L., I. & Gavilan, A. (2003). La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica*, 69, 83 - 92. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=53906906>
- Ortiz-Cano, H., Trejo-Calzada, R., Valdez-Cepeda, R., Arreola-Ávila, J., Flores-Hernández, A., & López-Ariza, B. (2009). Fitoextracción de plomo y cadmio en suelos contaminados usando Quelite (*Amaranthus hybridus* L.). *Revista chapingo serie horticultura*, 15(2), 164. Disponible en: http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=Spid=S1027-152X2009000200009
- Quilambo, O. A. (2003). The vesicular-arbuscular mycorrhizal symbiosis. *African Journal of Environmental*, 2, 539-546.
- Paleari, M. L. (2015). Maní: una fruta subterránea. Recuperado de <http://luciamariapaleari.blogspot.com/2015/12/amendoim-o-fruto-subterraneo-por-lucia.html>
- Paszkowski, Uta. (2006). A journey through signaling in arbuscular mycorrhizal symbioses. *New Phytologist*, 172, 35-46.
- Pedelini, R. (2012). Maní: Guía práctica para su cultivo. *Boletín de divulgación técnica*, 2 (2), 2-20.
- Perez, A., B., Castañeda, D., Castellanos, G., Jiménez, T., Tapia, A. & Martínez, D. (2011). Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frejol. *Terra latinoamericana*, 29 (1), 95-102.
- Pérez, C. A., Rojas, S. J., Montes, M. & Donicer, V. (2011). Hongos formadores de micorrizas arbusculares: una alternativa biológica para la sostenibilidad de los agroecosistemas de praderas en el Caribe Colombiano. *Revista Colombiana ciencias Animal*. 3 (2), 366-385.

- Petro C., P. H. & Mercado M., G. (2014). *Biorremediación de suelos contaminados por derrames de hidrocarburos derivados del petróleo en Colombia*. (Tesis de grado). Universidad de San Buenaventura. Cartagena, Colombia.
- Philips, M. J. & Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular- arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions British Mycological Society*, 55 (1). 158 - 161. doi:10.1016/S0007-1536 (70) 80110-3
- Pineda-Hernández, R. (2004). *Presencia de hongos micorrizicos arbusculares y contribución de Glomus intraradices en la absorción y translocación de zinc y cobre en girasol (Helianthus annuus L.) creciendo en un suelo contaminado con residuos de mina*. (Tesis doctoral). Universidad de Colima, Tecomán, Colima. Recuperado de http://digeset.ucol.mx/tesis_posgrado/Pdf/Rosario%20Pineda%20Hernandez%20rot20doctorado.pdf
- Pivetz, B., Cochran, R. & Huling, S. (1997). *Phytoremediation of PCP and PAH – contaminated soil*. Recuperado de <https://www.engg.ksu.edu/HSRC/97abstracts/p54.html>
- Pons, J. M. (2010). *Extracción de hidrocarburos y compuestos derivados del petróleo en suelos agrícolas de la cuenca baja del río Tonalá*. (Tesis de maestría). Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, México.
- Por qué Biotecnología [PQB] (2003). *Biorremediación: organismo que limpian el ambiente*. Argentina.: ArgenBio. Recuperado de <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=¬e=36>
- Pulgarin, P. M. (2012). *Evaluación de la fitoremediación como alternativa de tratamiento de sedimentos contaminados con hidrocarburos procedentes de las estaciones de servicio en Risaralda* (Tesis de maestría). Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira. Recuperada de <http://biblioteca.versila.com/?pagination=1&q=estaciones%20de%20servicio&publisher=Universidad%20Tecnol%C3%B3gica%20de%20Pereira;%20Facultad%20de%20Ciencias%20Ambientales>
- Rajtor, M. & Piotrowska, S. (2016). Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. 62. 105-16/j.chemosphere.2016.07.071.
- Reynolds, C. M. & Wolf, D. C. (1999). Microbial based strategies for assessing rhizosphereenhanced phytoremediation. *Proceedings of the Phytoremediation Technical Seminar*. 125-135. Recuperado de: https://inis.iaea.org/search/search.aspx?orig_q=RN:31004294
- Ríos-Vázquez, R. R. (2005). *Estudios de la estimulación biológica para el tratamiento de perforación petrolera empleando lisímetros*. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

- Rodriguez R. J., Redman R. S. y Henson J. M. (2004). The role of fungal symbioses in the adaptation of plants to high stress environments. *Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change*, 9: 261-272.
- Rossini, D. F. (1960). Hydrocarbons in Petroleum. *Journal of Chemical Education*, 37 (11), 554 - 561. 10.1021/ed037p554
- Rotkittikhun, P., Chaiyarat, R., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. y Baker, A.J.M. (2007). Growth and lead accumulation by the grasses *Vetiveria zizanioides* and *Thysanolaena maxima* in lead-contaminated soil amended with pig manure and fertilizer: A glasshouse study. *Chemosphere* 66, 45-53.
- Rowntree, D. (1984). *Introducción a la estadística: un enfoque no matemático*. Bogota: Norma, p.2. Recuperado de: <http://academia.utp.edu.co/seminario-investigacion-II/files/2017/03/06a.An%C3%A1lisisDeCorrelaciones.pdf>
- Safir, G. R. & Duniway, J. M. (1991). Evaluation of plant response to colonization by vesicular – arbuscular mycorrhizal fungi, environmental variables. En: *Methods and Principles of mycorrhizal research*
- Sanderman, H. (1992). Plant metabolism of xenobiotics. *Trends in Biochemical Sciences*, 17, 82-84. doi.org/10.1016/0968-0004(92)90507-6
- Sarmiento, C., L. M. (2013). *Evaluación agronómica de un cultivar de maní (Arachis hypogaea L.) tipo valencia en el valle de Casanga, provincia de Loja*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Loja, Loja, Ecuador.
- Scheneider, D. R. & Billingsley, W. A. (1990). *Bioremediation. A desk manual for the environmental professional*. EE.UU: Cahners Publishing.
- Schäffer, A., Messner, F., Langebartels, C. & Sanderman, H. (2002). Genes and enzymes for in- plant phytoremediation of air waste and soils. *Acta Biotechnology*, 22, 141-152. doi.org/10.1002/1521-3846(200205)22:1/2<141::AID-ABIO141>3.0.CO;2-7
- Schüßler, A. (2016). *Catalogue of life*. Recuperado de <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/14e6cc99ae7630cc61c360a8b69cffb8>
- Schnoor, J. L. (2002). Ground-water remediation technologies analysis center GWRTAC Phytoremediation of soil and groundwater. 2(1), 19-24. Disponible en http://www.gwrtac.org/pdf/phyto_e_2002.pdf.
- Senesi, N. (1993). Organic pollutant migration in soils as affected by soil organic matter. molecular ad mechanistic aspects. *Migration and fate of pollutants in soils and subsoils*, 6. doi.org/10.4141/S96-046
- Sharma, N., Yadav, K. and Aggarwal, A. (2016). Growth response of two *P. mungo* L. cultivars induced by Arbuscular mycorrhizal fungi and *T. viride*. *Int. J. Agron.*, 10.1155/2016/1524304.

- Siciliano S., Germida J., Banks K. & Creer C. (2003). *Changes in microbial community composition and function during a polyaromatic hydrocarbon*. 10.1128/AEM.69.1.483-489.2003
- Simonich, S. L. & Hites, R. A. (1995). Organic pollutant accumulation in vegetation. *Environmental Science & Technology*. 29 (12), 2905-2913. 10.1021/es00012a004
- Smith, S. E., & Read, D. J. (1997). Mycorrhizal Symbiosis. Recuperado de https://books.google.com.pe/books?id=v9V8cH0mPS4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q=Phylum&f=false
- Smith, S. E., Gianiazzi-Pearson, V., Koide, R. & Cairney, J. W. G. (1994). Nutrient Transport in Mycorrhizas: Structure, Physiology and Consequences for Efficiency of the Symbiosis, *Plant and Soil*, 159, 103-113.
- Strullu, D. G., Perrin, R. & Plenchette, C. (1991). *Le mycorhizes des arbres et plantes cultivées*. Paris: Technique et Documentation- Lavoisier.
- Socorro, M. A. & Martín, D. S. (1989). *Frejol. (Eds.). Granos*. La Habana: Pueblo y Educación.
- Solís, L. P. (2005). *"Degradación de petróleo por hongos aislados desde suelos de la XII región Chile contaminados con hidrocarburos"*. (Tesis de grado). Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile. Recuperado de: <http://cybertesis.uach.cl/tesis/uach/2005/fcs687d/pdf/fcs687d.pdf>
- Swannell, R., Lee, K. & McDonagh, M. (1996). Field evaluations of marine oil spill Bioremediation. *Microbiological Reviews*. 60 (2), 342-365. Recuperado de: <http://mmbr.asm.org/content/60/2/342>.
- Tang, M., Chen, H., Huang, J. C., Tian, Z. Q. (2009). AM Fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedings under diesel stress. *Soil Biology & Biochemistry*. 41. 936 - 940. 10.1016/j.soilbio.2008.11.007
- Torres, D. K. & Zuluaga, M. T. (2009). *Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos*. (Tesis de grado). Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia.
- Valladares, C. A. (2010). *Taxonomía y botánica de los cultivos de Grano*. Recuperado de http://institutorubino.edu.uy/materiales/Federico_Franco/6toBot/unidad-ii-taxonomia-botanica-y-fisiologia-de-los-cultivos-de-grano-agosto-2010.pdf
- Vázquez-Luna, D., Castelán-Estrada, M., Rivera-Cruz, M. C., Ortiz-Ceballos, A. I. & Izquierdo, R. F. (2010). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambie*. 26 (3), 183-191.
- Verdín, A., Sahraoui, A., Lounés-Hadj, S. A., Fontaine, J., Grandmougin F., A. & Durand, R. (2006). Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus

and contribution of the symbiotic association to pollutant dissipation. *Mycorrhiza*, 26, 397-405.10.1007/s00572-006-0055-8


- Villegas-Velázquez, I. (2011). *Respuestas de Leucaena leucocephala en simbiosis con Rizobium y/o Micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno.*(Tesis de Maestra) Institución de enseñanza e investigación en ciencias agrícolas, Mexico. Recuperada de <http://hdl.handle.net/10521/516>
- Wauquier, J. (2004). *El Refino del Petróleo: Petróleo crudo, productos petrolíferos esquemas de fabricación.* Recuperado de <http://www.editdiazdesantos.com/libros/wauquier-jp-el-refino-del-petroleo-petroleo-crudo-productos-petroliferos-esquemas-de-fabricacion-C03006230103.html#contenido>.
- White, J. C. & Newman, L. A. (2011). Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Biophysico-Chemical Processes of Anthropogenic Organic Compounds in Enviromental Systems*. 1, 503-516.
- White, J. W. (1985). *Conceptos Básicos de fisiología del frejol.* 43-59. Recuperado de <https://cgspace.cgiar.org/bitstream/handle/10568/81995/conceptos-708bacf3.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Yateem, A., Balba, M. T., El-Nawawy, A. S. & Al-Awadhi, N. (2000). Plants-associated microflora and the remediation of oil-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*. 2 (3), 183-191. doi.org/10.1080/15226510009359031
- Yu, X. Z., Wu, S. C., Wu, F. Y. & Wong, M. H. (2011). Enhanced dissipation of PAHs from soil using mycorrhizal ryegrass and PAH-degrading bacteria. *Journal of Hazardous Materials*. 186.1206 - 1217. 10.1016/j.jhazmat.2010.11.116
- Yzarra, W. J., López, F. M. (2011). *Manual de observaciones fenológicas.* Lima: MINAM-SENAMHI.
- Xu, J. G. & Johson, R. L. (1997). Nitrogen dynamics in soil with difeferent hydrocarbon contensnts planted to bamey and field pea. *Canadian Journal of Soil Science*. 77, 453-458. Recuperado de <http://nrcresearchpress.com>
- Zhou, X., Zhou, J., Xiang, X., Cébron, A., Béguiristain, T., & Leyval, C. (2013). Impact of Four Plant Species and Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (PAH) Dissipation in Spiked Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 22(4), 1239-1245. Recuperado de <http://connection.ebscohost.com/c/articles/89593253/impact-four-plant-species-arbuscular-mycorrhizal-am-fungi-polycyclic-aromatic-hydrocarbon-pah-dissipation-spiked-soil>

TERMINOLOGÍA


- **Espora:** Cuerpo reproductor muy pequeño de algunos microorganismos (Centro Internacional de Agricultura Tropical [CIAT], 2000).
- **Micorrizas:** Es la asociación simbiótica entre las hifas de un hongo y las raíces y/o rizoma de una planta, en la cual ambos simbioses obtienen un beneficio mutuo (Hernández et al., 2003).
- **Micelio:** Es la estructura y agregado de hifas que posee un hongo (Hernández et al., 2003).
- **Infectividad:** Es la capacidad de los hongos micorrizógenos de colonizar la raíz de una planta. (Guadarrama, Sanchez, Ramos y Hernández, 2008).
- **Simbiosis:** Vida en común de dos o más organismos (Hernández et al., 2003).
- **Efectividad:** La habilidad de los hongos micorrizógenos para estimular el crecimiento de la planta hospedera (Guadarrama et al., 2008).
- **Simbionte:** Nombre dado a cada uno de los miembros de una simbiosis (Hernández et al., 2003).
- **Propágulo:** Cualquier estructura o parte de un organismo capaz infectar un hospedero (CIAT, 2000).
- **Micorrízico:** Relativo o perteneciente de la micorriza (Hernández et al., 2003).
- **Rizosfera:** Zona alrededor de la raíz de la planta en la cual la actividad microbiana es muy alta (CIAT, 2000).

- **Frejol:** Es una planta herbácea, cuyo nombre científico es *Phaseolus vulgaris*, perteneciente a la familia de la Leguminoseae (CIAT, 1980).
- **Maní:** Es una planta herbácea perteneciente a la familia de las fabáceas (fabáceas), se caracteriza por sus frutos en forma de vainas con varias semillas y sus frutos crecen bajo el suelo (Álava, 2012).
- **Petróleo crudo:** Es un líquido negro, viscoso y con una composición química sumamente compleja, pudiendo contener miles de compuestos, básicamente de la familia de los hidrocarburos (Rossini, 1960).
- **Vermiculita:** Es un mineral empleado como sustrato en la horticultura, debido a sus características macroscópicas (Dickson, 1981).

Apéndice 2. Ficha técnica de la muestra de petróleo crudo

Nombre de la empresa		BPZ-EQP S.R.L/PACIFIC RUBIOLES	
Estación de Evaluación	Refinería Talara-Estación Corvina	Fecha de muestreo	01/03/2016
Tipo de muestra	Petróleo crudo	Inspector	Luis contreras
Lugar	Planta Refinería Talara-Piura	Entregado a:	SGS
Nombre de embarcación	BIT=REVEL	Muestra identificada	08420
			
Departamento: PIURA			
Provincia: TALARA			
Distrito: TALARA			
<u>Observaciones:</u>			
El presente monitoreo se realizó a las 10:00 hrs. el día 01 de Marzo del 2016.			


Apéndice 3. Ficha técnica de la MYCOSYM TRI-TOM[®]

 Plant Vitalizing Systems	
MYCOSYM TRI-TON [®]	Especificaciones de Producto
Componente activo	Glomus intraradices (hongo micorrizico arbuscular)
Contenido activo	Minimo 200 IMP / ml (= 650 IMP/g) (IMP = Infective Mycorrhizal Propagules = esporas + hifas + fragmentos de raices micorrizadas) Método MYCOSYM AM-005 de los cuales : Minimo 50 esporas vivas / ml (= 150 esporas/g) Método MYCOSYM AM-002
Sustrato inerte	Arcilla expandida Light Weight Expanded Clay Aggregate (LECA)
Granulometría	< 4 mm
Densidad aparente	270 - 300 Kg/m ³
Humedad	Max. 6 % p/p
Fertilizantes	
N-amoniacal	<0.01%
N-nitrico	<0.01%
Fósforo	<0.01%
Potasio	<0.01%
Otros Parámetros	
pH	7.0 - 8.5
Carbón orgánico t (TOC)	<0.01%
Capacidad de intercambio iónico	<10 mmol/Zl (1mval/l)
Información adicional:	
Uso del producto:	para todas las plantas que forman la simbiosis endomicorrizica de tipo arbuscular.
Conservación:	se puede almacenar en su envase original cerrado durante al menos 2 años. Conservar en condiciones secas, evitar exponer directamente a la luz solar, evitar altas temperaturas.
Seguridad:	el producto no se disuelve en agua, no es explosivo, no es inflamable.
Productor:	MYCOSYM-TRITON S.L. Riógordo (Málaga), España.
<small>® -Marcas registradas de MYCOSYM Edición 2014</small>	

Apéndice 4. Protocolo de ensayo de nitrógeno total (N)

Nitrógeno (total)

No. del programa **35** 


a xylem brand

WTW Modelo No.: 14537
Categoría: KT (ensayo de reactivos con cubeta)
Cubeta: 16 mm
Rango de medición: 0,50 – 15,00 mg/l N

Observación: Antes de ejecutar por primera vez, determinar el valor en blanco del reactivo.



Agregar 10,0 ml de muestra en una cubeta vacía.



Agregar 1 cuchara micrométrica azul rasa de N-1K.



Añadir 6 gotas de N-2K y cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar.




Calentar la cubeta en la unidad térmica durante 1 hora a 120 °C.



Colocar la cubeta nuevamente en el soporte y dejar que se enfríe a temperatura ambiente (=muestra preparada).



Añadir 1 cuchara micrométrica azul rasa de N-3K en una cubeta de reacción y cerrar la cubeta con el tapón roscado.



Sacudir la cubeta energicamente durante **1 minuto para disolver el material sólido**.



Agregar muy lentamente 1,5 ml de la muestra preparada con la pipeta, cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar energicamente. **Cuidado, la cubeta se calienta mucho!**



Dejar en reposo durante 10 minutos.



Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.

Observaciones:

- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Las soluciones de la muestra y los reactivos deben tener una temperatura de 20-25 °C. En caso necesario, tempere a la temperatura adecuada.
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.

Apéndice 5. Protocolo de ensayo de fosfato (P)

Fosfato

No. del programa

23



a xylem brand

WTW Modelo No.:	14848
Categoría:	RT (ensayo de reactivos)
Cubeta:	16 mm
Rango de medición:	0.05 - 3.00 mg/l PO ₄ -P
	0.15 - 9.20 mg/l PO ₄
	Indicación posible en mmol/l



Verificar el valor pH de la muestra.
Rango nominal: pH 0-10.
En caso necesario, corregir con ácido clorhídrico diluido.



Llenar con una pipeta 5,0 ml de la muestra en una cubeta vacía.



Agregar 5 gotas de PO₄-1 y mezclar.



Agregar 1 cuchara micrométrica azul rasa de PO₄-2 y cerrar la cubeta con el tapón rosado.



Sacudir enérgicamente para diluir las sustancias sólidas.



Dejar en reposo durante 5 minutos.



Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.

Observaciones:

- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Este ensayo cubre únicamente el ortofosfato.
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.

Apéndice 6. Protocolo de ensayo de potasio (K)

Potasio

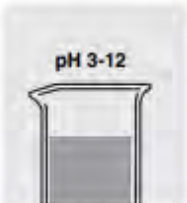
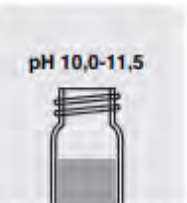



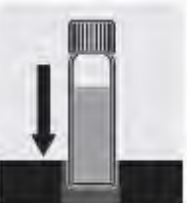
No. del programa

56



WTW Modelo No.:	14562
Categoría:	KT (ensayo de reactivos con cubeta)
Cubeta:	16 mm
Rango de medición:	5,00 - 50,00 mg/l K
	Indicación posible en mmol/l

Observación: Antes de ejecutar por primera vez, determinar el valor en blanco del reactivo.

				
Filtrar las soluciones turbias.	Verificar el valor pH de la muestra. Rango nominal: pH 3-12. En caso necesario, corregir con lejía de sosa diluida o con ácido sulfúrico diluido.	Llenar con una pipeta 2,0 ml de la muestra en una cubeta de reacción, cerrar con el tapón roscado y mezclar.	Verificar el valor pH de la muestra. Rango nominal: pH 10,0-11,5.	Agregar 6 gotas de K-1K, cerrar la cubeta con el tapón roscado y mezclar.
				
Agregar 1 cucharita micrométrica azul rasa de K-2K y cerrar la cubeta con el tapón roscado.	Sacudir enérgicamente la cubeta para diluir las sustancias sólidas.	Dejar en reposo durante 5 minutos exactamente. A continuación, medir inmediatamente.	Colocar la cubeta en el compartimiento del fotómetro e iniciar la medición.	

Observaciones:

- La turbiedad de la solución de medición permanece estable sólo por breve tiempo (El valor de medición aumenta cada minuto en un 5 - 7 %.).
- Recomendamos, por cada paquete abierto de un juego de ensayos, determinar el nuevo valor en blanco de reactivos (agua desionizada, en lugar de la muestra).
- Vea más detalles en el papel informativo en el empaque del test.

Apéndice 7. Valores de porcentaje de CM-PC-1% en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	60 días			90 días		
	%Colonización	Promedio	Desviación	% Colonización	Promedio	Desviación
T2	6,90	6,97	0,9534	18,92	17,92	0,7157
	8,33			17,24		
	6,38			17,65		
	6,25			17,86		
T3	16,67	16,45	0,4386	26,09	27,02	0,7113
	16,67			27,78		
	15,79			27,27		
	16,67			26,92		
T5	24,14	24,80	0,8533	35,42	34,96	0,4815
	25,00			35,14		
	25,93			35,00		
	24,14			34,29		
T6	33,33	34,14	0,5412	38,71	38,79	0,3495
	34,48			38,71		
	34,38			38,46		
	34,38			39,29		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 8. Porcentaje de petróleo crudo extraído en el suelo por el método Soxhlet a los 60 y 90 días en los diferentes tratamientos

Periodo	PC inicial (%)	PC extraído 60 días (%)	PC diferencia 60 días (%)	PC extraído 90 días (%)	PC diferencia 90 días (%)
T1	1	0.755	0,245	0.646	0,354
T2	1	0.475	0,525	0.348	0,652
T3	1	0.472	0,528	0.259	0,741
T4	1	0.752	0,248	0.436	0,564
T5	1	0.546	0,454	0.379	0,621
T6	1	0.369	0,631	0.140	0,860

Fuente: Elaboración propia.

PC: Petróleo crudo

Apéndice 9. Valores de porcentaje de reducción de PC-1% en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	60 días			90 días		
	% reducción	Promedio	Desviación	% reducción	Promedio	Desviación
T1	27,50	24,5	2,78	34,40	35,42	2,38
	25,20			32,60		
	24,60			36,80		
	20,80			37,90		
T2	51,90	52,5	1,55	60,20	65,24	3,97
	54,40			65,60		
	52,80			69,90		
	50,70			65,20		
T3	46,80	52,8	5,20	74,70	74,05	1,57
	52,70			71,70		
	52,00			75,10		
	59,50			74,70		
T4	28,40	24,8	2,74	59,90	56,40	3,28
	22,60			57,60		
	25,40			56,00		
	22,70			52,10		
T5	48,90	45,35	3,96	58,20	62,10	3,20
	48,60			61,10		
	42,60			63,40		
	41,30			65,70		
T6	62,30	63,07	1,44	93,80	86,00	6,20
	63,30			81,10		
	65,00			88,20		
	61,70			80,90		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 10. Valores de pH en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	R	60 días			R	90 días		
		PH	Promedio	Desviación		PH	Promedio	Desviación
T1	R1	8,23	8,20	0,056	R1	8,47	8,39	0,123
	R2	8,09			R2	8,14		
	R3	8,23			R3	8,45		
	R4	8,26			R4	8,48		
T2	R1	8,23	8,20	0,040	R1	8,0	8,13	0,288
	R2	8,12			R2	8,54		
	R3	8,19			R3	8,3		
	R4	8,24			R4	7,69		
T3	R1	8,07	8,12	0,049	R1	8,33	8,41	0,107
	R2	8,10			R2	8,62		
	R3	8,10			R3	8,30		
	R4	8,22			R4	8,37		
T4	R1	8,18	8,26	0,050	R1	8,4	8,51	0,065
	R2	8,36			R2	8,52		
	R3	8,26			R3	8,62		
	R4	8,24			R4	8,48		
T5	R1	8,09	8,26	0,090	R1	8,4	8,66	0,129
	R2	8,37			R2	8,84		
	R3	8,25			R3	8,68		
	R4	8,33			R4	8,71		
T6	R1	8,21	8,25	0,090	R1	8,50	8,55	0,128
	R2	8,30			R2	8,6		
	R3	8,10			R3	8,35		
	R4	8,37			R4	8,76		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 11. Valores de nitrógeno total (N) en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	R	60 días			R	90 días		
		N	Promedio	Desviación		N	Promedio	Desviación
T1	R1	11,20	11,03	0,09	R1	16,60	16,33	0,28
	R2	11,00			R2	16,00		
	R3	10,90			R3	16,60		
	R4	11,00			R4	16,10		
T2	R1	9,80	9,78	0,088	R1	14,30	14,23	0,075
	R2	9,60			R2	14,20		
	R3	9,80			R3	14,10		
	R4	9,90			R4	14,30		
T3	R1	11,50	11,80	0,375	R1	20,30	20,20	0,100
	R2	11,00			R2	20,10		
	R3	11,00			R3	20,10		
	R4	12,00			R4	20,30		
T4	R1	17,00	17,15	0,200	R1	12,50	12,43	0,075
	R2	17,50			R2	12,40		
	R3	16,90			R3	12,50		
	R4	17,20			R4	12,30		
T5	R1	15,00	15,00	0,050	R1	15,30	15,28	0,038
	R2	14,90			R2	15,20		
	R3	15,00			R3	15,30		
	R4	15,10			R4	15,30		
T6	R1	17,30	17,33	0,075	R1	17,60	17,55	0,050
	R2	17,40			R2	17,50		
	R3	17,20			R3	17,60		
	R4	17,40			R4	17,50		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 12. Valores de fosforo total (P) en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	R	60 días			R	90 días		
		P	Promedio	Desviación		P	Promedio	Desviación
T1	R1	8,50	8,38	0,088	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	8,40			R2	0,05		
	R3	8,20			R3	0,05		
	R4	8,40			R4	0,05		
T2	R1	2,30	2,43	0,075	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	2,50			R2	0,05		
	R3	2,40			R3	0,05		
	R4	2,50			R4	0,05		
T3	R1	0,20	0,19	0,019	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	0,15			R2	0,05		
	R3	0,20			R3	0,05		
	R4	0,20			R4	0,05		
T4	R1	0,10	0,11	0,005	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	0,10			R2	0,05		
	R3	0,11			R3	0,05		
	R4	0,11			R4	0,05		
T5	R1	0,08	0,09	0,004	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	0,09			R2	0,05		
	R3	0,09			R3	0,05		
	R4	0,09			R4	0,05		
T6	R1	0,35	0,34	0,013	R1	0,05	0,05	0,000
	R2	0,32			R2	0,05		
	R3	0,33			R3	0,05		
	R4	0,35			R4	0,05		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 13. Valores de potasio (K) En los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	R	60 días			R	90 días		
		K	Promedio	Desviación		K	Promedio	Desviación
T1	R1	58,60	58,03	0,775	R1	63,60	62,93	0,463
	R2	57,50			R2	63,00		
	R3	57,00			R3	63,10		
	R4	59,00			R4	62,00		
T2	R1	54,00	53,63	0,422	R1	54,10	53,80	0,400
	R2	53,90			R2	54,00		
	R3	53,00			R3	54,10		
	R4	54,10			R4	53,00		
T3	R1	6,00	6,05	0,121	R1	57,40	57,13	0,137
	R2	5,90			R2	57,00		
	R3	6,00			R3	57,10		
	R4	6,29			R4	57,00		
T4	R1	6,60	6,52	0,161	R1	53,40	53,28	0,125
	R2	6,20			R2	53,20		
	R3	6,60			R3	53,40		
	R4	6,69			R4	53,10		
T5	R1	6,00	6,07	0,065	R1	50,00	49,63	0,375
	R2	6,10			R2	49,50		
	R3	6,00			R3	50,00		
	R4	6,16			R4	49,00		
T6	R1	5,31	5,32	0,015	R1	81,10	80,80	0,400
	R2	5,30			R2	81,00		
	R3	5,35			R3	80,00		
	R4	5,32			R4	81,10		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 14. Valores de tamaño de altura de las plantas en los diferentes tratamientos y réplicas

Tratamiento	R	60 días			R	90 días		
		Tamaño	Promedio	Desviación		Tamaño	Promedio	Desviación
T1	R1	27,60	27,03	0,525	R1	90,0	90,40	0,350
	R2	27,50			R2	91,0		
	R3	26,00			R3	90,5		
	R4	27,00			R4	90,1		
T2	R1	26,20	26,35	0,325	R1	120,0	120,25	0,375
	R2	26,00			R2	121,0		
	R3	26,20			R3	120,0		
	R4	27,00			R4	120,0		
T3	R1	50,10	49,75	0,350	R1	150,0	143,75	11,875
	R2	49,20			R2	120,0		
	R3	50,10			R3	155,0		
	R4	49,60			R4	150,0		
T4	R1	9,10	9,13	0,111	R1	23,5	23,15	0,175
	R2	9,0			R2	23,1		
	R3	9,3			R3	23,0		
	R4	9,10			R4	23,0		
T5	R1	12,0	11,88	0,188	R1	28,0	27,50	0,500
	R2	12,0			R2	27,0		
	R3	11,5			R3	27,0		
	R4	12,0			R4	28,0		
T6	R1	17,0	17,38	0,375	R1	30,0	30,25	0,875
	R2	17,5			R2	32,0		
	R3	18,0			R3	29,0		
	R4	17,0			R4	30,0		

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 15. Prueba de Tukey homogeneidad de Levene de la variación del porcentaje
reducción de PC-1%

HSD Tukey^{a,b} (Porcentaje de Reducción PC-1%)

Tratamiento	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Tratamiento 1	8	,29975				
Tratamiento 4	8		,40588			
Tratamiento 5	8			,53725		
Tratamiento 2	8			,58838	,58838	
Tratamiento 3	8				,63400	
Tratamiento 6	8					,74537
Sig.		1,000	1,000	,050	,104	1,000

Fuente: Elaboración propia.

Variable dependiente: PC-1%

F	df1	df2	Sig.
1,111	12	35	,382

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 16. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la variación varianza de pH

HSD Tukey^{a,b} (pH)

Tratamiento	N	Subconjunto	
		1	2
Tratamiento 2	8	8,1638	
Tratamiento 3	8	8,2638	8,2638
Tratamiento 1	8	8,2938	8,2938
Traamiento 4	8	8,3825	8,3825
Tratamiento 6	8	8,3988	8,3988
Tratamiento 5	8		8,4588
Sig.		,057	,167

Fuente: Elaboración propia.

Variable dependiente: Ph			
F	df1	df2	Sig.
2,884	11	36	,258

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 17. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de la concentración de nitrógeno (NT)

HSD Tukey^{a,b} (Nitrógeno Total)

Tratamiento	N	Subconjunto					
		1	2	3	4	5	6
Tratamiento 2	8	12,0000					
Tratamiento 1	8		13,6750				
Tratamiento 4	8			14,7875			
Tratamiento 5	8				15,1375		
Tratamiento 3	8					15,7875	
Tratamiento 6	8						17,4375
Sig.		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

Fuente: Elaboración propia.

Variable dependiente: NT			
F	df1	df2	Sig.
6,553	11	36	,356

Fuente: Elaboración propia.

Apéndice 18. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la varianza de la concentración de fósforo total (P)

HSD Tukey^{a,b} (Fósforo Total)

Tratamiento	N	Subconjunto			
		1	2	3	4
Tratamiento 5	8	,0687			
Tratamiento 4	8	,0775			
Tratamiento 3	8	,1188			
Tratamiento 6	8		,1937		
Tratamiento 2	8			1,2375	
Tratamiento 1	8				4,2125
Sig.		,285	1,000	1,000	1,000

Variable dependiente: Fósforo Total

F	df1	df2	Sig.
6,081	11	36	,350

Apéndice 19. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de la variación de la concentración de potasio total (K)

HSD Tukey^{a,b} (Potasio)

Tratamiento	N	Subconjunto		
		1	2	3
Tratamiento 5	8	27,8450		
Tratamiento 4	8	29,8988	29,8988	
Tratamiento 3	8	31,5863	31,5863	
Tratamiento 6	8		43,0600	43,0600
Tratamiento 1	8			52,9750
Tratamiento 2	8			53,7750
Sig.		,957	,054	,176

Variable dependiente: Potasio

F	df1	df2	Sig.
8,784	11	36	,425

Apéndice 20. Prueba de Tukey y homogeneidad de Levene de los valores de la altura de las plantas fabáceas (*P. vulgaris* L. y *A. hypogagea* L.)

HSD Tukey^{ab} (Altura de la Planta)

Tratamiento	N	Subconjunto				
		1	2	3	4	5
Tratamiento 4	8	16,1375				
Tratamiento 5	8	19,6875	19,6875			
Tratamiento 6	8		23,8125			
Tratamiento 1	8			58,7125		
Tratamiento 2	8				73,3000	
Tratamiento 3	8					96,7500
Sig.		,651	,495	1,000	1,000	1,000

Variable dependiente: Altura de la planta

F	df1	df2	Sig.
7,670	11	36	,324

Apéndice 21. Coeficientes de correlación lineal de Pearson (R) entre los valores de porcentaje de reducción de PC-1%, porcentaje CM-PC-1%, altura de las plantas, nitrógeno total (NT), fósforo total (P), potasio total (K) y pH significancia de $p < 0.05$

		PC-1%	%CM-PC-1%	Altura de la Planta	pH	NT	P
PC-1%	Correlación de Pearson Sig.						
% CM-PC-1%	Correlación de Pearson Sig.	,769**					
Altura de la planta	Correlación de Pearson Sig.	,317*	,052				
pH	Correlación de Pearson Sig.	,308*	,272	-,075			
NT	Correlación de Pearson Sig.	,360*	,493**	,351*	,316*		
P	Correlación de Pearson Sig.	-,481**	-,393**	-,199	-,235	-,513**	
K	Correlación de Pearson Sig.	,379**	,037	,336*	,335*	-,009	,227
		,008	,802	,020	,020	,952	,120

Fuente: Elaboración propia.

Dato: Porcentaje de petróleo crudo al 1% (PC-1%) y porcentaje de colonización micorrizica (% CM-PC-1%).

Apéndice 22. Registro fotográfico de la investigación



Siembra de semillas de Maní.



Siembra de semillas de Frejol.



Germinación del Maní.



Germinación del Frejol.



Inducción del contaminante al suelo.



Preparación del material experimental.



Selección del Maní para los tratamientos.



Selección del Frejol para los tratamientos.



Inoculación de la *R. intraradices* en la rizosfera de la *A. hypogaea*.



Inoculación de la *R. intraradices* en la rizosfera de la *P. hypogaea*.



Fase experimental del Maní (90 días).



Fase experimental del Frejol (90 días).



Invernadero acondicionado para la fase experimental.

Registro fotográfico del experimento: Etapa de laboratorio



Lavado de raíz de las plantas



Inoculación de la raíz en tubos falcón.



Adición de la solución de KOH a las muestras de raíces.



Tejidos de raíces en solución KOH.



Baño María a 90° por 1 hora



Retiro de la solución KOH.



Preparación de HCl al 1 %.



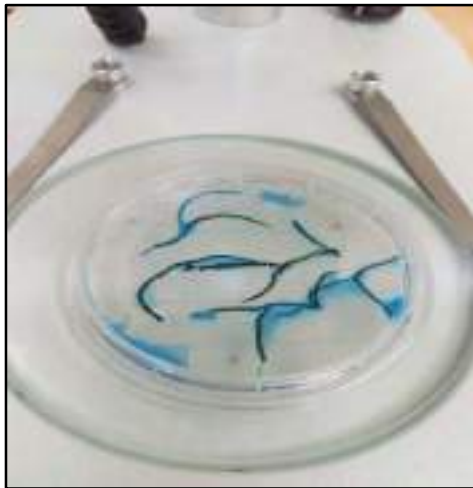
Lavado de las raíces con Peróxido de Hidrogeno.



Preparación del Azul de Tripano II-



Tinción de las raíces con Azul de Tripano
(0.05%).



Selección de las raíces para
observación y conteo de



Observación y conteo de
micorrizas

Método Soxhlet



Medición del peso inicial del balón aforado



Distribución del etanol para el Sistema Soxhlet.



Proceso de extracción de aceites en sistema Soxhlet

