

## Crecimiento de *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) en suelo con diésel, y aplicación de bioestimulación y bioaumentación

María Esther Díaz-Martínez<sup>1</sup>, Alejandro Alarcón<sup>1\*</sup>, Ronald Ferrera-Cerrato<sup>1</sup>, Juan José Almaraz-Suarez<sup>1</sup> & Oscar García-Barradas<sup>2</sup>

1. Área de Microbiología, Postgrado en Edafología. Colegio de Postgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5. Montecillo 56230, Estado de México, México; marite\_21\_3@hotmail.com, aalarconcp@gmail.com, rferreracerrato@gmail.com, jalmaraz@hotmail.com
  2. Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA). Universidad Veracruzana. Dr. Luis Castelazo Ayala s/n. Col. Industrial Animas. Xalapa 91190, Veracruz, México; osgarcia@uv.mx
- \* Correspondencia: aalarconcp@gmail.com

Recibido 08-V-2012. Corregido 10-XII-2012. Aceptado 22-I-2013.

**Abstract:** *Casuarina equisetifolia* (Casuarinaceae) growth in soil with diesel and application of biostimulation and bioaugmentation. Phytoremediation is an ecologically sound biotechnology directed to cleaning up contaminated soils. The study of tree species to treat petroleum contaminated soils is scarce; moreover, the combination of phytoremediation with bioaugmentation and biostimulation processes is also limited. Thus, this work evaluated the effects of the inoculation of *Glomus intraradices*, a bacterial consortium (M2BOS1-R2 and M2BOS1-F4) and *Trichoderma viride*, on the growth of *Casuarina equisetifolia*, fertilized with Floranid® or Triple 17, when sown in a diesel-contaminated soil (7 500mg/kg). The factorial experiment 2x5x3 included 30 treatments with 10 replicates in a completely randomized design under greenhouse conditions for 120 days. Diesel significantly diminished plant height, total biomass, and plant index quality (PIQ). *Glomus* or bacterial consortium significantly increased plant height, total biomass and PIQ when compared to the inoculation of the three microorganisms or to the control. Floranid had negative effects on plant growth and PIQ at diesel contamination. Fertilization with Triple 17 combined with the three microorganisms stimulated plant growth in the absence of diesel, whereas in the presence of this contaminant the treatments combining Triple 17 with the bacterial consortium or with *Trichoderma* had better plant growth and PIQ. Mycorrhizal colonization was inhibited due to diesel contamination, and especially when Floranid was applied. The fertilizer Triple 17 (biostimulation) combined with the beneficial microorganisms (bioaugmentation) improved growth responses of *C. equisetifolia* in diesel-contaminated soil. Rev. Biol. Trop. 61 (3): 1039-1052. Epub 2013 September 01.

**Key words:** inorganic fertilizers, bacterial consortium, *Glomus*, *Trichoderma*, phytotoxicity.

El petróleo es una mezcla de hidrocarburos que representa una de las principales actividades industriales de México (Primo 1996, Pardo *et al.* 2004), destacando la producción de diesel con 337 millones de barriles diarios (PEMEX 2010). A pesar de su importancia económica y social, la industria petrolera colateralmente genera problemas de contaminación del suelo causados principalmente por la falta de mantenimiento de instalaciones petroleras, explosiones de alto riesgo en instalaciones y fugas en las líneas de conducción (Jiménez 2002).

Una vez depositados en el suelo, los hidrocarburos del petróleo se acumulan y forman una capa hidrofóbica, induciendo la fragmentación de los agregados; de igual manera, causan la reducción y la inhibición de la cobertura vegetal, y modifican las poblaciones microbianas del ambiente edáfico (López-Martínez *et al.* 2005, Adams & Morales-García 2008).

Las técnicas de remediación de suelos contaminados representan un conjunto de operaciones que alteran la composición del contaminante a través de acciones químicas, físicas

o biológicas (Harrison 1999). La biorremediación muestra ventajas con respecto a los métodos físicos y químicos debido a su bajo costo (Volke & Velasco 2002), y se centra en explotar la diversidad genética y versatilidad metabólica de los microorganismos, para transformar contaminantes e integrarlos a los ciclos biogeoquímicos naturales (Garbisu *et al.* 2002).

La biorremediación mediante técnicas *in situ* se desarrolla satisfactoriamente con la aplicación de bioestimulación y de bioaumentación (Castillo *et al.* 2005). La bioestimulación modifica las condiciones del suelo al facilitar la proliferación y la actividad de los microorganismos nativos a través de la adición de nutrientes, aceptores de electrones, surfactantes, o bien, oxígeno al suelo (Castillo *et al.* 2005, Singh *et al.* 2011). Así, la aplicación de fertilizantes orgánicos e inorgánicos favorece la degradación de hidrocarburos de petróleo en suelos (Pardo *et al.* 2004). Como ejemplo, la fertilización con N-P-K (15-15-15) en suelo contaminado con petróleo fue factor importante en la bioestimulación de la actividad microbiana y en el crecimiento de las plantas, favoreciendo con ello la degradación de petróleo crudo (55%), en comparación con el suelo sin la fertilización (29%) (Ubochi *et al.* 2006).

La bioaumentación por su parte, consiste en adicionar microorganismos autóctonos o modificados genéticamente con capacidad de degradar contaminantes orgánicos (Volke & Velasco 2002, Castillo *et al.* 2005). Este método se utiliza en suelos contaminados cuando la microflora autóctona es insuficiente en número o en su capacidad degradadora de compuestos orgánicos tóxicos (Gentry *et al.* 2004, Mancera *et al.* 2008).

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA), las bacterias y los hongos filamentosos tienen uso potencial en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo (Boonchan *et al.* 2000, Leyval *et al.* 2001, Kirk *et al.* 2005, Hughes *et al.* 2007, Silva *et al.* 2009). Los HMA pueden estabilizar hidrocarburos policíclicos aromáticos (Kirk *et al.* 2005) o bien, aumentar actividades enzimáticas en las plantas (peroxidasa, oxidasa o

catecol oxidasa) cuando se encuentran sometidas a ciertas concentraciones de petróleo (Liu *et al.* 2004). En gramíneas, los HMA inducen la resistencia a estrés por diésel y antraceno (Debiane *et al.* 2008, Tang *et al.* 2009), mientras que en leguminosas estos hongos estimulan su crecimiento (Liu *et al.* 2004, Cheung *et al.* 2008, Hernández-Ortega *et al.* 2012).

Las bacterias de vida libre como *Bacillus cereus*, *B. sphaericus*, *B. fusiformis*, *B. pumilus*, *Acinetobacter junii*, *Pseudomonas* sp., y *P. putida* toleran y degradan tolueno y xileno (Bento *et al.* 2005, Purushothaman *et al.* 2010). Algunos géneros bacterianos utilizados con éxito en procesos de bioaumentación son *Flavobacterium*, *Sphingomonas*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus*, *Mycobacterium*, *Sinorhizobium*, *Paracoccus* y *Achromobacter* (Singh *et al.* 2003, El Fantroussi & Agathos 2005, Keum *et al.* 2006, Teng *et al.* 2010).

En el caso de hongos filamentosos, *Rhizopus* sp., *Penicillium funiculosum* y *Aspergillus sydowii* son capaces de remover hidrocarburos totales de petróleo, hidrocarburos policíclicos aromáticos e hidrocarburos alifáticos (Mancera *et al.* 2008). Otros hongos usados en la bioaumentación son *Absidia*, *Achremonium*, *Aspergillus*, *Verticillium*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor* y *Trichoderma* (Hughes *et al.* 2007, Argumedo-Delira *et al.* 2009, Silva *et al.* 2009, Mrozik & Piotrowska-Seget 2010).

Diversas plantas herbáceas estimulan la proliferación de microorganismos en su rizosfera en presencia de contaminantes orgánicos (Singh *et al.* 2004). Algunas especies arbóreas se han utilizado en la fitorremediación o dendroremediación (Schoenmuth & Pestemer 2004, Tamas & Gullner 2006). A manera de contraste, algunas especies arbóreas como *Cupressus arizonica* var. *arizonica*, *Populus deltoides* Bartram ex Marsh., *Acacia nilotica* (L.) Willd. ex Delile, *A. implexa* Benth., *A. longifolia* Wild., *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh., *E. melliodora* A.Cunn. ex Schauer., *Angophora floribunda* (Smith) Sweet. y *Casuarina cunninghamiana* Miq., han sido exitosamente utilizadas para remediar suelos contaminados con metales pesados (Aitchison

et al. 2000, Shanker et al. 2005, Alcalá et al. 2008, Farias et al. 2009, Singh et al. 2010). Sin embargo, el uso de especies arbóreas para limpiar suelos contaminados con compuestos orgánicos es aún limitado. Por ejemplo, *Pinus sylvestris* L. y *P. deltoides*, favorecen la disipación de diésel (Palmroth et al. 2002), mientras que *Salix* (Clon EW-20) y *Picea abies* (L.) Karst., acumulan 80% de trinitrotolueno (TNT) (Schoenmuth & Pestemer 2004), y *Casuarina equisetifolia* L. tolera de 5 a 10g/kg de diésel en suelos salinos (Sun et al. 2004). Esta última especie arbórea de origen Australiano se ha adaptado con éxito en México y su uso se ha dirigido a la reforestación rural y urbana (Valdés et al. 2004), o bien como barreras rompe viento, para controlar la erosión de costas y dunas, y para restaurar zonas con problemas de salinidad (Ndiaye et al. 1993, Moezel et al. 1989, Bruzón et al. 2003, CONABIO 2009, Zhong et al. 2010).

Desde el punto de vista ambiental, *Casuarina* ha mostrado 100% de supervivencia con respecto a otras especies forestales, en sitios contaminados por la industria minera, y tiene la capacidad de acumular Cromo (CrIII) en sus raíces (Shanker et al. 2005). En lo que respecta a contaminantes orgánicos solo se ha reportado un trabajo en suelo salino contaminado con diésel (Sun et al. 2004). Por lo anterior, este trabajo evaluó la respuesta de *Casuarina equisetifolia* a la bioestimulación con dos fertilizantes inorgánicos y a la bioaumentación con un HMA, *Trichoderma viride* y un consorcio bacteriano, en un suelo contaminado con diésel.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Recolecta de semilla:** La semilla de *Casuarina equisetifolia* L. fue recolectada en el Colegio de Postgraduados Campus Montecillo y colocada en bolsas de papel para su secado a temperatura ambiente. Las semillas fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio (10%) y después lavadas con suficiente agua destilada para eliminar el exceso del desinfectante. La semilla fue germinada en macetas con 250g de

arena de río lavada y estéril, durante un mes. Las plántulas seleccionadas para su trasplante presentaron una altura de 2.5cm en promedio.

**Recolecta del suelo:** El suelo (10kg) fue recolectado en San Diego municipio de Texcoco, Estado de México, a partir de los 20cm superficiales, al cual se determinaron sus características físicas y químicas con métodos normalizados en el laboratorio de Fertilidad de Suelos (Colegio de Postgraduados). El suelo presentó un pH de 7.2, 0.14% de N, 2.8% de materia orgánica y textura franco arenosa. El suelo fue tamizado y esterilizado en autoclave a 121°C por 4h por dos días consecutivos, y posteriormente secado a 100°C por 48h; seguidamente fue contaminado con diésel comercial.

**Contaminación del suelo:** 2kg de suelo seco estéril fueron colocados en refractario de vidrio (3kg de capacidad), al cual se le agregó el diésel correspondiente para obtener una concentración de 7 500mg/kg. El diésel fue disuelto en 150mL de acetona (Fermont®) en vaso de precipitados (500mL) para facilitar su impregnación homogénea en el suelo (Alarcón et al. 2008). Una vez contaminado, el suelo fue dejado en reposo en condiciones de campana de extracción, durante cinco días.

**Preparación de los inoculantes microbianos:** El inóculo de *Glomus intraradices* fue preparado con fragmentos de raíces (1cm) de *Plectranthus coleoides* Benth (Fam. Lamiaceae) utilizada como planta trampa crecida en arena de río, como sustrato. La colonización micorrízica radical determinada mediante la técnica de Phillips & Hayman (1970) fue de 65%, y el número de esporas cuantificado por el método de Gerdemann & Nicolson (1963) fue de 900esporas/g.

El inóculo de *Trichoderma viride* (CP4) fue propagado en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA; Merck®) dos semanas antes del establecimiento del experimento. Las cajas de Petri fueron incubadas a 28°C, y posteriormente colocadas a temperatura ambiente para favorecer la esporulación del hongo. Las

esporas fueron recuperadas en 350mL de agua destilada estéril, lavadas y filtradas con fibra de vidrio, bajo condiciones de campana de flujo laminar. El filtrado fue recuperado en matraz Erlenmeyer previamente esterilizado y la concentración de esporas fue cuantificada en cámara de Neubauer; cada planta fue inoculada con 3mL de la suspensión de esporas ( $5.36 \times 10^8$  esporas/mL).

El inóculo bacteriano estuvo conformado por dos cepas; la cepa M2BOS1-R2 identificada como *Sphingobacterium* sp., correspondiente a cocobacilos Gram negativos con actividad hidrocarbonoclasta; y la cepa M2BOS4-F2 (bacteria esférica solubilizadora de fosfato inorgánico, en proceso de identificación), compuesta por bacilos Gram negativos, tolerantes a diésel y productores de biosurfactantes. Las bacterias fueron propagadas individualmente en frascos de vidrio con 35mL de caldo nutritivo con cinco repeticiones. Los frascos fueron incubados en agitación a 180rpm a 28°C durante 72h. Posteriormente, las soluciones bacterianas fueron colocadas en tubos de 50mL y centrifugadas a 7 500rpm por 10min. El sobrenadante fue decantado y la pastilla bacteriana fue recuperada con 35mL de agua destilada estéril. Cada bacteria fue concentrada en un matraz Erlenmeyer de 500mL estéril. El conteo de las unidades formadoras de colonias (UFC) fue estimado a partir de 1mL de la suspensión bacteriana del cual se hicieron diluciones decimales ( $10^{-1}$  a  $10^{-7}$ ). Posteriormente, se tomó 0.1mL de las diluciones  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$ , y colocado en cajas de Petri con agar nutritivo con tres repeticiones por dilución. Inmediatamente las cajas fueron incubadas a 28°C por 48h, y después de este tiempo fueron cuantificadas las UFC. La carga bacteriana obtenida para la cepa M2BOS1-R2 fue de  $6 \times 10^8$  UFC/mL y para M2BOS4-F2 fue de  $2.5 \times 10^8$  UFC/mL. Finalmente, cada unidad experimental fue inoculada con 3mL de la suspensión bacteriana final.

**Fertilizantes inorgánicos utilizados:** Los fertilizantes utilizados en el experimento fueron Triple 17 y Floranid®. El fertilizante granulado

Triple 17(N-P-K) fue aplicado de acuerdo con la dosis de fertilización para especies arbóreas (Finck 1988), al suministrar 0.035g a cada unidad experimental. El Floranid (fertilizante inorgánico microgranulado de lenta liberación y contenido de N-P-K de 16-7-15), fue aplicado a cada unidad experimental al suministrar 0.62g, de acuerdo a la dosis especificada por el fabricante para especies arbóreas.

**Establecimiento del experimento:** El experimento fue establecido bajo condiciones de invernadero con temperaturas máximas y mínimas promedio de 24°C y 13°C, respectivamente, y con humedad relativa máxima y mínima promedio de 83% y 30%, respectivamente (Data logger Hobo serie H8)

El suelo con diésel y sin diésel fue colocado en tubos de plástico para uso en forestería con 126g de capacidad, a los cuales se aplicó el fertilizante correspondiente en las dosis mencionadas, homogeneizándolo con el suelo. Una plántula de *C. equisetifolia* de un mes de edad fue trasplantada en cada tubo (10 tubos por tratamiento) y también inoculada con *G. intraradices*, con la suspensión bacteriana (M2BOS1-R2 y M2BOS4-F4), o con *T. viride*, según el tratamiento correspondiente. Las plántulas se mantuvieron en condiciones de invernadero. El riego de las plántulas fue aplicado con 30mL de agua destilada estéril diariamente durante 120 días.

Después de 120 días se midió la altura, y las plantas fueron cosechadas para estimar la biomasa seca total (70°C por 48h) y el índice de calidad de planta (ICP) producida en vivero basado en caracteres morfológicos (Dickson *et al.* 1960) mediante la siguiente ecuación:  $IC = \{[\text{Peso seco total de la planta (g)}]/[\text{Altura (cm)}/\text{diámetro de tallo}] + [\text{peso seco parte aérea (g)}/\text{Peso seco raíz (g)}]\}$ . Además, la colonización micorrízica de las plantas inoculadas con *G. intraradices* fue determinada mediante la técnica de Phillips & Hayman (1970), y fue expresada en porcentaje.

El experimento tuvo un diseño factorial  $2 \times 5 \times 3$ , con dos niveles de contaminación (con diésel y sin diésel), cinco niveles de

inoculación (Testigo, *G. intraradices*, consorcio bacteriano, *Trichoderma*, y la combinación de los tres microorganismos), y tres niveles de fertilización (Sin fertilizante, Triple 17, y Floranid). En total se tuvieron 30 tratamientos con 10 repeticiones cada uno. Los datos obtenidos para cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD,  $\alpha=0.05$ ) mediante el programa estadístico SAS (SAS Institute 2000), y la estimación del error estándar para cada media de cada tratamiento.

## RESULTADOS

El cuadro 1 presenta los valores de significancia obtenidos para los tres factores independientes y sus combinaciones, en la altura, la biomasa seca total y el ICP, y se destaca el efecto significativo de la contaminación por diésel y de la interacción de los tres factores.

En cuanto al análisis de los factores independientes, se observó que la contaminación con diésel redujo significativamente ( $p \leq 0.001$ ) la altura de planta (40%) y la biomasa seca total 52%, aunque no produjo diferencias significativas en el índice de calidad de planta. El factor inoculación mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ), donde la inoculación de *Glomus intraradices* estimuló la biomasa seca total

(80%) y el ICP (30%) con respecto al resto de los microorganismos inoculados. En contraste, el factor fertilización solo produjo diferencias significativas ( $p \leq 0.01$ ) para el ICP, el cual disminuyó significativamente (>70%) con la fertilización con Floranid en comparación con los tratamientos sin fertilizar o con Triple 17.

En cuanto al efecto por tratamientos, se observaron diferencias significativas para ( $p \leq 0.001$ ) la altura, la biomasa seca total y el ICP. En ausencia de diésel, la inoculación de los tres microorganismos combinada con Triple 17 produjo la mayor altura (24.8cm), mientras que el menor valor (<1cm) en general, fue obtenido en los tratamientos inoculados con aplicación de Floranid (Fig. 1a). En contraste, en el suelo contaminado, la mayor altura se presentó en el tratamiento sin inoculación fertilizado con Triple 17 (17.7cm), y la menor altura en todos los tratamientos fertilizados con Floranid (Fig. 1b).

En cuanto a la biomasa seca total, en ausencia de diésel, *G. intraradices* con Floranid produjo la mayor biomasa (0.39g), mientras que el menor valor (0.17g) se presentó con la inoculación de *Trichoderma* sin fertilizar; aunque en tres de los tratamientos inoculados con aplicación de Floranid no se obtuvo acumulación de biomasa en las plantas (<0.01g) (Fig. 2a). En el suelo contaminado, la mayor

CUADRO 1

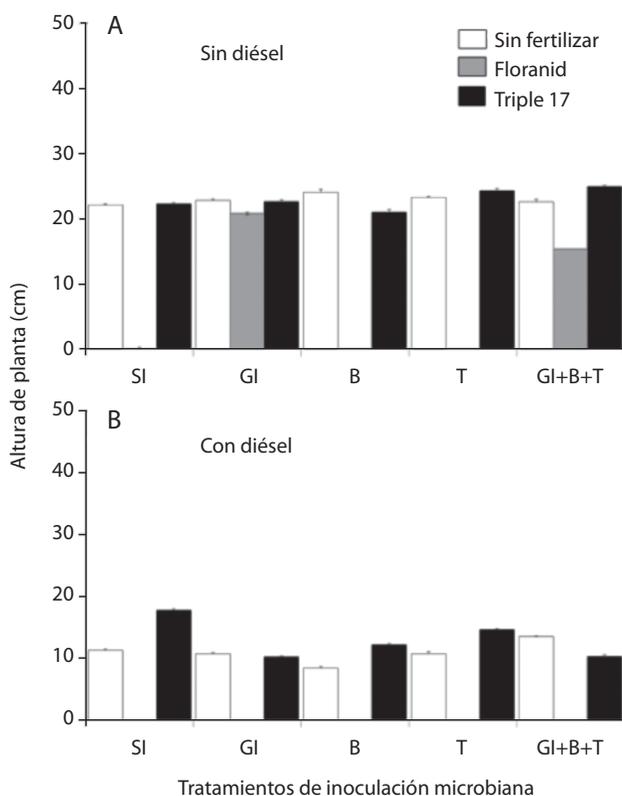
Valores de significancia de los factores independientes y de sus combinaciones sobre la altura, biomasa seca total e índice de calidad de *Casuarina equisetifolia*, a los 120 días de crecimiento

TABLE 1

P-values of independent factors and their combinations on height, total dry biomass and plant index quality of *Casuarina equisetifolia*, after 120 days of growth

Factores independientes o combinaciones	Altura de planta	Biomasa seca total	Índice de calidad de planta
Contaminación (C)	0.001	0.001	NS
Inoculación (I)	0.05	NS	0.01
Fertilización (F)	NS	NS	0.001
C x I	NS	0.001	0.001
C x F	NS	NS	NS
I x F	NS	0.01	0.001
C x I x F	0.05	0.001	0.001

NS=No significativo.



**Fig. 1.** Altura de plantas de *Casuarina equisetifolia* crecidas en suelo contaminado con diésel (7500mg/kg), con inoculación de tres microorganismos benéficos, y con aplicación de fertilizantes, después de 120 días. SI=Sin inocular, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacterias (M2BOSI-R2 y M2BOSI-F4); y T=*Trichoderma viride* CP4.

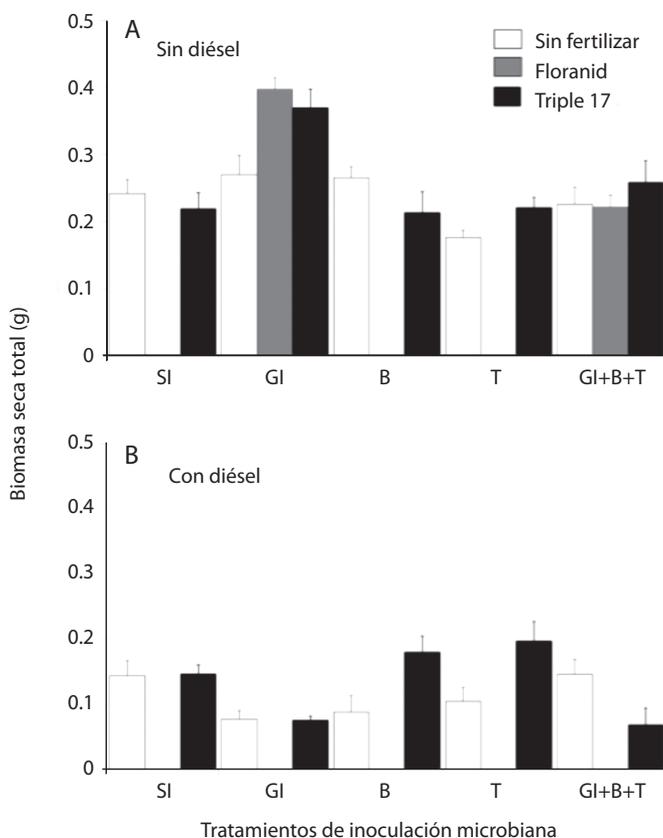
**Fig. 1.** Height of *Casuarina equisetifolia* plants grown in diesel contaminated soil (7500mg/kg), inoculated with beneficial microorganisms and fertilizers, application after 120 days. SI=No inoculation, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacteria (M2BOSI-R2 and M2BOSI-F4), and T=*Trichoderma viride* CP4.

biomasa se obtuvo con *Trichoderma* en combinación con Triple 17 (0.19g), y la menor biomasa se presentó con la inoculación de los tres microorganismos con Triple 17 (0.06g); no obstante, en los tratamientos con Floranid no se observó acumulación de biomasa (Fig. 2b).

En ausencia de diésel, el mayor ICP se obtuvo con *G. intraradices* combinado con Floranid (0.0045), y el menor valor se presentó con la triple inoculación con aplicación de Floranid (0.0012); aunque en el resto de los tratamientos con fertilización de Floranid, el ICP fue cero (Fig. 3a). En el suelo con diésel, el mayor ICP se presentó con la inoculación del consorcio bacteriano con Triple 17 (0.0032), y

el menor índice se presentó con la triple inoculación fertilizado con Triple 17 (0.0010); en contraste, en todos tratamientos fertilizados con Floranid, el valor del ICP fue cero (Fig. 3b).

La colonización micorrízica total presentó diferencias significativas por efecto de los factores inoculación y fertilización ( $p \leq 0.001$ ); mientras que el factor contaminación no mostró diferencias significativas. Para el factor inoculación, la colonización micorrízica fue mayor en el tratamiento con *Glomus* con respecto al tratamiento con la triple inoculación. Para el factor fertilización, la mayor colonización se obtuvo en el tratamiento sin fertilizar en comparación con la fertilización con Triple 17,



**Fig. 2.** Biomasa seca total de plantas de *Casuarina equisetifolia* crecidas en suelo contaminado con diésel (7500mg/kg), con inoculación de tres microorganismos benéficos, y con aplicación de fertilizantes, después de 120 días. SI=Sin inocular, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacterias (M2BOS1-R2 y M2BOS1-F4), y T=*Trichoderma viride* CP4.

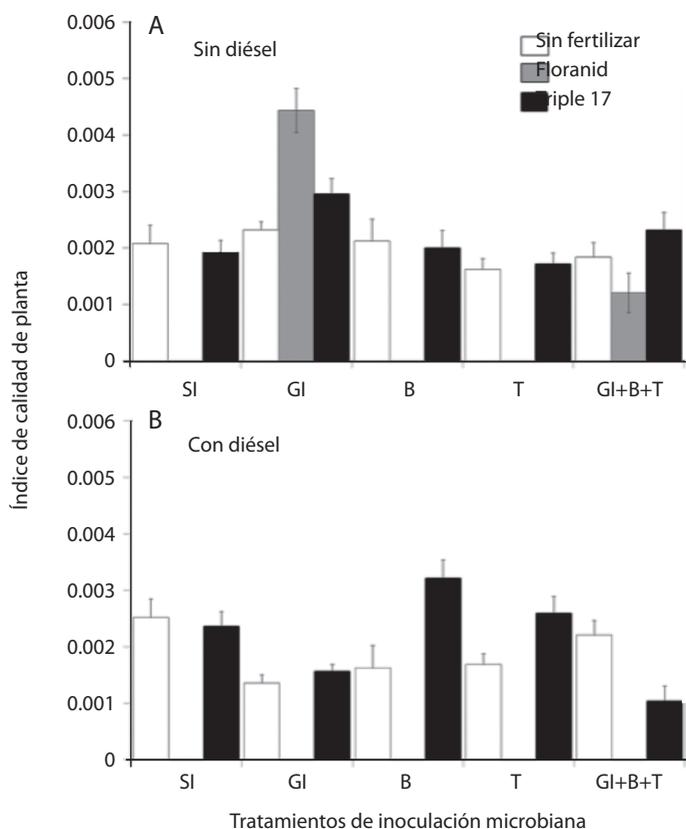
**Fig. 2.** Total dry biomass of *Casuarina equisetifolia* plants grown in diesel contaminated soil (7500mg/kg), inoculated with beneficial microorganisms and fertilizers, application after 120 days. SI=No inoculation, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacteria (M2BOS1-R2 and M2BOS1-F4), and T=*Trichoderma viride* CP4.

aunque con la aplicación de Floranid la colonización micorrízica fue muy baja. La colonización micorrízica total en los tratamientos donde se inoculó *G. intraradices* (sin fertilizar y con Triple 17) fue menor al 2%, y no se observó colonización micorrízica en los tratamientos donde no se inoculó el hongo (Fig. 4). En ausencia de diésel (Fig. 4a), la mayor colonización se presentó en el tratamiento con *Glomus* y Floranid (0.75%), y la menor colonización en el tratamiento con la triple inoculación fertilizado con Floranid (0.37%). En presencia de diésel, la fertilización con Floranid inhibió significativamente la colonización micorrízica,

y la mayor colonización se presentó en el tratamiento sin fertilizar (1.0%) (Fig. 4b).

## DISCUSIÓN

La aplicación de diesel (7 500mg/kg) redujo significativamente la altura de plantas de *C. equisetifolia* y la acumulación de biomasa seca. Los hidrocarburos del petróleo típicamente tienen efectos negativos en las plantas al reducir su crecimiento, su longitud radical, su biomasa, y en algunos casos provoca su muerte (Pezeshki *et al.* 2000, Hutchinson *et al.* 2001, Lin *et al.* 2002, Reynoso-Cuevas *et al.* 2008).

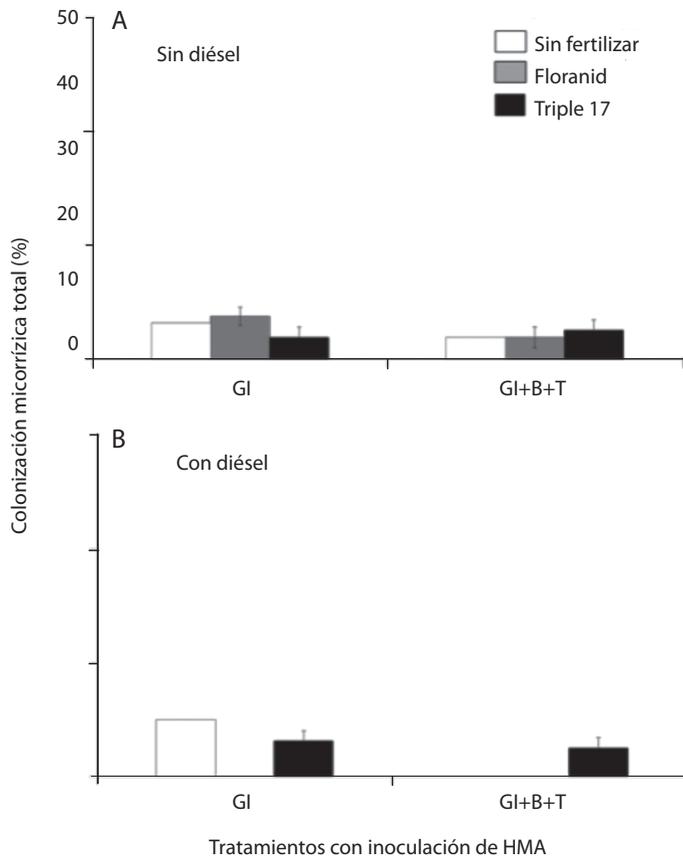


**Fig. 3.** Índice de calidad plantas de *Casuarina equisetifolia* crecidas en suelo contaminado con diésel (7500mg/kg), con inoculación de tres microorganismos benéficos, y con aplicación de fertilizantes, después de 120 días. SI=Sin inocular, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacterias (M2BOS1-R2 y M2BOS1-F4), y T=*Trichoderma viride* CP4.

**Fig. 3.** Plant quality index of *Casuarina equisetifolia* plants grown in diesel contaminated soil (7500mg/kg), inoculated with beneficial microorganisms and fertilizers, application after 120 days. SI=No inoculation, GI=*Glomus intraradices*, B=Bacteria (M2BOS1-R2 and M2BOS1-F4), and T=*Trichoderma viride* CP4.

La fertilización con Triple 17 aumentó la altura, la biomasa seca total y el ICP de plantas, mientras que la aplicación de Floranid redujo significativamente dichas variables, especialmente en presencia del diésel. La aplicación de fertilizantes en suelos contaminados permite a la planta tolerar el trasplante en este suelo y el estrés generado por el contaminante, además de favorecer su crecimiento y acumulación de biomasa (Menendez-Vega *et al.* 2007, Lin & Mendelssohn 2009). No obstante, el presente trabajo muestra que es necesario definir dosis y tipos de fertilizantes que pueden ser aplicados para ciertas condiciones de suelo y contaminación.

La aplicación de nitrógeno por medio de fertilizantes inorgánicos en altas concentraciones para las plántulas pueden provocar efectos nocivos (Bento *et al.* 2005). Lo anterior puede explicar en parte, el efecto negativo del Floranid en las plantas, ya que este fertilizante tiene alto contenido de sales de nitrato de amonio cuyo aumento en la solución del suelo provoca reducciones en el potencial osmótico e inhibe la actividad microbiana (Walworth *et al.* 2007). Así como el exceso de nitrógeno puede afectar a las plantas, otros nutrientes como fósforo, potasio y azufre pueden retrasar el desarrollo vegetal y dañar gravemente las raíces, los



**Fig. 4.** Porcentaje de colonización micorrízica total de *Glomus intraradices* (HMA) plantas de *Casuarina equisetifolia* crecidas en suelo contaminado con diésel (7500mg/kg), en combinación de dos microorganismos benéficos, y con aplicación de fertilizantes, después de 120 días. GI=*Glomus intraradices*, B=Bacterias (M2BOS1-R2 y M2BOS1-F4), y T=*Trichoderma viride* CP4.

**Fig. 4.** Total mycorrhizal colonization percentage of *Glomus intraradices* in *Casuarina equisetifolia* plants grown in diesel contaminated soil (7500mg/kg), in combination with two beneficial microorganisms, and fertilizers application after 120 days. GI=*Glomus intraradices*, B=Bacteria (M2BOS1-R2 and M2BOS1-F4), and T=*Trichoderma viride* CP4.

tallos y las ramas (Thompson & Troeh 2002). La fertilización en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo debe ser dosificada considerando las condiciones ambientales y la concentración del contaminante en el suelo (Chaineau *et al.* 2005).

La inoculación de los tres microorganismos o de *G. intraradices* estimuló la altura y el ICP de planta. Los efectos benéficos de los HMA han sido demostrados en diversas plantas, al estimular su altura y su biomasa seca en presencia de diésel (Tang *et al.* 2009, Hernández-Ortega *et al.* 2012). Por su parte,

la capacidad de *Trichoderma* para estimular el crecimiento vegetal ha sido reportado principalmente en *Lactuca sativa* L., *Lycopersicon esculentum* Mill., y *Zea mays* L., al conferir tolerancia a condiciones de estrés (Ousley *et al.* 1994, Börkman *et al.* 1998, Gravel *et al.* 2007). Sin embargo, el efecto de *Trichoderma* en plántulas establecidas en suelo contaminado con hidrocarburos del petróleo no ha sido estudiado previamente, aun cuando las cepas de este hongo presentan tolerancia hacia diversos hidrocarburos del petróleo (Silva *et al.* 2009, Argumedo-Delira *et al.* 2012).

Los efectos benéficos de los tres microorganismos (bacterias hidrocarbonoclastas, *Glo-mus* y *Trichoderma*) en el crecimiento de las plantas no han sido evaluados previamente. En ausencia de diésel, *G. intraradices* y la adición de Triple 17 o Floranid, incrementaron la altura, la biomasa seca aérea y de raíz, y el ICP. Los microorganismos en el suelo desempeñan diferentes funciones como el reciclaje de nutrientes y la promoción del crecimiento vegetal (Tang *et al.* 2010). Algunos autores mencionan que en condiciones naturales la capacidad de los árboles para obtener nutrimentos está mediada por la simbiosis con HMA (Finck 1988). Por ejemplo, *G. intraradices* aumenta la altura y la acumulación de biomasa de *Casuarina*, y por tanto, favorece mayor crecimiento en vivero y sobrevivencia en campo (Valdés *et al.* 2004); sin embargo, no se tienen reportes de los efectos de los HMA en esta especie arbórea bajo condiciones de contaminación con hidrocarburos del petróleo.

Por otra parte, el ICP de Dickson indica la potencialidad de una plántula para sobrevivir y crecer en ciertas condiciones; así, plántulas con mayor calidad tienen índices de calidad más altos (Paris *et al.* 2011). Los bajos valores del ICP obtenidos en este trabajo son comparables con aquellos reportados para plántulas de *Quercus silex* (0.072 y 0.015), y que se atribuyeron a la baja calidad de los propágulos de donde se obtuvieron dichas plántulas (Paris *et al.* 2011). Lo anterior sugiere que bajo nuestras condiciones de estudio y el tiempo en el cual se hizo la evaluación (120 días), las plantas aún se encontraban en periodo de crecimiento activo, por lo que se sugiere llevar a cabo estudios a largo plazo. No obstante, la presencia del diésel redujo el crecimiento de las plantas y en consecuencia, afectó la calidad de las mismas; sin embargo, la inoculación de las bacterias hidrocarbonoclastas con Triple 17, mejoró el ICP en presencia de diésel.

El uso de cultivos mixtos de bacterias ha sido usado para maximizar la biodegradación de contaminantes orgánicos (Rambeloarisoa *et al.* 1984, Hii *et al.* 2009), ya que éstos favorecen la actividad enzimática que contribuye con

la resistencia de las plantas al estrés provocado por el contaminante (Liu *et al.* 2004, Debiane *et al.* 2008, Tang *et al.* 2009). En el caso particular de *Sphingobacterium* (cepa M2BOS1-R2), de acuerdo con la literatura, esta bacteria tiene la capacidad de usar los hidrocarburos del petróleo como fuente de carbono (Dalal *et al.* 2010), a la vez de degradar colorantes como el Rojo 5 (Tamboli *et al.* 2010). Dada la nula investigación sobre la interacción de bacterias hidrocarbonoclastas, HMA, y *Trichoderma*, este trabajo es de los primeros reportes que denotan los beneficios de estas interacciones microbianas en las respuestas de crecimiento de *Casuarina* en suelo contaminado con diésel.

En cuanto a la bioestimulación, la fertilización con Triple 17 en *C. equisetifolia* inoculada con *Trichoderma*, con el consorcio bacteriano o con los tres microorganismos favoreció el crecimiento (mayor acumulación de biomasa e ICP) de las plantas en presencia de diésel. Al respecto, el uso de consorcios microbianos en gramíneas ha conferido mayor tolerancia hacia los hidrocarburos del petróleo (Tang *et al.* 2010), mientras que las plantas favorecen la actividad microbiana en presencia de contaminantes a través de la liberación de exudados de la raíz (Schnoor *et al.* 1995). Lo anterior denota la importancia de aplicar fuentes de nutrientes para las plantas que estimulen no sólo su crecimiento sino también la actividad microbiana de la rizosfera bajo condiciones de contaminación. No obstante, es trascendental seleccionar la fuente de fertilización que se piensa aplicar, ya que ésta puede afectar el crecimiento vegetal en condiciones de contaminación. Por ejemplo, el Floranid tuvo efectos negativos en el crecimiento vegetal, particularmente en presencia de contaminante. Lo anterior sugiere usar dosis menores a la utilizada en este experimento, o bien usar diferentes fuentes de fertilizantes de lenta liberación.

El diésel afectó la colonización de *G. intraradices* en las raíces de las plantas hasta en 100%, concordando con los efectos negativos de los hidrocarburos en esta simbiosis (Verdin *et al.* 2006, Hernández-Ortega *et al.*, 2012). Sin embargo, la respuesta de los HMA ante

contaminantes orgánicos depende en muchos casos de la especie de HMA y del tipo de hidrocarburo al que estén expuestos (Volante *et al.* 2005, Alarcón *et al.* 2006).

A manera de conclusión, la bioestimulación y la bioaumentación proporcionaron mayor tolerancia y acumulación de biomasa seca, e ICP de *C. equisetifolia* en presencia de diésel. La bioestimulación debe ser cuidadosamente seleccionada con base en las fuentes fertilizantes, ya que el Floranid produjo efectos negativos en el crecimiento vegetal, mientras que el Triple 17 produjo efectos sinérgicos con los microorganismos inoculados, en el crecimiento de *C. equisetifolia* en el suelo contaminado con diésel.

## AGRADECIMIENTOS

Trabajo financiado por el proyecto SEP-CONACYT 79456; María Esther Díaz-Martínez agradece el apoyo del CONACYT durante sus estudios de postgrado.

## RESUMEN

La fitorremediación es una biotecnología ecológicamente racional que está dirigida a la limpieza de suelos contaminados; sin embargo, el estudio de especies arbóreas para la fitorremediación de suelos con hidrocarburos del petróleo es limitado. Más aún, la combinación de la fitorremediación con procesos de bioaumentación y bioestimulación es también limitada. Por lo anterior, este estudio evaluó el efecto de la inoculación de *Glomus intraradices*, un consorcio bacteriano (M2BOS1-R2 y M2BOS1-F4) y *Trichoderma viride* en el crecimiento de plantas de *Casuarina equisetifolia* L. fertilizadas con Floranid® o Triple 17, en suelo contaminado con diésel (7 500mg/kg). El experimento factorial 2x5x3 incluyó 30 tratamientos y 10 repeticiones, distribuidos completamente al azar en invernadero, durante 120 días. El diésel disminuyó significativamente la altura, la biomasa total y el índice de calidad (ICP) de planta. *Glomus* o las bacterias aumentaron significativamente la altura, la biomasa seca total y el ICP con respecto al tratamiento sin inocular o con la triple inoculación. El Floranid redujo el crecimiento vegetal y el ICP, en presencia de diésel. El Triple 17 combinado con los tres microorganismos produjo mayor crecimiento vegetal en ausencia de contaminación, pero en presencia de diésel, el Triple 17 combinado con bacterias o con *Trichoderma*, estimuló la biomasa seca total y el ICP. La colonización micorrízica fue inhibida por el diésel, especialmente con

la fertilización del Floranid. El Triple 17 (bioestimulación) combinado con los microorganismos (bioaumentación), favoreció el crecimiento de *Casuarina* en suelo contaminado con diésel.

**Palabras clave:** fertilizantes inorgánicos, consorcio bacteriano, *Glomus*, *Trichoderma*, fitotoxicidad.

## REFERENCIAS

- Adams, R.H. & F. Morales-García. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en el suelo del trópico I: Consideraciones para la salud pública y protección al ganado. *Interciencia* 37: 476-482.
- Aitchison, E.W., S.L. Kelley, J.P. Alvarez & J.L. Schnoor. 2000. Phytoremediation of 1,4-dioxane by hybrid poplar trees. *Water Environ. Res.* 72: 313-321.
- Alarcón, A., F.T. Davies Jr., R.L. Autenrieth & D.A. Zuberer. 2008. Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhanced phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Int. J. Phytorem.* 10: 251-263.
- Alarcón, A., J. Delgadillo-Martínez, A. Franco-Ramírez, F.T. Davies Jr. & R. Ferrera-Cerrato. 2006. Influence of two polycyclic aromatic hydrocarbons on spore germination, and phytoremediation potential of *Gigaspora margarita-Echinochloa polystachya* symbiosis in benzo(a)pyrene-polluted substrate. *Rev. Int. Contam. Amb.* 22: 39-47.
- Alcalá, J., M. Sosa, M. Moreno, C. Quintana, G. Quintana, S. Miranda & A. Rubio. 2008. Metales pesados en suelo urbano como un indicador de la calidad ambiental urbana: Ciudad de Chihuahua, México. *Multequina* 17: 39-54.
- Argumedo-Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato & J.J. Peña-Cabriales. 2009. El género fúngico *Trichoderma* y su relación con contaminantes orgánicos e inorgánicos. *Rev. Int. Contam. Amb.* 25: 257-269.
- Argumedo-Delira, R., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, J.J. Almaraz & J.J. Peña-Cabriales. 2012. Tolerance and growth of 11 *Trichoderma* strains to crude oil, naphthalene, phenanthrene and benzo[a]pyrene. *J. Environ. Manag.* 95: 291-299.
- Bento, F.M., F.O. Camargo, B.C. Okeke & W.T. Frankenberger. 2005. Comparative bioremediation of soils contaminated with diesel oil by natural attenuation, biostimulation and bioaugmentation. *Biores. Technol.* 96: 1049-1055.
- Boonchan, S., M.L. Britz & G.A. Stanley. 2000. Degradation and mineralization of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by defined fungal-bacterial cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 1007-1019.

- Börkman, T., L.B. Lanchard & G. Harman. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 sweet corn by *Trichoderma harzianum*: Effect of environmental stress. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 23: 295-322.
- Bruzón, S.N., A.V. Mato & C.P. Milan. 2003. Prueba de especies forestales en áreas devastadas por la minería a cielo abierto en Holguín. *Centro Agrícola* 30: 80-85.
- Castillo, R.F., R.D. Roldan, P.R. Blasco, R.M. Huertas, D.F. Caballero, C. Moreno-Vivían & M. Luque-Romero. 2005. *Biotechnology ambiental*. Editorial Tébar, S.L. Madrid, España.
- Chaîneau, C.H., G. Rougeux, C. Yepremian & J. Oudot. 2005. Effects of nutrient concentration on the biodegradation of crude oil and associated microbial populations in the soil. *Soil Biol. Biochem.* 37: 1490-1497.
- Cheung, K.C., J.Y. Zhang, H.H. Deng, Y.K. Ou, H.M. Leung, S.C. Wu & M.H. Wong. 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Biores. Technol.* 99: 2148-2155.
- CONABIO. 2009. Ficha informativa sobre *Casuarina equisetifolia*. (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad). Consultado: Mayo 2010, <http://www.conabio.gob.mx/malezasde-mexico/casuarinaceae/casuarina-equisetifolia/fichas/ficha.htm>.
- Dalal, J., P.M. Sarma, M. Lavania, A.J. Mandal & B. Lal. 2010. Evaluation of bacterial strains isolated from oil-contaminated soil for production of polyhydroxyalkanoic acids (PHA). *Pedobiologia* 54: 25-30.
- Debiane, D., G. Garçon, A. Verdin, J. Fontaine, R. Durand, A. Grandmougin-Ferjani, P. Shirali & A.L. Sahraoui. 2008. *In vitro* evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Environ. Exp. Bot.* 64: 120-127.
- Dickson, A., A.L. Leaf & I.E. Hosner. 1960. Quality appraisal of white spruce and white pine seedlings stock in nurseries. *Forest Chron.* 36: 10-13.
- El Fantroussi, S. & S.N. Agathos. 2005. Is bioaugmentation a feasible strategy for pollutant removal and site remediation? *Curr. Opin. Microbiol.* 8: 268-275.
- Farias, V., T. Maranhão, E. Carvalho de Vasconcelos, G.L. Lacerda, A.J. Menegassi, A. Pandey & C.R. Soccol. 2009. Phytodegradation potential of *Erythrina cristagalli* L., Fabaceae, in petroleum-contaminated soil. *Appl. Biol. Biotechnol.* 157: 10-22.
- Finck, A. 1988. *Fertilizantes y fertilización*. Reverte S.A., Barcelona, España.
- Garbisu, C.L., L. Amézaga & I. Alkorta. 2002. Bioremediación y Ecología. *Ecosistemas* 2002/11-3. (Consultado: diciembre 2012, <http://www.aacet.org/ecosistemas/023/opinion1.htm>).
- Gerdemann, J.W. & T.H. Nicolson. 1963. Spores of mycorrhizal Endogone species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 46: 234-244.
- Gentry, T.J., C. Rensing & I.L. Pepper. 2004. New approaches for bioaugmentation as a remediation technology. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 34: 447-494.
- Gravel, V., H. Antoun & R. Tweddell. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil. Biol. Biochem.* 39: 1968-1977.
- Harrison, M.J. 1999. Molecular and cellular aspects of the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 50: 361-389.
- Hernández-Ortega, H.A., A. Alarcón, R. Ferrera-Cerrato, H.A. Zavaleta-Mancera, H.A. López-Delgado & M.R. Mendoza-López. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel-contaminated substrate. *J. Environ. Manag.* 95: 319-324.
- Hii, Y.S., A.T. Law, N.A. Shazili, M.K. Abdul-Rashid & C.W. Lee. 2009. Biodegradation of Tapis blended crude oil in marine sediment by a consortium of symbiotic bacteria. *Int. Biodeter. Biodegr.* 63: 142-150.
- Hughes, A.K., P. Bridge & M.S. Clark. 2007. Tolerance of Antarctic soil fungi to hydrocarbons. *Sci. Total Environ.* 372: 539-548.
- Hutchinson, S.L., M.K. Banks & A.P. Schwab. 2001. Bioremediation and biodegradation. *Phytoremediation of aged petroleum sludge: Effect of inorganic fertilizer*. *J. Environ. Qual.* 30: 395-403.
- Jiménez, B.E. 2002. La contaminación ambiental en México. *Limusa S.A. de C.V. México*, D.F. México.
- Keum, Y.S., J.S. Seo, Y. Hu & Q.X. Li. 2006. Degradation pathways of phenanthrene by *Sinorhizobium* sp. C4. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71: 93-941.
- Kirk, J.L., P. Moutoglis, J.K. Lironomos, H. Lee & J.T. Trevors. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and *in vitro* transformed carrot root cultures. *Plant Soil* 270: 23-30.
- Leyval, C., E. Joner, C. del Val & K. Haselwandter. 2001. Potential of arbuscular mycorrhiza for bioremediation. *Mycorrhiza* 7: 308-317.
- Lin, Q. & I.A. Mendelssohn. 2009. Potential of restoration and phytoremediation with *Juncus roemerianus* for diesel-contaminated coastal wetlands. *Ecol. Eng.* 35: 85-91.
- Lin, Q., A. Mendelssohn, M.T. Suidan, K. Lee & A.D. Venosa. 2002. The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh

- grass, *Spartina alterniflora*. Mar. Pollut. Bull. 44: 897-902.
- Liu, S.L., Y.M. Luo, Z.H. Cao, L.H. Wu, K.Q. Ding & P. Christie. 2004. Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. Environ. Geochem. Health 26: 285-293.
- López-Martínez, S., E.M. Gallegos-Martínez, F.L. Pérez & R.M. Gutiérrez. 2005. Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. Rev. Int. Contam. Ambient. 21: 91-105.
- Mancera, L.M., G.F. Esparza, G.B. Chavez, V.R. Rodríguez, C.G. Saucedo & C.J. Barrera. 2008. Bioremediation of an aged hydrocarbon-contaminated soil by a combined system of biostimulation-bioaugmentation with filamentous fungi. Int. Biodeter. Biodegr. 61: 151-160.
- Menendez-Vega, D., R.J. Gallego, A. Palaez, C.G. Fernández, J. Montero, D. Muñoz & J. Sánchez. 2007. Engineered *in situ* bioremediation of soil and groundwater polluted with weathered hydrocarbons. Eur. J. Soil. Biol. 43: 310-321.
- Moezel, P.G., C.S. Walton, G.V. Perce & D.T. Bell. 1989. Screening for salinity and waterlogging tolerance in five *Casuarina* species. Landsc. Urban Plant 17: 331-337.
- Mrozik, A. & Z. Piotrowska-Seget. 2010. Bioaugmentation as a strategy for cleaning up of soils contaminated with aromatic compounds. Microbiol. Res. 165: 363-375.
- Ndiaye, P., D. Maily, M. Pineau & A.H. Margolis. 1993. Growth and yield of *Casuarina equisetifolia* plantations on the coastal sand dunes of Senegal as a function of microtopography. Forest Ecol. Manag. 56: 13-28.
- Ousley, M.A., J.M. Lynch & J.M. Whipps. 1994. Potential of *Trichoderma* spp. as consistent plant growth stimulators. Biol. Fertil. Soils 17: 85-90.
- Palmroth, M.R., J. Pichtel & J.A. Puhakka. 2002. Phytoremediation of subarctic soil contaminated with diesel fuel. Biores. Technol. 84: 221-228.
- Pardo, C.J., R.C. Perdomo & L.M. Benavides. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. NOVA 2: 44-49.
- Paris, C.I., J. Llusia & J. Penuelas. 2011. Indirect effects of tending ants on holm oak volatiles and acorn quality. Plant Signal. Beh. 6: 547-550.
- PEMEX. 2010. Anuario estadístico 2010 Petróleos Mexicanos. Consultado: 14 junio, 2011, [http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario\\_a.pdf](http://www.ri.pemex.com/files/content/pemex%20Anuario_a.pdf).
- Pezeshki, S.R., M.W. Hester, Q. Lin & J.A. Nyman. 2000. The effects of oil spill and clean up on dominant US Gulf coast marsh macrophytes: A review. Environ. Pollut. 108: 129-139.
- Phillips, J.M. & D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscularmycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. Trans. Br. Mycol. Soc. 55: 158-161.
- Primo, Y.E. 1996. Química orgánica y aplicada: de la molécula de la industria. Tomo 1. Reverte S.A., Barcelona, España.
- Purushothaman, A., P. Meenatchi & N. Saravanan. 2010. Biodegradation of some aromatic hydrocarbons (toluene and xylene) by a bacterial strain isolated from petroleum contaminated site in Chennai. Asian J. Biol. Sci. 5: 206-210.
- Rambeloarisoa, E., J.F. Rontani, G. Giusti, Z. Duvnjak & J.C. Bertrand. 1984. Degradation of crude oil by a mixed population of bacteria isolated from sea-surface foams. Mar. Biol. 83: 69-81.
- Reynoso-Cuevas, L., M.E. Gallegos-Martínez, F. Cruz-Sosa & M. Gutiérrez-Rojas. 2008. *In vitro* evaluation of germination and growth of five plant species on medium supplemented with hydrocarbons associated with contaminated soils. Biores. Technol. 99: 6379-6385.
- SAS Institute. 2000. User's Guide: Statistics, version 8.0. Statistical Analysis System, Institute. Cary, Carolina del Norte, EE.UU.
- Shanker, A.K., V. Ravichandran & G. Pathmanabhan. 2005. Phytoaccumulation of chromium by some multipurpose-tree seedlings. Agroforest. Syst. 64: 83-87.
- Silva, S.I., M. Grossman & L.R. Durrant. 2009. Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (2-7 rings) under microaerobic and very-low-oxygen conditions by soil fungi. Int. Biodeter. Biodegr. 63: 224-229.
- Singh, A., R.C. Kuhad, Z. Shareefdeen & O.P. Ward. 2004. Methods for monitoring and assessment of bioremediation processes, p. 279-304. In A. Singh & O.P. Ward (eds.). Biodegradation and bioremediation. Volumen 2. Soil Biology Series, Springer, Alemania.
- Singh, A., N. Parmar, R.C. Kuhad & O.P. Ward. 2011. Bioaugmentation, biostimulation, and biocontrol. Soil Biol. 28: 1-23.
- Singh, O.V., S. Labana, G. Pandey, R. Budhiraja & R.K. Jain. 2003. Phytoremediation: an overview of metallic ion decontamination from soil. Appl. Microbiol. Biotechnol. 61: 405-4012.
- Singh, G., M. Bhati & T. Rathod. 2010. Use of tree seedlings for the phytoremediation of a municipal effluent used in dry areas of north-western India: Plant growth and nutrient uptake. Ecol. Eng. 36: 1299-1306.
- Schnoor, J.L., L.A. Licht, S.C. McCutcheon, N.L. Wolfe & L. Carreira. 1995. Phytoremediation of organic

- and nutrient contaminants. *Environ. Sci. Technol.* 29: 318-323.
- Schoenmuth, B.W. & W. Pestemer. 2004. Dendroremediation of Trinitrotoluene (TNT). Part 1: Literature overview and research concept. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11: 273-278.
- Sun, W.H., J.B. Lo, F.M. Robert, C. Ray & C.S. Tang. 2004. Phytoremediation of petroleum hydrocarbons in tropical coastal soils I. Selection of promising woody plants. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 11: 260-266.
- Tamas, K. & G. Gullner. 2006. Dendroremediation: The use of trees in cleaning up polluted soils, p. 23-31. *In* M. Mackova, D. Dowling & T. Macek (eds.). VI. Phytoremediation Rhizoremediation. Dordrecht, Holanda.
- Tang, M., H. Chen, J.C. Huang & Z.Q. Tian. 2009. AM fungi effects on the growth and physiology of *Zea mays* seedlings under diesel stress. *Soil Biol. Biochem.* 41: 936-940.
- Tang, J., R. Wang, X. Niu & Q. Zhou. 2010. Enhancement of soil petroleum remediation by using a combination of ryegrass (*Lolium perenne*) and different microorganisms. *Soil Till. Res.* 110: 87-93.
- Tamboli, D.P., A.N. Kagalkar, M.U. Jadhav, J.P. Jajhva & S.P. Govindward. 2010. Production of polyhydroxyhexadecanoic acid by using waste biomass of *Sphingobacterium* sp. ATM generated after degradation of textile dye direct red 5B. *Biores. Technol.* 101: 2421-2427.
- Teng, Y., Y. Luo, M. Sun, Z. Liu, Z. Li & P. Christie. 2010. Effect of bioaugmentation by *Paracoccus* sp. strain HPD-2 on the soil microbial community and removal of polycyclic aromatic hydrocarbons from an aged contaminated soil. *Biores. Technol.* 101: 3437-3443.
- Thompson, L.M. & F.R. Troeh. 2002. Los suelos y su fertilidad. Reverte S.A., Madrid, España.
- Ubochi, K.C., V.I. Ibekwe & E.U.E. Zeji. 2006. Effect of inorganic fertilizer on microbial utilization of hydrocarbons on oil contaminated soil. *Afr. J. Biotechnol.* 5: 1584-1587.
- Valdés, M., R.A. Cayetano, M.A. Leyva & A.D. Camacho. 2004. Promoción del crecimiento en vivero de *Casuarina equisetifolia* (L.) por microorganismos simbioses. *Terra Latinoamer.* 22: 207-215.
- Verdin, A., A. Lounnés-Hadj, J. Fontaine, A. Grandmougin-Ferjani & R. Durand. 2006. Effects of anthracene on development of an arbuscular mycorrhizal fungus and contribution of the symbiotic association to pollutants dissipation. *Mycorrhiza* 16: 397-405.
- Volante, A., G. Lingua, P. Cesaro, A. Cresta, M. Puppo, L. Ariati & G. Berta. 2005. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. *Mycorrhiza* 16: 43-50.
- Volke, S.T. & T. Velasco. 2002. Tecnologías de Remedación para Suelos Contaminados. Instituto de Ecología, México, D.F., México.
- Walworth, J., A. Pond, I. Snape, J. Rayner, S. Ferguson & P. Harvey. 2007. Nitrogen requirements for maximizing petroleum bioremediation in a sub-Antarctic soil. *Cold Regions Sci. Technol.* 48: 84-91.
- Zhong, C., Y. Zhang, Y. Chen, Q. Jiang, Z. Chen, J. Liang, K. Pinyopusarerk, C. Franche & D. Bogusz. 2010. *Casuarina* research and applications in China. *Symbiosis* 50: 107-111.