



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES IZTACALA



**“EFECTO DE LA CONTAMINACIÓN DEL SUELO  
CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE  
PETRÓLEO SOBRE LA NODULACIÓN POR  
RIZOBIOS EN PLANTAS DE *Medicago sativa* Y  
SOBRE SU BIOMASA AÉREA Y SUBTERRÁNEA”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

AGUILAR HERNÁNDEZ ALONDRA

DIRECTORA DE TESIS:

DRA. TERESA GONZÁLEZ RUIZ



LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MÉXICO,  
MARZO, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *AGRADECIMIENTOS*

Al Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza por las facilidades otorgadas en el Laboratorio de Ecología Microbiana.

A la Dra. Teresa González Ruiz, directora de la presente tesis por su orientación y apoyo antes y durante la realización del trabajo.

Al comité de sinodales por sus oportunas y precisas observaciones:

Dr. Salvador Rodríguez Zaragoza

Dra. Elvia Lucía Pavón Mesa

Dra. Mayra Mónica Hernández Moreno

Mtra. Laura Mondragón Camarillo

A la refinería de Tula, Hidalgo perteneciente a PEMEX por su amable donación de petróleo crudo ligero (Istmo API 32) para la realización de esta tesis.

Esta tesis fue financiada con recursos de la UNAM, a través del Proyecto PAPPIT IN222618 “Diversidad y actividad biológica de actinobacterias del suelo de Zapotitlán: aislamiento, identificación y conservación de un banco de germoplasma”.

# ÍNDICE

Resumen .....	1
Introducción .....	2
Justificación .....	12
Hipótesis .....	12
Objetivos .....	13
Objetivo general .....	13
Objetivos particulares .....	13
Material y métodos .....	14
Obtención de bacterias: rizobios nodulantes .....	14
Preparación de microcosmos .....	15
Determinación de la tasa de germinación .....	15
Cuantificación de las variables biológicas .....	16
Resultados .....	19
Caracterización de las bacterias utilizadas .....	19
Efectos del petróleo en la germinación .....	20
Efectos en la nodulación .....	21
Evaluación de la longitud del tallo .....	23
Biomasa total .....	24
Evaluación de la parte subterránea .....	25
Evaluación de vigor de las plantas .....	27
Discusión .....	30
Efectos en la germinación de <i>M. sativa</i> .....	30

Efectos en la nodulación .....	32
Efectos en la biomasa aérea de <i>M. sativa</i> .....	35
Efectos en la biomasa subterránea de <i>M. sativa</i> .....	37
Conclusiones .....	38
Bibliografía .....	39

## ***ÍNDICE DE FIGURAS***

Figura 1. Nódulos encontrados en las raíces de <i>M. sativa</i> cultivada en una mezcla de suelos agrícolas .....	11
Figura 2. Registro fotográfico del cambio de pH en el medio de cultivo por las bacterias aisladas de nódulo de <i>M. sativa</i> a los dos días de crecimiento en cultivo en cajas con medio ELMA .....	20
Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas de <i>M. sativa</i> ( $\pm$ DE) en los diferentes tratamientos a los 6 días de exposición a diferentes concentraciones de petróleo .....	21
Figura 4. Número de nódulos encontrados en <i>M. sativa</i> ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo .....	22
Figura 5. Primordios de nódulos encontrados a las 8 semanas de exposición al petróleo .....	23
Figura 6. Longitud del tallo de <i>M. sativa</i> ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo .....	24
Figura 7. Biomasa total de <i>M. sativa</i> ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo .....	25
Figura 8. Longitud de la raíz de <i>M. sativa</i> ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo .....	26

Figura 9. Diámetro de la raíz de *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo ..... 27

Figura 10. Comportamiento de las variables que conforman el índice de vigor de *M. sativa* a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo ..... 28

Figura 11. Proporción de plantas de *M. sativa* en suelo contaminado con hidrocarburo por categoría de vigor ..... 29

Figura 12. Ejemplos de vigor cualitativo en plantas de *M. sativa* a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo ..... 30

## *RESUMEN*

El petróleo modifica las características físicas y químicas del suelo y afecta la disponibilidad de nutrientes y agua para las plantas y los microorganismos. La biorremediación de suelos basada en la interacción microorganismo-planta es una alternativa para remediar los suelos contaminados debido a la capacidad que tienen los microorganismos para utilizar los hidrocarburos como fuentes de carbono y producir moléculas que son benéficas para las plantas. En el presente trabajo se evaluó el efecto de 4 diferentes concentraciones de petróleo (8000, 16000, 32000 y 64000 ppm) sobre la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en plantas de *Medicago sativa* y sobre su germinación y biomasa aérea y subterránea. La evaluación de la germinación a los 6 días no presentó efectos negativos en las concentraciones de 8000 y 16000 ppm, manteniendo en promedio 85% de germinación. Después de 8 semanas de crecimiento, se observaron los efectos negativos de las concentraciones de 16000, 32000 y 64000 ppm en la longitud del tallo y de la raíz, y en la inhibición del proceso de nodulación en las concentraciones más altas. En la concentración de 8000 ppm se registró la mayor cantidad de nódulos en las plantas de *Medicago sativa*, así como el mayor diámetro y longitud promedio de las raíces. Los resultados sugieren que las bacterias reaccionaron al aporte extra de C en la concentración de 8000 ppm promoviendo la interacción con la planta en niveles superiores a los obtenidos en el grupo control, lo que indica un efecto subsidio por parte del C contenido en el petróleo y que, a concentraciones mayores de hidrocarburos en el suelo, hay afectaciones tanto en las plantas como en los microorganismos y en consecuencia en la interacción para producir nódulos fijadores de nitrógeno.

# *INTRODUCCIÓN*

El suelo es un sistema dinámico, compuesto por partículas minerales y agregados no consolidados provenientes de la erosión de las rocas. Además tiene un componente biológico muy diverso que como producto de su metabolismo, genera secreciones que funcionan como material adherente entre las partículas (Ibañez et al., 2004). La pedogénesis es el proceso de formación del suelo y se encuentra regulado por la interacción del clima, los organismos, la topografía, el material parental y el tiempo; elementos que, en conjunto, se conocen como factores formadores de suelo (Figueroa et al., 2018). Estos factores determinan la textura y la estructura, las cuales se consideran como las propiedades fundamentales del suelo.

La textura es la proporción de partículas de acuerdo con el tamaño que poseen en la matriz del suelo. Se agrupan en tres clases de acuerdo con el diámetro que alcanzan: arenas (2-0.02 mm), limos (0.02-0.002 mm) y arcillas (<0.002 mm). De esta manera, el tamaño de las partículas que predominan determina la textura del suelo (Jaramillo, 2002). La estructura es la disposición de macro y micro agregados que se producen por la floculación, cementación y reacomodo de las partículas del suelo, carbono orgánico, carbonatos y por la acción de las asociaciones iónicas y de la actividad biológica (Torres-Guerrero et al., 2013). El espacio entre los agregados permite la formación de poros a través de los cuales, el agua, el aire y los nutrimentos se difunden y almacenan. De esta manera, la textura y la estructura contribuyen con la regulación de la actividad biótica debido a que están directamente relacionadas con el contenido de agua y la aireación en la matriz del suelo (Voroney et al., 2015).

En el suelo se realizan múltiples procesos que representan servicios ambientales de gran importancia para el sostenimiento de la vida humana como la dinámica biogeoquímica y el reciclaje de los nutrimentos que sirven de soporte para el funcionamiento de los ecosistemas (Mendoza, 2018), la regulación y purificación del agua, el intercambio gaseoso, el soporte y hábitat para macro y microorganismos, la descomposición de la materia orgánica y la detoxificación

de compuestos derivados de los residuos sólidos urbanos o de eventos contaminantes como los derrames de petróleo (Torres-Guerrero et al., 2013).

El petróleo es una mezcla de compuestos orgánicos que se producen en el interior de la Tierra debido a la transformación de la materia orgánica acumulada en los sedimentos (Zamudio Chimal et al., 2018). Se conoce también como petróleo crudo y está compuesto en su mayoría por hidrocarburos insolubles en agua. El carbono (80-87%) y el hidrogeno (10-15%) son los elementos más abundantes en su composición; sin embargo, también contiene azufre (0-10%), nitrógeno (0-1%) y oxígeno (0-5%), ya sea en su forma elemental o bien, como grupos funcionales y algunos metales como el vanadio, níquel, hierro, aluminio y cobre en concentraciones variables que dependen del tipo de crudo y de la región en donde se formó (Botello, 2005).

Durante el proceso de explotación petrolera se pierde alrededor de la mitad del producto extraído, generando pérdidas económicas, pero también altos niveles de contaminación del aire, agua y suelo que afectan a los ecosistemas terrestres y marinos (Zamudio Chimal et al., 2018). En México, la industria petrolera ha registrado múltiples derrames a lo largo del tiempo, por lo que representa una fuente importante de contaminación del suelo y agua. Los derrames son causados por actividades directas como la perforación, extracción, refinación, transporte y transformación del petróleo y sus derivados, e indirectas como la fabricación de procesadores de gas y baterías de separación, ruptura o daños de oleoductos, centrales de almacenamiento y bombeo, daños en presas para el confinamiento de desechos sólidos y líquidos procedentes de la perforación y mantenimiento de pozos petroleros (Maldonado-Chávez et al., 2010; Ravi et al., 2022).

La presencia de hidrocarburos como el petróleo, aceites o combustóleo modifican las características físicas y químicas del sistema suelo, produciendo alteraciones en la dinámica biológica debido a la interrupción del intercambio de gases que se da con la atmósfera ( Pardo Castro et al., 2004; Vázquez-Luna et al., 2011). El nivel y tipo de daño a la biota dependen directamente de los componentes biológicos del ecosistema a donde llegan y de sus características como la temperatura, la humedad, la textura y la estructura del suelo, pero también de las propiedades

físicas y químicas del hidrocarburo, las cuales determinan su evaporación, penetración, toxicidad, solubilidad y tiempo de biodegradabilidad (Tabla 1; Benavides et al., 2006; Arias-Trinidad et al., 2017)

Tabla 1. Características y tipos de daños causado por petróleo.

<b>Característica</b>	<b>Tipo de daño</b>
<b>Toxicidad</b>	Los hidrocarburos aromáticos de bajo punto de ebullición resultan letales para la mayoría de los organismos terrestres y marinos. Mientras que los hidrocarburos parafínicos son menos tóxicos e incluso son altamente tolerables para los seres vivos.
<b>Solubilidad</b>	Los hidrocarburos de alto peso molecular son insolubles en agua. Sin embargo, los derivados del benceno y los naftalenos pueden ser solubilizados en agua; y esta solubilidad influye en la toxicidad de estos componentes en el medio marino.
<b>Biodegradabilidad</b>	La tasa de degradación depende de las características propias del hidrocarburo, así como el peso molecular de sus componentes.
<b>Volatilidad, densidad y actividad superficial</b>	Son indicadores de la tendencia del petróleo y sus componentes a la evaporación, a hundirse o bien, a dispersarse con mayor o menor facilidad.
<b>Carcinogenicidad</b>	Varios componentes del petróleo contienen sustancias potencialmente carcinógenas para el ser humano.

Modificado de: Zamudio Chimal, B. F., & Rosas Castro, J. A. (2018). *IMPACTO ECONÓMICO, SOCIAL Y AMBIENTAL GENERADO POR EL CAMPO PETROLERO PUERTO CEIBA EN PARAÍSO, TABASCO, MÉXICO*. Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional A.C, Coeditores. Recuperado a partir de <http://ru.iiec.unam.mx/id/eprint/3784>

La presencia de hidrocarburos en el suelo también altera la relación C:N que se obtiene de la degradación de la materia orgánica, ya que provoca un aumento en la concentración de C y por consiguiente, una disminución en la concentración

de N. No se cuenta con información generalizada de rangos óptimos, sin embargo, las relaciones entre 100:0.4 y 100:2 benefician los procesos metabólicos microbianos (Ñústez et al., 2014), por lo que la presencia de hidrocarburos aumenta los niveles de C por arriba de 100. Este cambio provoca la inmovilización de los nutrientes en el sistema y afecta la participación de las poblaciones microbianas en procesos tan importantes como la asimilación y el reciclado de nutrimentos en los ciclos biogeoquímicos (Vázquez-Luna et al., 2011). Otras afectaciones provocadas por los derrames de hidrocarburos son la reducción de la fertilidad del suelo, la afectación de la actividad enzimática, la disminución del crecimiento vegetal y en consecuencia, de la productividad agrícola (Mendoza, 2018).

En el caso de las plantas, los componentes del petróleo son capaces de inhibir la actividad enzimática del suelo (Alrumman et al., 2015) provocando a su vez, la reducción en la germinación de las semillas, el brote de los meristemos, la elongación radicular, y la actividad fotosintética (Arias-Trinidad et al., 2017; Xie et al., 2018). Además existe un daño severo en las membranas de las células corticales como consecuencia de la solubilización de los hidrocarburos en la zona de la raíz, lo que provoca un mayor gasto energético y, en consecuencia, la disminución del crecimiento de las plantas (Hernández-Valencia et al., 2017).

Ante la problemática de derrames de hidrocarburo se han implementado diferentes técnicas para remediar zonas contaminadas, las cuales, de acuerdo con Saval (1999), se clasifican por su efecto sobre los contaminantes en:

- Técnicas de retención - Confinamiento en celdas y barreras impermeables.
- Extracción o separación - Filtración por carbón activado, lavado con agentes tensoactivos, extracción de producto libre, extracción de vapores.
- Destrucción - Biorremediación, fitorremediación, e incineración.

De acuerdo con el principio básico de su funcionamiento, estas técnicas se clasifican en:

- \* Biológicas - Biorremediación, fitorremediación.
- \* Fisicoquímicas - Solidificación, estabilización, extracción de vapores.
- \* Térmicas - Desorción por inyección de vapor, incineración.

Aunque todas estas técnicas tienen como objetivo mejorar el suelo después de un derrame, algunas de ellas tienen un impacto ambiental severo, como es el caso de los tratamientos térmicos. En el caso de la incineración, se busca la eliminación de los contaminantes mediante la oxidación rápida de los hidrocarburos, obteniendo como productos finales  $CO_2$  y agua, por lo que es necesario el tratamiento adicional de los productos resultantes. Sin embargo, con las técnicas de remediación biológicas se espera lograr la oxidación lenta de los hidrocarburos mediante el metabolismo microbiano y vegetal. Durante este proceso, los organismos utilizan una fracción para la obtención de energía y otra fracción para la formación de estructuras necesarias en su biomasa. De esta manera se logra la eliminación de los contaminantes (Hidalgo et al., 2020; Rodríguez-Gonzales et al., 2022).

La mayoría de las técnicas requieren una gran cantidad de personal destinado a la mano de obra, así como el empleo de una gran cantidad de energía y equipo, lo cual aumenta considerablemente los costos de su implementación (Volke et al., 2002; Rodríguez-Gonzales et al., 2022). Sin embargo, los tratamientos biológicos son estrategias simples y efectivas que causan menor alteración de las características naturales del medio y son de menor costo económico en comparación con tecnologías térmicas y fisicoquímicas (Velasco et al., 2003; Rodríguez-Gonzales et al., 2022).

La biorremediación tiene como principio favorecer los procesos microbiológicos que de manera natural ocurren en el suelo y que conllevan a la degradación de los hidrocarburos. Su objetivo es conseguir la mineralización, transformando los compuestos químicos nocivos en compuestos inocuos o menos tóxicos como dióxido de carbono, agua o materia celular (Chan-Quijano et al., 2015).

La fitorremediación forma parte de la biorremediación y consiste en el uso de plantas con la capacidad de eliminar o transformar elementos considerados contaminantes con el fin de hacerlos inocuos para el ambiente y la salud humana (Peña-Castro et al., 2006). En este proceso, la germinación y la elongación de las raíces son dos etapas críticas en el desarrollo de las plantas. Las plantas que germinan de manera satisfactoria en suelos contaminados con hidrocarburos y

muestran elongación de sus raíces, se consideran tolerantes o con capacidad para acumular metales pesados y para reducir la concentración de hidrocarburos en el medio, por lo que pueden ser usadas en el campo de la fitorremediación (Hernández Valencia et al., 2017; Maceo et al., 2017). *Medicago sativa* es una especie de gran valor nutritivo, cuenta con un amplio sistema de raíces que surgen de la raíz principal, tiene características fisiológicas que le confieren una alta tolerancia a sequías y heladas y alta adaptación a distintas texturas de suelo. Esto la convierte en una especie altamente resiliente a cambios ambientales drásticos y un modelo aplicable al campo de la fitorremediación (Maceo et al., 2017).

La fitorremediación opera mediante diversos mecanismos, el más importante es la rizodegradación, la cual se basa en el incremento de las poblaciones de rizobacterias y el efecto benéfico de éstas sobre las plantas (Hernández Valencia et al., 2017). Las rizobacterias son bacterias que habitan en la zona del suelo que se encuentra unida a la raíz de las plantas y que se extiende algunos milímetros de la superficie del sistema radicular. A esta zona se le conoce como rizósfera y en ella se realizan algunas partes de los ciclos biogeoquímicos del C, N y P. Los compuestos carbonados que son generados por las raíces de las plantas estimulan la actividad microbiana, mientras que los microorganismos proveen a las plantas de compuestos nitrogenados y fosfatados, además de fitohormonas como las auxinas que estimulan el crecimiento vegetal (Velasco-Jiménez et al., 2019). Se estima que alrededor del 20% de los asimilados fotosintéticos solubles en agua, así como compuestos ácidos, aminos, hormonas, ésteres de fosfato de azúcar y vitaminas se localizan en la rizósfera (Frioni, 1999).

La degradación de compuestos orgánicos depende de la capacidad de los microorganismos para utilizarlos como fuentes de carbono (Pozzo, 2018). En el proceso de fitorremediación, las comunidades microbianas asociadas a la rizosfera son estimuladas por la presencia del hidrocarburo y, como producto de su actividad metabólica, degradan los contaminantes del suelo, consiguiendo la remoción, transferencia, estabilización o neutralización de los compuestos tóxicos (Chan-Quijano et al., 2015). Sin embargo, los componentes tóxicos del petróleo disminuyen las poblaciones bacterianas lo que conduce a una reducción

de la actividad degradadora y la hidrofobicidad y baja solubilidad en agua de los hidrocarburos totales de petróleo provoca que sean fuertemente absorbidos por las partículas de suelo lo que dificulta el contacto efectivo con los microorganismos (Ling et al., 2023).

El nitrógeno es uno de los componentes esenciales en los seres vivos, debido a que se encuentra presente en proteínas, ácidos nucleicos y otros componentes menores que forman parte de la célula (Postgate, 1998), por lo que se le considera como un nutriente primario determinante para la supervivencia de todos los organismos vivos. Sin embargo, en su forma molecular (gaseosa) no es asimilado por las plantas, pero si por microorganismos que poseen el compuesto enzimático nitrogenasa, encargado de transformar el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) en amonio ( $NH_4$ ). Cuando este proceso ocurre, el nitrógeno se vuelve biodisponible para los productores primarios (Guzmán et al., 2021).

Las bacterias fijadoras de nitrógeno (BFNA) son rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR por sus siglas en inglés: Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y han sido ampliamente utilizadas en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo. Estas bacterias, tienen la capacidad de convertir el nitrógeno molecular ( $N_2$ ) en iones de amonio ( $NH_4^+$ ) y nitrato ( $NO_3^-$ ) a través de la actividad de la enzima nitrogenasa. La característica de estos compuestos es que pueden ser metabolizados e incorporados por otros organismos vivos (Mendoza, 2018; Velasco-Jiménez et al., 2019).

La entrada de N inorgánico a la biósfera por el proceso de fijación de nitrógeno es un factor limitante para la productividad biológica en la mayoría de los ecosistemas terrestres y marinos (Postgate, 1998). El proceso de fijación de nitrógeno puede ocurrir de manera natural por organismos de vida libre, los cuales ocupan los compuestos nitrogenados para su propio consumo; o de manera endosimbiótica, donde las bacterias fijan el nitrógeno atmosférico y lo vuelven biológicamente disponible para la planta con la cual se relacionan. La planta a su vez les brinda protección y compuestos carbonados a las bacterias, al permitirles establecerse en el interior de la raíz, en un proceso conocido como nodulación. Durante este proceso, la raíz detiene la producción de auxina y sufre

una deformación que a simple vista se aprecia como un abultamiento al cual se le denomina nódulo, dentro del cual se realiza el proceso de fijación de nitrógeno. Este nitrógeno es asimilado directamente por la planta hospedera (Pérez López et al., 2016).

La fijación simbiótica de nitrógeno es el sistema con mayor captación de  $N_2$  debido no solo a la cantidad que fija, sino a la variedad de entornos en donde ocurre. Es un fenómeno ampliamente distribuido, ya que se ha registrado la simbiosis en 14 géneros de angiospermas, distribuidos en 8 familias y 7 órdenes, con aproximadamente 300 especies fijadoras de nitrógeno. Las asociaciones simbióticas más estudiadas corresponden a las leguminosas con rizobios, sin embargo, también se presenta la nodulación con angiospermas no leguminosas de los géneros *Alnus*, *Coriaria*, *Elaeagnus* e *Hippophae* (Guzmán et al., 2021). Los rizobios son un grupo muy diverso entre los que destacan los géneros *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Burkholderia*, *Mesorhizobium* y otras especies bacterianas (Ramírez-Puebla et al., 2019). La fijación simbiótica se ha estudiado principalmente en el campo de la agricultura, destacando el género *Rhizobium* como el principal representante del proceso de fijación simbiótica de nitrógeno por su estrecha relación con las leguminosas.

En las leguminosas el proceso de nodulación se encuentra mediado por la activación y la expresión de genes específicos de origen bacteriano y vegetal, que sirven de puente de comunicación entre la bacteria y la planta, lo cual desencadena la formación de nódulos en las raíces (Delgadillo-Martínez et al., 2020).

El mecanismo de infección de las bacterias ocurre a través de hilos de infección en los pelos radicales de las leguminosas, cuya formación está mediada por la propia planta. El proceso inicia con la señalización química entre *Rhizobium* y la planta hospedera a través de exudados de la raíz que contienen flavonoides, azúcares, fenoles, aminoácidos, ácidos dicarboxílicos y proteínas de tipo nodulinas y lectinas. Como respuesta a la presencia de estos compuestos, los rizobios se congregan en la zona de la rizósfera a través de la quimiotaxis (Delgadillo-Martínez et al., 2020) y se activa la expresión de genes nod con los

cuales, los rizobios emiten cadenas de n-acetil-glucosamina, conocidos como factores *Nod* (Delgadillo-Martínez et al., 2020). Estas moléculas son importantes para el reconocimiento entre la planta y las bacterias, y para producir cambios en el citoesqueleto de los pelos radiculares provocados por el flujo de calcio, haciendo que la epidermis de la planta hospedera se modifique y que los pelos radiculares se deformen y doblen. Este encorvamiento provoca que numerosas bacterias queden atrapadas dentro del bucle (Bianco, 2020; Delgadillo-Martínez et al., 2020).

En el interior del nódulo, los rizobios están separados del citoplasma vegetal por una membrana denominada peribacteroidal, que es generada por la planta hospedera. Las bacterias se dividen de manera sincrónica, sufriendo alteraciones morfológicas profundas hasta que finalmente se diferencian en bacteroides, los cuales poseen características específicas como la expresión de la actividad de la enzima nitrogenasa y de ciertos citocromos que se encuentran ausentes en otras bacterias de vida libre (Bianco, 2020). La enzima nitrogenasa contiene hierro y molibdeno, estos metales son necesarios para el transporte de electrones durante la reducción de N. Las células del nódulo presentan un característico color rojo producto del pigmento Leghemoglobina, encargado del transporte de oxígeno al bacteroide (Grageda-Cabrera et al., 2003).

Una vez formado el nódulo (Figura 1), la fijación de nitrógeno atmosférico ocurre por un periodo de tiempo determinado y posteriormente, cuando la actividad fijadora disminuye, se produce la lisis y la muerte celular (Chávez Álvarez et al., 2019), lo que permite liberar los compuestos nitrogenados e incrementar su biodisponibilidad en el medio.

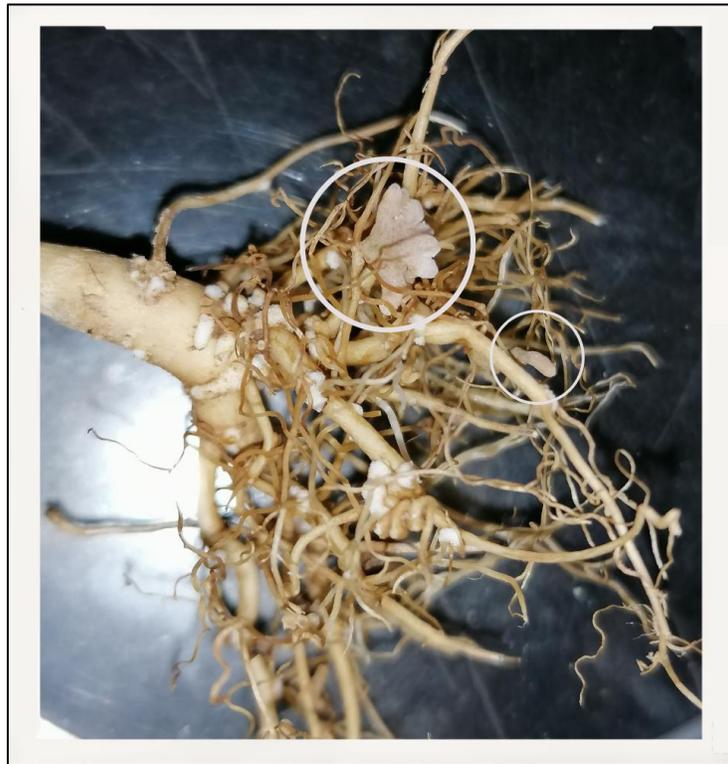


Figura 1. Nódulos encontrados en las raíces de plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) cultivada en una mezcla de suelos agrícolas (Imagen: Alondra Aguilar Hernández, 2022).

Los estudios enfocados a entender la relación entre los hidrocarburos y el proceso de fijación de nitrógeno en las leguminosas han mostrado resultados diversos tanto en la respuesta de la planta como en la formación de nódulos. Algunos reportes señalan que en presencia del hidrocarburo disminuye la altura de la planta, la longitud de las raíces, el número de nódulos y su biomasa total (Arias-Trinidad et al., 2017; Chávez Álvarez et al., 2019). Sin embargo, también se ha reportado que el petróleo favorece la capacidad de algunos rizobios para fijar el nitrógeno atmosférico (Ramirez, 2012; Esquivel-Cote et al., 2018), o que la presencia de hidrocarburos en el suelo incrementa el tamaño de la población diazotrófica, aunque al mismo tiempo, disminuye su diversidad (Esquivel-Cote et al., 2018). De esta manera, la regulación de la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en ambientes contaminados con hidrocarburos tiene múltiples enfoques de investigación. Por ello, mi pregunta de investigación fue la siguiente: ¿Cuál es el efecto de la contaminación del suelo contaminado con cuatro

diferentes concentraciones de petróleo sobre la nodulación por rizobios en plantas de *Medicago sativa* y sobre su biomasa aérea y subterránea?

## *JUSTIFICACIÓN*

El suelo es un sistema complejo, en donde se realizan múltiples interacciones biológicas que pueden verse afectadas por la presencia de agentes extraños como los hidrocarburos y otros contaminantes que ingresan vía las actividades humanas. Esto produce alteraciones en la comunidad microbiana y afecta negativamente el desarrollo de las plantas en el sitio contaminado. Sin embargo, durante las últimas décadas, el campo de la fitorremediación ha brindado alternativas importantes en la recuperación de los suelos contaminados a partir de la bioestimulación de la actividad de los microorganismos por efecto de los exudados radiculares de las plantas. Esto favorece el restablecimiento de los ciclos biogeoquímicos y la recirculación de los nutrimentos.

Dentro de las alternativas propuestas para la fitorremediación destaca el uso de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal, donde las bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno son de gran interés, debido a su capacidad para fijar el nitrógeno atmosférico y hacerlo biodisponible para las plantas. La formación de los nódulos fijadores permite observar los efectos positivos o negativos que el hidrocarburo genera en las bacterias, así como la respuesta de la planta ante la presencia del contaminante. Por tal motivo, el estudio de la fijación simbiótica de nitrógeno representa un excelente modelo en el campo de la fitorremediación para brindar alternativas en la recuperación de suelos contaminados con hidrocarburos.

## *HIPÓTESIS*

Si la contaminación del suelo con petróleo tiene efectos negativos sobre el establecimiento y desarrollo de las plantas además de disminuir las poblaciones

microbianas, entonces la contaminación con cuatro diferentes concentraciones de petróleo afectará la germinación de las semillas, la biomasa aérea y subterránea de *M. sativa*, así como también habrá una disminución en el número de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de esta planta. Los efectos en estas variables incrementarán conforme aumente la concentración de petróleo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo general.**

Evaluar el efecto de cuatro concentraciones de petróleo (8000, 16000, 32000 y 64000 ppm) sobre la germinación de semillas y la biomasa aérea y subterránea de *Medicago sativa*, así como en la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en sus raíces.

### **Objetivos particulares.**

- ✧ Determinar la tasa de germinación de semillas de *M. sativa* inoculadas con rizobios en suelo contaminado con cuatro concentraciones de petróleo.
- ✧ Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de petróleo en el suelo sobre el número de nódulos fijadores de nitrógeno en las raíces de *M. sativa* a las 8 semanas de crecimiento.
- ✧ Evaluar el efecto de las diferentes concentraciones de petróleo sobre la longitud radical, la altura del tallo y el peso seco de la biomasa aérea y subterránea de *M. sativa*.

- ✧ Determinar el vigor de las plantas de *M. sativa* en las diferentes concentraciones de petróleo.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

### **Obtención de bacterias: rizobios nodulantes.**

Las bacterias del grupo de rizobios fueron aisladas directamente de nódulos de alfalfa (*Medicago sativa*) obtenidos de plantas trampa que germinaron y crecieron en una mezcla de suelos agrícolas donde se cultivaba alfalfa. Las semillas de alfalfa se colocaron directamente en microcosmos con la mezcla de suelo y se dejaron germinar y posteriormente crecer por un periodo de 2 meses.

Después de este periodo, las plantas trampa fueron extraídas de los microcosmos donde crecieron, para lavar las raíces con agua corriente con el fin de retirar las partículas restantes de suelo. Los nódulos se ubicaron y se cortaron con tijeras y se lavaron con una solución de cloro al 5% y se realizaron enjuagues sucesivos con agua destilada estéril para retirar los restos de cloro. Posteriormente, los nódulos se maceraron con mortero y pistilo, con el fin de liberar a los bacteroides. Finalmente, el macerado se sembró en cajas Petri con medio ELMAR, las cuales se incubaron por 3 días. Se verificó la pureza a partir de observaciones con microscopio óptico. Estos cultivos fueron la base para generar los inóculos usados en los experimentos en microcosmos.

Se consideró que las bacterias aisladas pertenecen al grupo de bacterias nodulantes conocidas genéricamente como rizobios, ya que fueron aisladas directamente de nódulos y además presentaron características típicas de este grupo. La caracterización de las bacterias se realizó mediante el cultivo en placa con medio ELMAR. Este medio contiene  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $NaCl$ , manitol como fuente de carbono, levadura, agar bacteriológico y el colorante azul de bromotimol, que sirve como indicador de pH. En este medio de cultivo, el crecimiento de los rizobios genera un halo alrededor de la colonia como producto del cambio de pH, de tal manera que las tonalidades amarillas del halo indican la

probable presencia de *Rhizobium sp*, mientras que las tonalidades azules indican la probable presencia de *Bradirhizobium sp*. (Delgadillo-Martínez et al., 2020). Se utilizaron los protocolos recomendados para la evaluación morfológica de las colonias (Zúñiga, 2012). Las bacterias utilizadas en este estudio presentaban halo de tonalidad amarilla.

### **Preparación de microcosmos.**

Los experimentos para evaluar la germinación, nodulación y monitoreo de la biomasa aérea y subterránea de *Medicago sativa* se realizaron en 30 microcosmos hechos en contenedores con capacidad de 1 l cada uno. A cada contenedor se le colocaron 600 g de suelo previamente secado al aire y esterilizado en autoclave, en tres ciclos de esterilización a 121°C y 1 libra de presión con una duración de 30 minutos por ciclo. Los microcosmos fueron asignados de manera aleatoria a 5 tratamientos correspondientes a cuatro concentraciones de petróleo (8000, 16000, 32000 y 64000 ppm) y un grupo control libre del contaminante. Se montaron 6 microcosmos por cada tratamiento y grupo control.

Para los tratamientos con petróleo, el suelo se contaminó con petróleo crudo ligero (Istmo API 32) donado por PEMEX en la refinería de Tula, Hidalgo. La contaminación con petróleo se realizó vertiendo la cantidad de petróleo necesaria para alcanzar las concentraciones mencionadas y homogeneizando de manera mecánica utilizando dos cucharas. Posteriormente, el suelo se llevó al 60% de la capacidad de campo con agua destilada estéril. Durante todo el tiempo de experimentación, el suelo se mantuvo en este nivel de humedad, a través del monitoreo del peso de los microcosmos.

### **Determinación de la tasa de germinación.**

Se utilizaron semillas de alfalfa previamente esterilizadas con hipoclorito de sodio al 5%. La determinación de la tasa de germinación de *Medicago sativa* en el suelo contaminado con las diferentes concentraciones de petróleo se realizó

directamente en los microcosmos, colocando un total de 15 semillas distribuidas de manera equidistante en cada microcosmos. Las semillas fueron inoculadas directamente con 10 ml de medio nutritivo líquido con rizobios a una concentración de  $9 \times 10^8$  células/ml. La cantidad de bacterias inoculadas fue estimada utilizando la curva de McFarland.

Se registró el número de semillas germinadas a los 6 días de su colocación en los microcosmos y se determinó el porcentaje de germinación tomando como referencia las 15 semillas colocadas en los microcosmos. El criterio para contabilizar las semillas germinadas fue que tuvieran la presencia de radícula emergente.

### **Cuantificación de las variables biológicas en plantas.**

Después de la germinación, las plantas se dejaron crecer por 8 semanas monitoreando y ajustando el contenido de humedad al 60% en caso de ser necesario. Después de este tiempo, los microcosmos se desmontaron para evaluar las variables biológicas: número de nódulos, longitud del tallo y raíz, peso seco de la biomasa y vigor de las plantas.

La extracción de plantas de los microcosmos se realizó volcando el recipiente en una charola limpia para retirar los restos del suelo y extraer de manera completa a las raíces. Se realizaron lavados continuos con agua corriente y un último enjuague con agua destilada. Después se contaron y cortaron los nódulos en cada planta de cada tratamiento y se midió la longitud del tallo utilizando una regla de 30 cm.

La longitud radicular se midió utilizando el software RhizoVision Explorer, el cual cuenta con licencia libre y está basado en el análisis de imágenes de alto contraste obtenidas con escáner (Seethepalli et al., 2020). Con esta herramienta se obtuvo la longitud de la raíz principal y de las raíces laterales, así como el número total de raíces y el diámetro promedio de éstas.

La biomasa aérea y subterránea se determinó en peso seco usando una balanza semianalítica. Finalmente, se determinó el vigor de las plantas usando una escala cualitativa y una cuantitativa. Para la escala cualitativa se utilizaron los criterios descritos en la tabla 2 y para la cuantitativa se utilizó la siguiente fórmula:

$$IV = (Longitud\ aérea + Longitud\ radicular) * pg$$

Donde:

IV = Índice de vigor

Pg = Porcentaje de germinación

Tabla 2. Escala para determinar de manera cualitativa el vigor de las plantas de alfalfa (*Medicago sativa*) en cada tratamiento.

Valor	Clasificación	Descripción	Ejemplo	
1	Vigor bajo	Plantas de talla pequeña con signos de clorosis, desarrollo anormal de las hojas y/o ausencia de éstas.		
2	Vigor medio	Plantas de talla mediana con hojas desarrolladas de tonalidades variables entre verde y amarillo. No presentan un gran número de ramificaciones.		
3	Vigor alto	Plantas de talla alta (sobresalen del contenedor) con gran cantidad de ramificaciones y hojas sanas de característico color verde, muestran un correcto desarrollo.		

Modificada de Guilcaso, B. C. O. (2012). Evaluación y selección agronómica de 18 genotipos de papa (*Solanum tuberosum*) para tolerancia al déficit hídrico en tres localidades de la sierra central. Universidad Politécnica Salesiana. Fotografías de Alondra Aguilar Hernández.

Como parte del análisis estadístico, se obtuvo el promedio y la desviación estándar de los seis microcosmos correspondientes a las variables porcentaje de germinación, número de nódulos (ambas variables transformadas con ARCOSENO), longitud de tallo, biomasa total, longitud de la raíz y diámetro de raíces en cada tratamiento. Después, los valores se analizaron con la prueba ANOVA y en caso de encontrar diferencias significativas entre los tratamientos, se utilizó la prueba de comparaciones múltiples de Tukey. En todos los casos se utilizó un  $\alpha = 0.05$ .

## *RESULTADOS*

### **Caracterización de las bacterias utilizadas**

El crecimiento colonial a los 2 días fue de tipo irregular con un diámetro de 2-4 mm y borde ondulado, coloración blanca-beige, apariencia opaca, textura cremosa y abundante producción de goma. El indicador de azul de bromotimol utilizado en el medio de cultivo viró hacia el amarillo alrededor de las colonias, lo que indica un cambio a pH ácido (Figura 2).

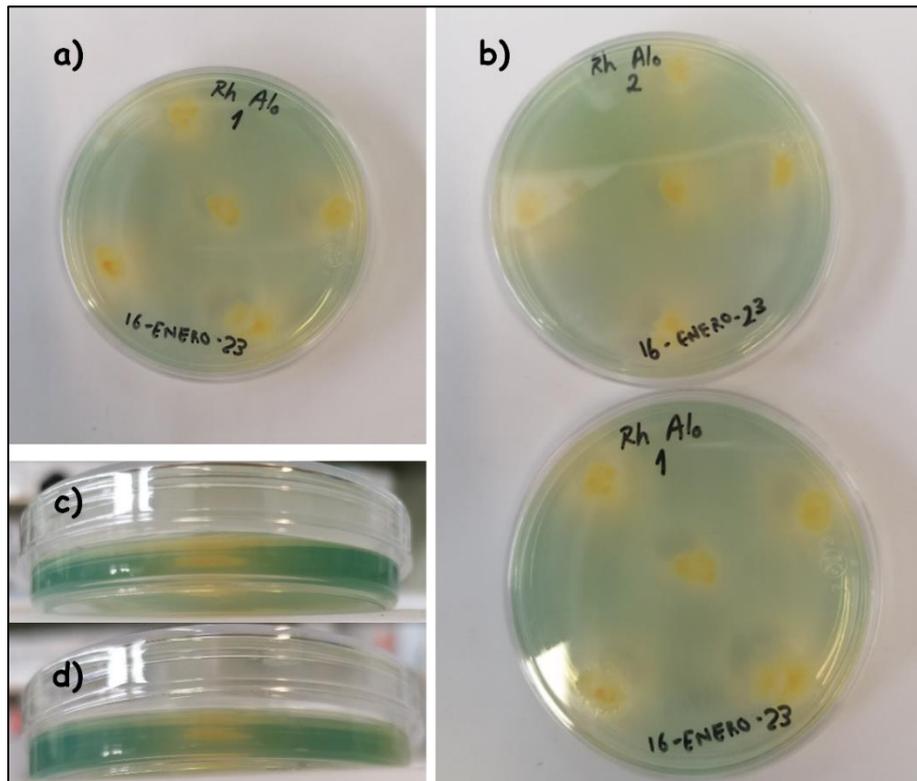


Figura 2. Registro fotográfico del cambio de pH en el medio de cultivo por las bacterias aisladas de nódulo de *Medicago sativa* a los dos días de crecimiento en cultivo en cajas con medio ELMA.  
Fotos: Alondra Aguilar Hernández.

### Efectos del petróleo en la germinación.

El grupo control obtuvo el mayor porcentaje de germinación (90%), seguido por los tratamientos de 16000 y 32000 ppm, con un 85.5% en promedio. Los porcentajes menores se obtuvieron con los tratamientos de 8000 y 64000 ppm con 84.4% y 55.5% respectivamente. El ANOVA mostró diferencias significativas entre los tratamientos y de acuerdo con la prueba de Tukey, el grupo control y las concentraciones de 8000, 16000 y 32000 ppm fueron estadísticamente diferentes respecto de la concentración más alta de petróleo (64000 ppm), donde se presentó el menor valor de germinación (Figura 3).

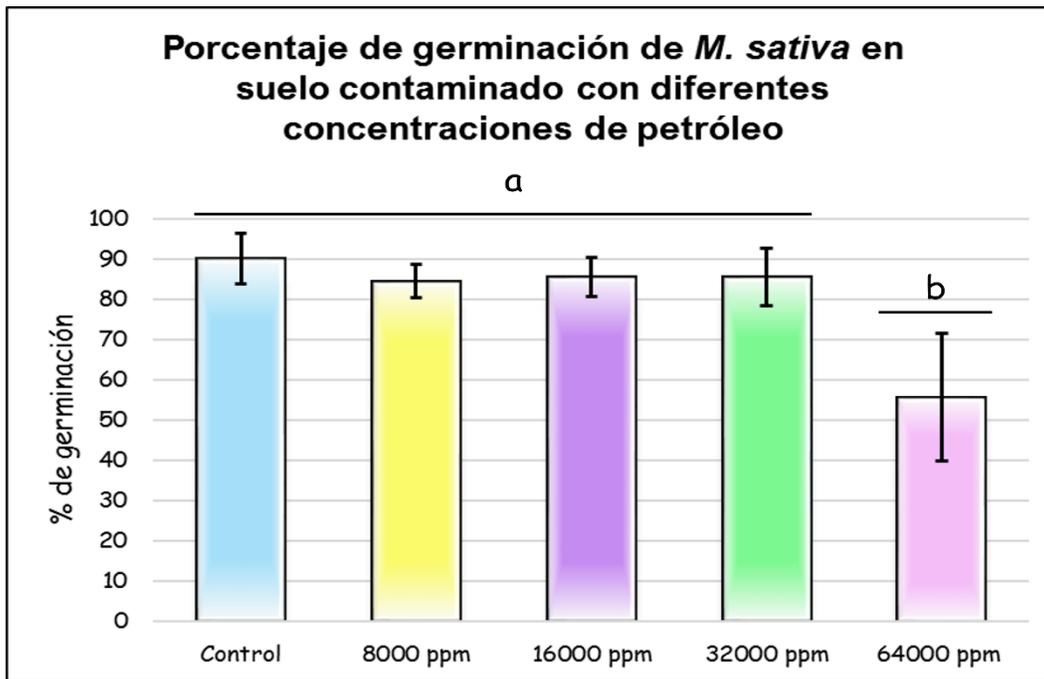


Figura 3. Porcentaje de germinación de semillas de *Medicago sativa* ( $\pm$ DE) en los diferentes tratamientos a los 6 días de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey  $P < 0.05$ ).

### Efectos en la nodulación.

La mayor cantidad de nódulos se encontró en la concentración de 8000 ppm con 75 nódulos en promedio por microcosmos; mientras que en el grupo control y la concentración de 16000 ppm, el número promedio de nódulos estuvo por debajo de 5. En las concentraciones de 32000 y 64000 ppm no se encontraron indicios de nodulación (Figura 4).

Los nódulos encontrados en 8000 ppm presentaron una coloración blanquecina en la parte exterior, con medidas inferiores a los 4 mm de diámetro, lo cual podría deberse a la falta de madurez del nódulo, ya que solo estuvieron 8 semanas en los microcosmos. Debido a la diferencia en los resultados para esta variable, no se aplicaron análisis estadísticos.

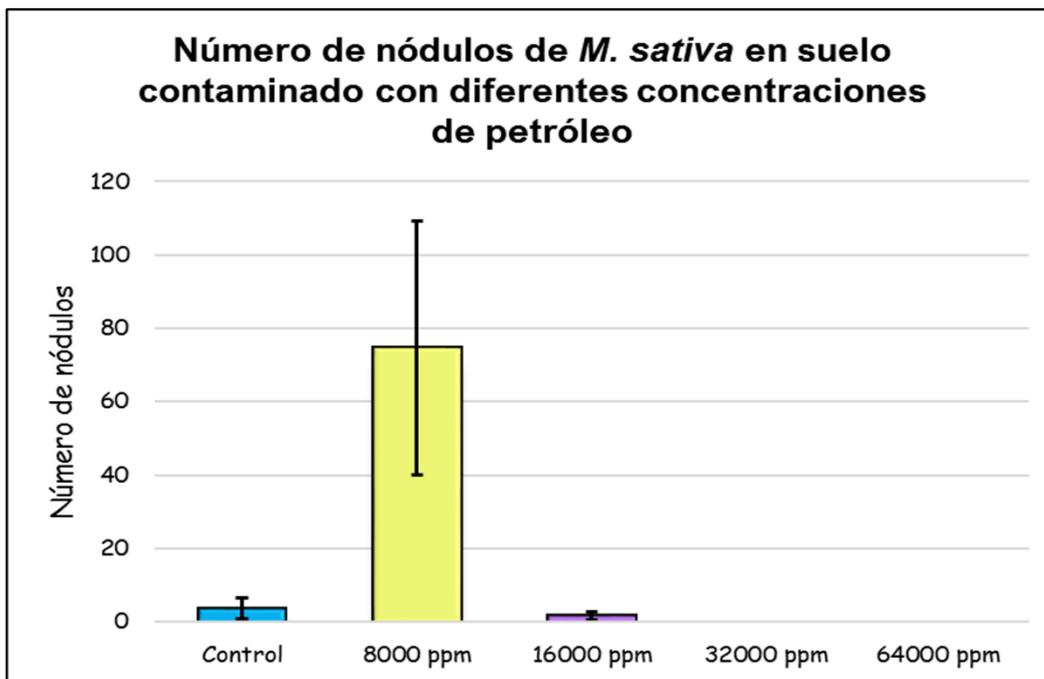


Figura 4. Número de nódulos encontrados en *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo.

En la figura 5 se observan algunos primordios de nódulos encontrados en el grupo control (a), así como en los tratamientos de 8000 ppm (b) y 16000 ppm (c y d) respectivamente. Todos los nódulos fueron observados en el microscopio estereoscópico con un aumento de 20x.

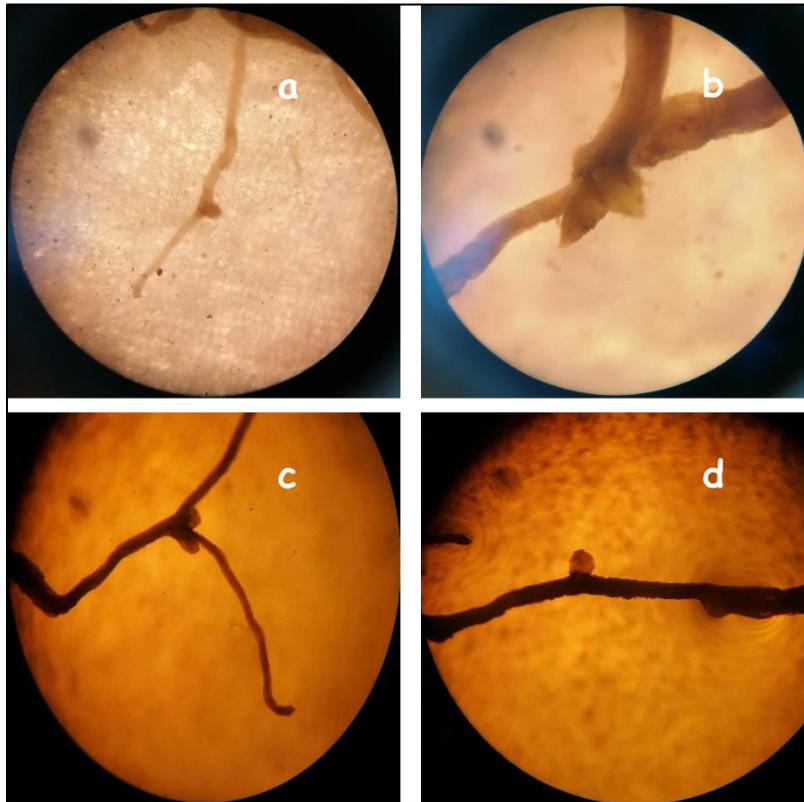


Figura 5. Primordios de nódulos encontrados en el grupo control (a) y en las concentraciones de 8000 ppm (b) y 16000 ppm (c y d) a las 8 semanas de exposición al petróleo. Fotos: Alondra Aguilar Hernández. Aumento: 20X.

### **Evaluación de la longitud del tallo.**

En la figura 6 se observa que el valor más alto de longitud de tallo corresponde al grupo control (15.45 cm), seguido por la concentración de 8000 ppm, con 7.59 cm y las concentraciones de 16000 y 32000 ppm, con valores de 4.54 y 4.40 cm respectivamente. La longitud promedio más baja (2.2 cm) se presentó en la concentración más alta (64000 ppm). Este comportamiento describe una relación inversamente proporcional, donde la longitud de las plantas disminuyó conforme aumentó la concentración de petróleo.

El análisis estadístico (Tukey  $P < 0.05$ ) mostró diferencias significativas entre los tratamientos, excepto en las concentraciones de 16000 y 32000 ppm, lo que

sugiere que los efectos adversos del petróleo en la longitud de las plantas son similares en esas concentraciones.

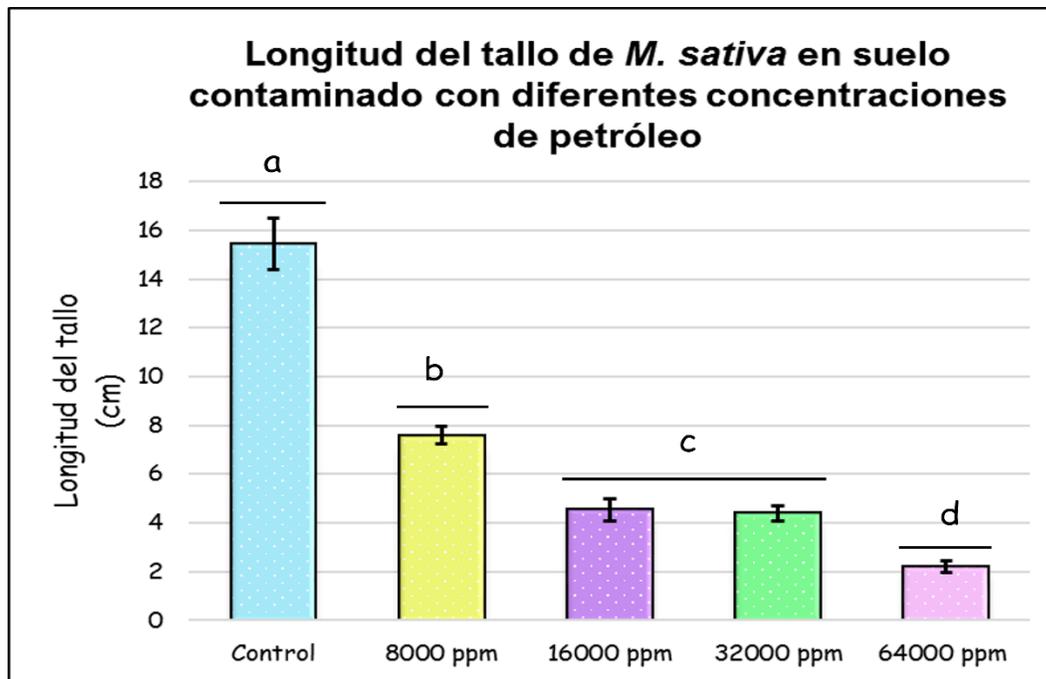


Figura 6. Longitud del tallo de *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey  $P < 0.05$ ).

### **Biomasa total**

El comportamiento de esta variable fue similar a la longitud del tallo; es decir, que al aumentar la concentración de petróleo disminuyó el valor de biomasa.

El valor promedio más alto se presentó en el grupo control (0.3213 g), seguido por la concentración de 8000 ppm (0.1783 g), 16000 ppm (0.07 g), 32000 ppm (0.038 g) y 64000 ppm (0.0026 g; Figura 7). Con estos resultados, el ANOVA indicó diferencias significativas entre los tratamientos. Con el análisis de Tukey ( $P < 0.05$ ) se encontraron diferencias significativas entre el grupo control y las cuatro concentraciones de petróleo (8000, 16000, 32000 y 64000 ppm). En el mismo sentido, la concentración de 8000 ppm fue significativamente diferente del resto

de las concentraciones de petróleo. Para el resto de las concentraciones, no se encontraron diferencias significativas entre el tratamiento de 16000 y 32000 ppm, ni entre 32000 y 64000 ppm.

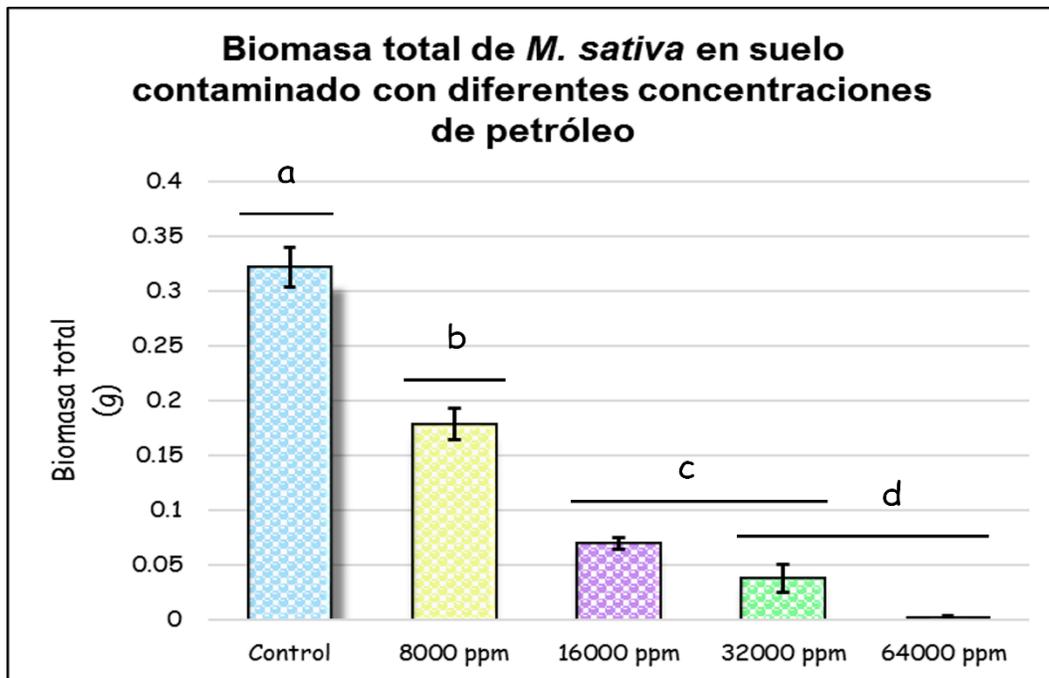


Figura 7. Biomasa total de *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey P < 0.05).

### Evaluación de la parte subterránea de *Medicago sativa*.

Los resultados de longitud radicular promedio se presentan en la figura 8. Destaca el hecho de que la mayor longitud de raíz no se presentó en el grupo control (4.51 cm), sino en la concentración de 8000 ppm (9.9 cm), y disminuyó gradualmente conforme se incrementó la concentración de petróleo.

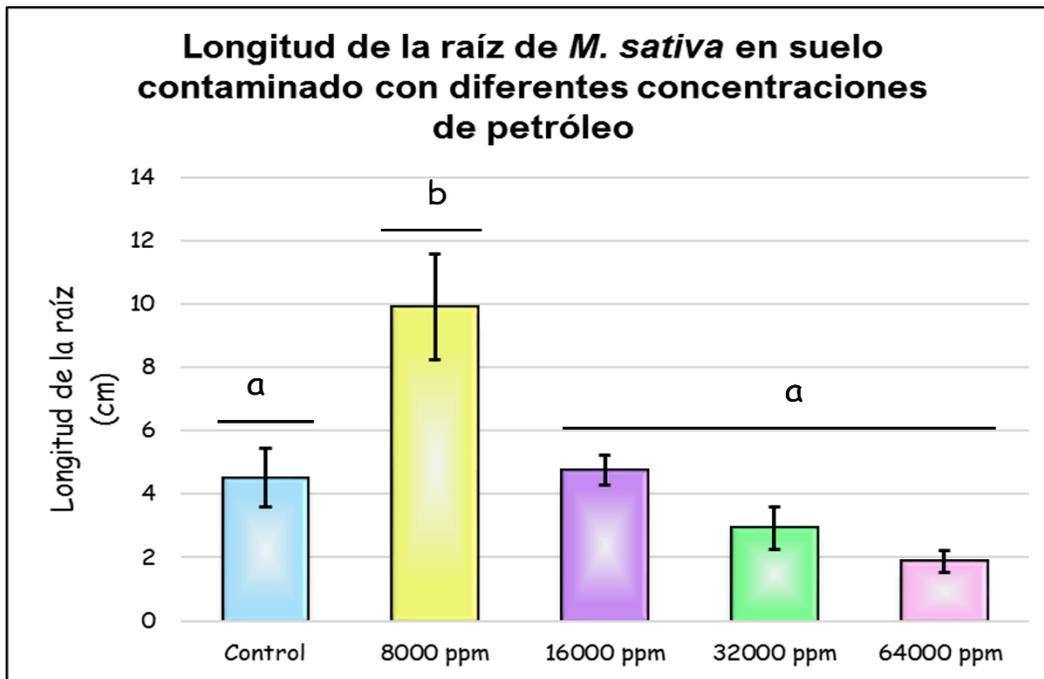


Figura 8. Longitud de la raíz de *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. Las letras diferentes indican diferencias significativas (Tukey  $P < 0.05$ ).

La prueba de ANOVA mostró diferencias significativas en la longitud promedio de la raíz entre los diferentes tratamientos, y de acuerdo con la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ) estas diferencias se encontraron en el grupo control y en la concentración de 8000 ppm y entre esta concentración y el resto de los tratamientos.

Respecto al diámetro promedio de las raíces, los resultados se presentan en la figura 9. El valor del diámetro más grande correspondió a la concentración de 8000 ppm (0.49 mm), seguido de la concentración de 32000 ppm y 64000 ppm con diámetros de 0.36 y 0.35 mm, respectivamente. Finalmente, la concentración de 16000 ppm y el grupo control obtuvieron los valores más bajos con 0.25 y 0.23 mm de diámetro promedio, respectivamente. A pesar de que el valor mayor se presentó en la concentración de 8000 ppm, el ANOVA no detectó diferencias significativas entre los tratamientos.

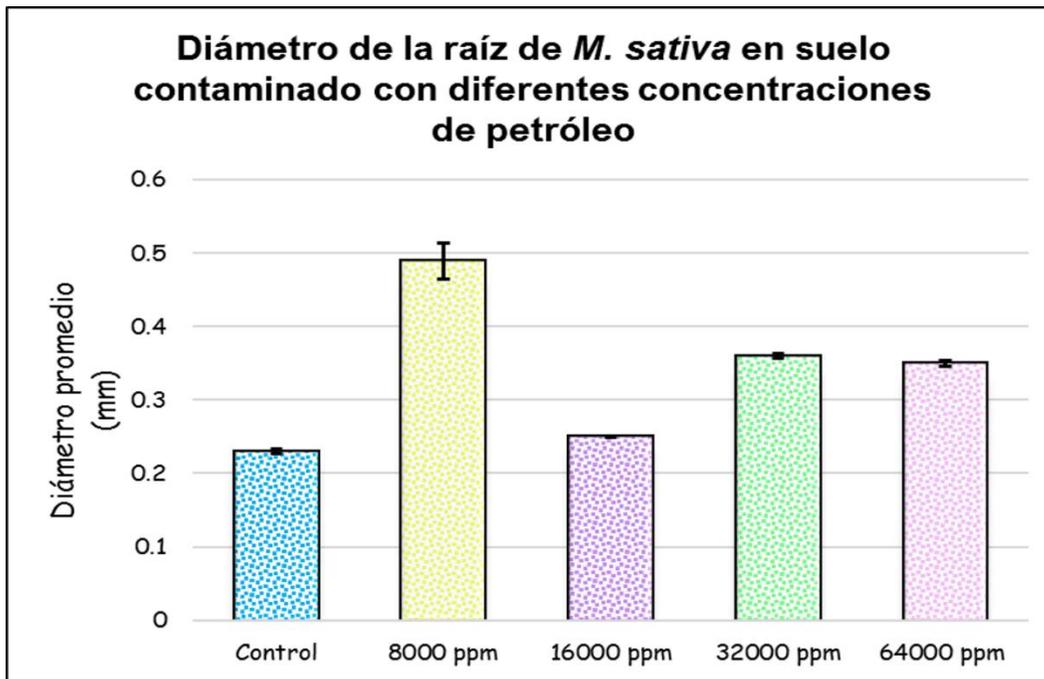


Figura 9. Diámetro de la raíz de *M. sativa* ( $\pm$ DE) a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo.

### Evaluación de vigor de las plantas.

El grupo control presentó el valor más alto del índice de vigor, mismo que está explicado por los altos valores en la longitud del tallo y por el porcentaje de germinación; sin embargo, en este grupo el valor de la longitud de la raíz fue bajo, similar al que se obtuvo para la concentración de 16000 ppm (Figura 10).

En los tratamientos con petróleo de 8000, 16000 y 32000, el porcentaje de germinación se mantuvo por arriba de 85%, pero el índice de vigor disminuyó debido a que resultaron afectadas las longitudes del tallo y de la raíz.

Para la concentración de petróleo más alta (64000 ppm), las tres variables incluidas en el cálculo del índice de vigor presentaron los valores más bajos de todos los tratamientos, lo que repercutió en el menor valor del índice (figura 10), quedando alrededor de 8 veces por debajo del IV del tratamiento control.

La tendencia general en el índice de vigor fue la disminución de su valor conforme aumentaba la concentración de petróleo, de tal manera que el valor más alto correspondió al grupo control (1796) y el más bajo a la concentración de 64000 ppm (226).

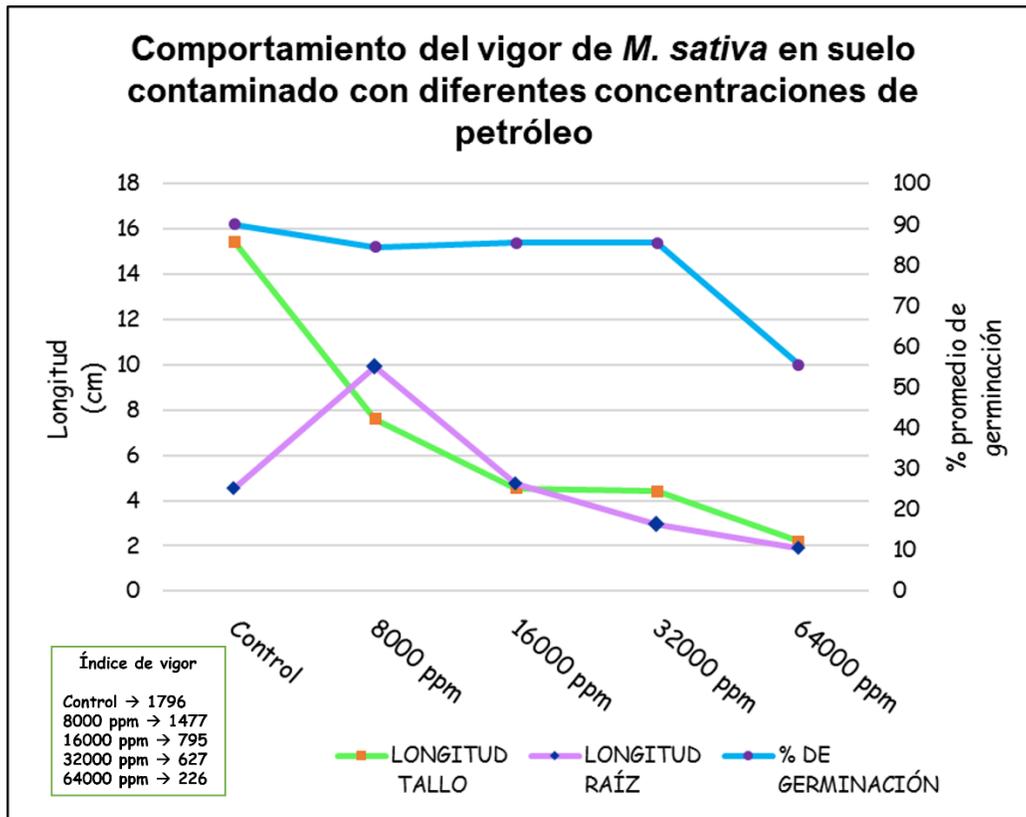


Figura 10. Comportamiento de las variables que conforman el índice de vigor de *M. sativa*: longitud del tallo, de la raíz y porcentaje de germinación, a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. El valor del índice de vigor se presenta en el recuadro inferior izquierdo.

En cuanto a la valoración cualitativa del vigor de las plantas (figura 11), los resultados fueron consistentes con los obtenidos con el índice de vigor cuantitativo, es decir, que la proporción de plantas con mayor vigor disminuyó de manera notoria con el incremento en la concentración de petróleo. En el grupo control, todas las plantas se ubicaron en la categoría de vigor alto, las plantas presentaron tallas altas, superiores a los 13 cm de altura, con ramificaciones abundantes, hojas y tallo de tonalidad verde intenso, desarrollo vegetativo normal y no presentaron signos de clorosis (Figura 12). Esta proporción

disminuyó a 33% en 8000 ppm y después ya no se encontraron plantas en esta categoría.

En sentido contrario, las plantas de vigor bajo no se encontraron en el grupo control ni en la concentración de 8000 ppm, y la presencia de éstas se fue incrementando acorde con el incremento de petróleo en el suelo. Las plantas de vigor medio presentaron tallas menores en comparación con las plantas de vigor alto (5 a 10 cm), menor número de ramificaciones, desarrollo vegetativo lento con hojas pequeñas aún en desarrollo, el color predominante fue verde, sin embargo, se observaron algunos signos de clorosis en las hojas. Por otro lado, las plantas de vigor bajo presentaron tallas menores a los 5 cm de altura, ramificaciones y número bajo de hojas, desarrollo vegetativo anormal y evidentes signos de clorosis (Figura 12).

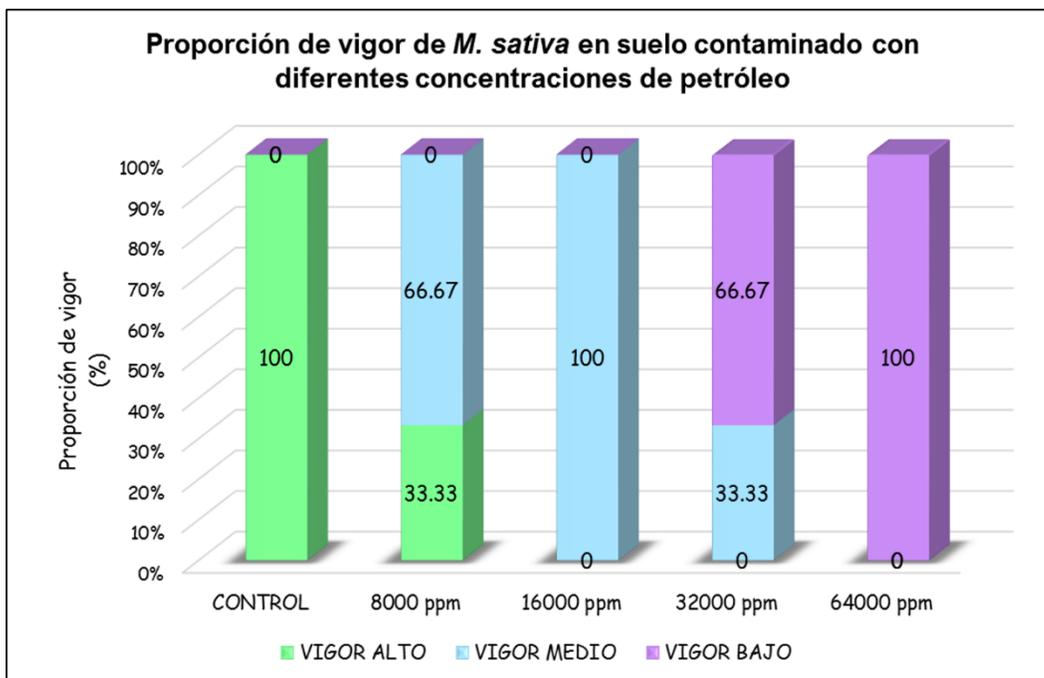


Figura 11. Proporción de plantas de *M. sativa* en suelo contaminado con hidrocarburo por categoría de vigor.

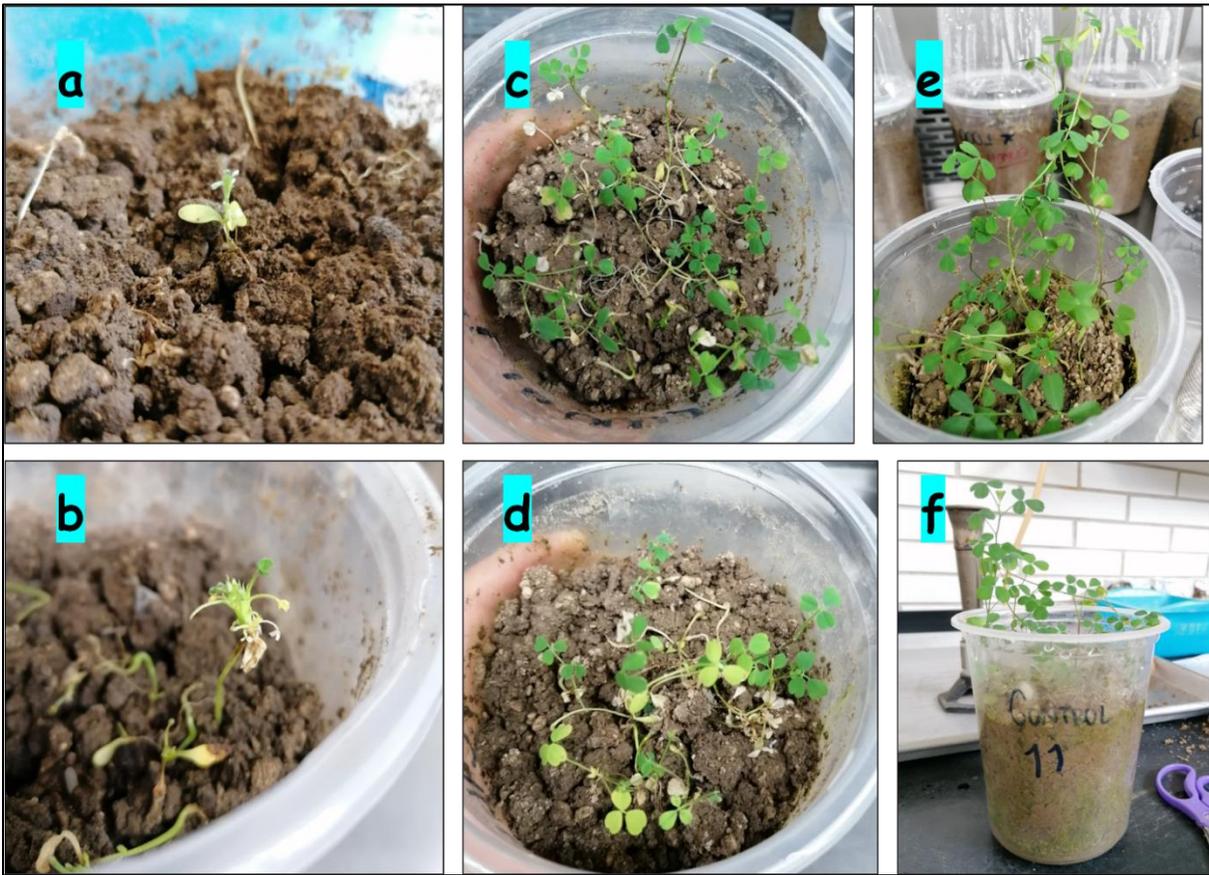


Figura 12. Ejemplos de vigor cualitativo en plantas de *M. sativa* a las 8 semanas de exposición a diferentes concentraciones de petróleo. Se presentan plantas de vigor bajo (a y b), vigor medio (c y d) y vigor alto (e y f).

## DISCUSIÓN

### Efectos en la germinación de *M. sativa*

En la presente investigación se estudiaron los efectos de cuatro diferentes concentraciones de petróleo sobre la germinación y el desarrollo de *Medicago sativa* y sobre la formación de nódulos fijadores de nitrógeno en asociación con bacterias del grupo de los rizobios. En términos generales se observó una afectación diferencial de las concentraciones del petróleo en las diferentes etapas y estructuras de la planta.

Durante la fase de germinación no se observó una disminución significativa de esta variable con las concentraciones de 8000 a 32000 ppm respecto del grupo

control; sin embargo, con la concentración de 64000 ppm esta disminución si fue estadísticamente significativa (Figura 3). Estos resultados indican que, para la germinación, las concentraciones menores a 64000 ppm no inhiben este proceso. Esta tendencia también fue reportada por Hernández-Valencia (2017) donde observó que a medida que aumentaba la gravedad API y la concentración de crudo, disminuía la germinación y el crecimiento de la radícula. En el estudio señalado, la mayor gravedad API utilizada fue 31, mientras que en la presente investigación fue de 32. Los grados API son una medida de la gravedad específica de los combustibles líquidos. Su magnitud determina si el crudo es liviano (superior a 30) o pesado (inferior a 30) (Gob.mx, 2021).

En el suelo, la densidad y cantidad del petróleo son factores que influyen en su capacidad de infiltración entre los agregados y con ello en la disponibilidad de agua y nutrimentos que son necesarios para el metabolismo de las plantas y los microorganismos. La inhibición del proceso de germinación observada en la concentración de 64000 ppm se puede asociar con las características propias del crudo utilizado, ya que los crudos ligeros (API 30-40) contienen mayor proporción de componentes volátiles que son capaces de penetrar con facilidad a través de las paredes celulares de las plantas y afectar las membranas provocando la alteración del intercambio de sustancias entre el interior y el exterior de las células y en condiciones extremas, puede causar lisis celular. Este tipo de moléculas volátiles se consideran tóxicas para el embrión porque afectan el proceso de germinación y la división celular debido al retardo en el desarrollo de la mitosis, o bien, por la alteración del proceso de alargamiento de las estructuras germinativas (Hernández-Valencia et al., 2017).

Otras vías de afectación a la semilla son la penetración de hidrocarburos en las células, lo cual induce cambios en el metabolismo intracelular que llevan a la marchitez, y el efecto hidrofóbico de los hidrocarburos que restringe el contenido de agua y oxígeno disponibles en el suelo. Ambos aspectos pueden inhibir la germinación o crear un efecto perjudicial en el crecimiento del embrión (Arias-Trinidad et al., 2017).

## **Efectos en la nodulación.**

Durante las ocho semanas de duración del experimento, se observaron diferencias morfológicas en las plantas crecidas en los diferentes tratamientos destacando la reducción de la biomasa y la longitud del tallo en las concentraciones más altas (32000 y 64000 ppm). La nodulación también resultó afectada en estas concentraciones, lo que indica que el petróleo afectó el establecimiento de la interacción entre *M. sativa* y los rizobios conforme se incrementó su concentración en el suelo. Por otro lado, en las concentraciones más bajas (8000 y 16000 ppm) se observaron primordios de nódulos que no alcanzaron a desarrollarse completamente en el tiempo que duró el experimento (Figuras 4 y 5).

El proceso de nodulación es una asociación altamente compleja donde las condiciones para el óptimo establecimiento de la relación bacteria-planta son específicas. Debido a efectos adversos que los hidrocarburos generan sobre el suelo, la planta y las bacterias, la respuesta observada en la nodulación sugiere un problema en el establecimiento de la relación rizobio - *M. sativa* en concentraciones superiores a las 8000 ppm. Las bacterias del grupo de los rizobios son heterótrofas por lo que requieren alguna fuente de carbono que les permita la obtención de energía. Como parte de sus procesos metabólicos, las enzimas del tipo oxigenasas catalizan la reacción en la que se incorporan átomos de oxígeno a la cadena inicial del hidrocarburo, permitiendo así su aprovechamiento (Sánchez et al., 2018). El petróleo es una mezcla de hidrocarburos que tienen como base de su cadena al carbono, por lo cual, al añadir el petróleo en el suelo, se generó un aporte extra de este elemento (C) que pudo ser aprovechado por la población de bacterias. Esta alta disponibilidad de carbono podría haber estimulado a la población de rizobios que fue inoculada, y contribuir de manera significativa a la formación de nódulos en la concentración de 8000 ppm y la acumulación de la biomasa aérea y subterránea de *M. sativa* en esta misma concentración (Figuras 4 y 10).

Este efecto de subsidio ya no se presentó en la concentración de 16000 ppm, lo cual podría deberse a que cuando se incrementa la cantidad de cualquier recurso

en el suelo, se genera un efecto tóxico para la población microbiana (Perez-Vargas et al., 2015). Este concepto es aplicable al aporte extra de materia orgánica e inorgánica que rompe el equilibrio entre el medio físico, químico y biológico del sistema suelo (Nápoles et al., 2005).

Existen bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que tienen la capacidad de utilizar hidrocarburos como única fuente de carbono (Perez-Vargas et al., 2015). Estas bacterias son capaces de utilizar los hidrocarburos totales como fuente de carbono y energía para su crecimiento y reproducción a través de la liberación de enzimas como dioxigenasas, peroxidases y catalasas, que oxidan a los hidrocarburos totales de petróleo y los transforman y degradan a compuestos menos tóxicos (Wong-Villarreal et al., 2017). En el caso de este trabajo se utilizaron bacterias simbióticas que respondieron con altos índices de nodulación hasta la concentración de 8000 ppm, lo que sugiere que el carbono del petróleo actuó como subsidio para la población microbiana y para las plantas.

El metabolismo más eficaz para la degradación de hidrocarburos es el aeróbico por lo que la presencia y disponibilidad de oxígeno son factores determinantes en la degradación del petróleo (Perez-Vargas et al., 2015). La presencia de hidrocarburos afecta el intercambio de gases y la correcta aireación al bloquear los poros del suelo como consecuencia de las propiedades aceitosas del petróleo, las cuales generan el aglutinamiento de partículas (Li et al., 1997). Esta disminución del oxígeno asociada al aumento en la concentración del hidrocarburo es un factor determinante en la disminución de la actividad degradadora ya que hay un efecto tóxico para la población de bacterias derivado del exceso de petróleo.

El petróleo también está involucrado en la inhibición de la formación de señales bioquímicas entre el rizobio y las plantas hospedadoras, así como en la reducción de la capacidad de división celular de las raíces de las plantas para formar los nódulos (López-Ortiz et al., 2012). En este trabajo, se observó la inhibición del proceso de nodulación en las concentraciones más altas, por lo que es posible sugerir que el exceso de hidrocarburo también afectó la comunicación química

entre los rizobios y las plantas, impidiendo la formación de los nódulos a partir de la concentración de 32000 ppm.

Diversos estudios apuntan a que la exposición al petróleo disminuye el número de nódulos producidos por *Rhizobium sp* y que esta disminución es más pronunciada conforme se incrementa la concentración de petróleo en el suelo. Así mismo, la presencia del hidrocarburo afecta de manera sustantiva la formación de leghemoglobina, que es la proteína relacionada directamente con la fijación biológica del nitrógeno (Chávez Álvarez et al., 2019). Por ejemplo, Arias et al. (2017) evaluaron la fitotoxicidad de diferentes concentraciones de petróleo sobre algunas características de los nódulos en *Phaseolus vulgaris*, encontrando una relación negativa entre la altura, la longitud de las raíces, el número de nódulos y la biomasa total y las concentraciones más altas de hidrocarburos totales de petróleo (HTP). Entre sus principales resultados, estos autores observaron diferencias significativas en la marchitez de las plantas a partir del día 68 en concentraciones mayores a 3000 mg/kg HTP (3000 ppm). En otro estudio realizado por Chávez et al. (2019) se evaluó la respuesta fitotóxica de 4 diferentes concentraciones de petróleo sobre la leguminosa *Mimosa pigra* (zarza). Se encontró que una de las variables más sensibles a la exposición con el agente contaminante era la cantidad de nódulos, ya que se registró una disminución significativa a medida que aumentaba la concentración. La máxima concentración utilizada por estos autores fue de 14303 mg/kg HTP (14303 ppm), no obstante, la presencia de nódulos no fue inhibida por completo, pero sí la de leghemoglobina.

La tendencia descrita en estas investigaciones coincide parcialmente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, ya que la nodulación resultó afectada en las concentraciones más altas (32000 y 64000 ppm), pero en la de 8000 ppm se observó un posible efecto de subsidio reflejado en la estimulación del proceso de nodulación y en la respuesta de la planta. Sin embargo, en la presente investigación, la apariencia externa de los nódulos en la concentración de 8000 ppm indicó falta de madurez probablemente por el tiempo que duró el experimento, por lo que no fue posible observar de manera clara el característico color rosáceo del nódulo, el cual es un indicador de la actividad de la enzima

nitrogenasa. El pequeño tamaño y coloración clara de los nódulos también podrían deberse a que esta concentración de petróleo sí permitió el establecimiento de la interacción rizobio-planta, pero interfirió con la madurez del nódulo y con la actividad de enzima fijadora de nitrógeno. Chávez Álvarez et al. (2019) señalan que la presencia de hidrocarburos afecta de manera sustantiva la formación de leghemoglobina, que es la proteína relacionada directamente con la fijación biológica del nitrógeno.

En otro estudio realizado por Ramirez (2012) se evaluó el efecto de hidrocarburos totales de petróleo en dos fases de crecimiento vegetativo para el frijol *Vigna unguiculata*, así como el efecto sobre bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre y *Rhizobium* en asociación con el sistema radicular. Observó efectos negativos en el crecimiento de la planta, los cuales no resultaron inversamente proporcionales a la dosis de hidrocarburo utilizada, ya que durante la fase de plántula el efecto negativo sobre la asociación de *Rhizobium* en las diferentes concentraciones de petróleo fue evidente; sin embargo, en la fase de planta, se presentó una estimulación del crecimiento vegetal por las dosis altas del hidrocarburo. A diferencia de los estudios descritos, en el presente trabajo la estimulación dada por el hidrocarburo fue observable en la concentración más baja, mientras que, en las concentraciones más altas, el petróleo no permitió que se estableciera la relación microorganismo-planta, impidiendo la nodulación y disminuyendo el vigor de la planta de manera considerable.

### **Efecto en la biomasa aérea de *M. sativa*.**

Respecto de la planta, la evaluación de la parte aérea (longitud del tallo) como resultado de la exposición al petróleo mostró una disminución estadísticamente significativa en todos los tratamientos con respecto del grupo control; sin embargo, las concentraciones 16000 y 32000 ppm no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. El comportamiento general de esta variable también fue inversamente proporcional al aumento en la concentración de petróleo. De igual manera, la biomasa total presentó un comportamiento decreciente como respuesta al aumento en la concentración de petróleo, con diferencias estadísticamente significativas en todos los tratamientos con

respecto del grupo control. Este comportamiento fue similar al reportado por Arias et al. (2017) para *Phaseolus vulgaris*, donde la biomasa total presentó una disminución del 36 y 69% en las concentraciones más bajas de petróleo con respecto del tratamiento testigo; mientras que la longitud del tallo lo hizo en 26%. De la misma manera, al aumentar la concentración de petróleo, la biomasa total continuó disminuyendo.

El análisis cuantitativo del vigor de las plantas también permitió observar la relación entre el porcentaje de germinación, y la longitud del tallo y de la raíz. El comportamiento general mostró que el proceso de germinación no resultó afectado de manera significativa en concentraciones menores a 32000 ppm, lo que sugiere que los efectos fitotóxicos no alcanzaron el umbral para afectar la actividad enzimática y las señalizaciones químicas necesarias para desencadenar el proceso de germinación, y que este umbral se alcanzó hasta las 64000 ppm, donde la germinación disminuyó considerablemente. Sin embargo, al evaluar los efectos del petróleo en el crecimiento de las plantas, la tolerancia a altas concentraciones de petróleo no siguió este patrón ya que la producción de biomasa aérea disminuyó gradualmente al aumentar las concentraciones de petróleo, mientras que la producción de biomasa subterránea fue estimulada en la concentración de 8000 ppm y disminuyó al aumentar las concentraciones de petróleo.

El análisis de la apariencia física de las plantas de acuerdo con los criterios de vigor establecidos en la tabla 2 apoya la idea de que el petróleo tiene efectos negativos en el desarrollo de las plantas. Los resultados cualitativos mostraron el deterioro de las plantas en la coloración, altura, tamaño de hojas, y apariencia general en los diferentes tratamientos. Aunque en la concentración más baja de petróleo (8000 ppm), las plantas presentaron una talla y desarrollo foliar aceptable, la proporción de plantas con vigor alto fue de 33%, lo cual sugiere que la planta está respondiendo de manera diferencial entre la parte aérea y subterránea a esta concentración en particular. En esta concentración la longitud radical aumentó significativamente con respecto del resto de tratamientos, al mismo tiempo que la longitud aérea disminuyó significativamente con respecto al grupo control. A partir de la concentración de 16000 ppm, la apariencia de la

planta en cuanto a la talla y la biomasa foliar se deterioró de manera considerable, e incluso los signos de clorosis fueron más evidentes conforme aumentaba la concentración de petróleo. Las fracciones volátiles de los hidrocarburos pueden generar clorosis en las plantas por la interferencia en el proceso fotosintético (Hernández et al., 2022). Esto fue consistente con el comportamiento de las variables cuantitativas discutidas anteriormente.

### **Efectos en la biomasa subterránea de *M. sativa*.**

Aunque en este trabajo no se cuantificó el número de hojas o su biomasa específica, si se consideró en la evaluación cualitativa del vigor de la planta. Las observaciones indican un deterioro en el desarrollo foliar favoreciendo el desarrollo de las raíces. Este compartimiento sugiere que las plantas incrementaron su biomasa subterránea para aprovechar la mayor cantidad de recursos (incluso provenientes del propio petróleo) y asimilarlos como nutrimentos con el fin de consolidar su sistema de raíces (Pérez-Armendáriz et al., 2011; Arias-Trinidad et al., 2017). Resultados similares fueron reportados por Hernández et al., (2019 y 2022), donde el sistema radical fue estimulado por la presencia de hidrocarburo en dosis de 10000 HTP mg/kg (10000 ppm) en plantas de *Zea mays* y conforme la concentración se incrementaba, la longitud radical disminuía.

Los lixiviados de los hidrocarburos del petróleo pueden reducir el metabolismo de las plantas al inhibir la madurez fisiológica de las raíces, propiciando una reducción en la biomasa foliar (Arias-Trinidad et al., 2017). La fitotoxicidad del petróleo en las plantas se presenta como necrosis en el follaje y la raíz, ocasionando la disminución en la actividad fotosintética, y en la biomasa aérea y en casos extremos, la muerte de la planta (Morales-Guzmán et al., 2020). Adicionalmente, los hidrocarburos pueden cubrir las raíces y afectar la absorción de agua y nutrientes (Hernández et al., 2022). En este trabajo, al realizar la exploración de las raíces en la búsqueda de nódulos y para hacer la medición de su longitud, se observó que su aspecto general era de coloración blanca a transparente en el tratamiento libre de contaminante, mientras que, en los tratamientos con petróleo, las raíces presentaron una coloración café que

aumentó de intensidad conforme aumentó la concentración de petróleo. Las ramificaciones de la raíz principal disminuyeron al aumentar la concentración de petróleo, pero al mismo tiempo, incrementaron su grosor y disminuyeron la longitud.

En términos generales, el comportamiento del vigor de la planta y de las otras variables analizadas permite sugerir que *M. sativa* tiene alta capacidad de germinación hasta 32000 ppm; sin embargo, el establecimiento y la fase de crecimiento es afectado por acción del petróleo. Las respuestas fisiológicas comienzan a deteriorarse a partir de 8000 ppm, y el establecimiento efectivo de la interacción con rizobios también se da en este límite. Debe considerarse que la cepa de rizobios que fue usada en este trabajo fue aislada directamente de nódulos crecidos en plantas trampa de *M. sativa* usando suelo agrícola que nunca había sido contaminado con petróleo, por lo que los resultados obtenidos también describen la capacidad de adecuación de cepas nativas de rizobios sin previa exposición al petróleo ante las perturbaciones ambientales producidas por este contaminante.

## CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo muestran que el petróleo tiene un efecto fitotóxico sobre *M. sativa* que provoca la reducción de su desarrollo fisiológico y de la producción de biomasa. El petróleo generó efectos diferenciales sobre las plantas en la etapa de germinación y crecimiento. El proceso de germinación no resultó afectado de manera significativa por concentraciones de petróleo menores a 32000 ppm. Sin embargo, el desarrollo y producción de biomasa aérea disminuyó significativamente conforme aumentó la concentración de petróleo. Al mismo tiempo, se registró un incremento de la biomasa subterránea en la concentración de 8000 ppm, aunque en la concentración de 16000 ppm la producción del sistema radicular es similar al desarrollo en suelo libre del contaminante.

Por otro lado, el establecimiento de la relación rizobio- *M. sativa* fue promovido por concentraciones bajas de hidrocarburo debido al efecto de subsidio que el

aporte extra de C generó en las bacterias, sin embargo, no se observó de manera clara la coloración típica de los nódulos activos (rojiza). Concentraciones por encima de 32000 ppm fueron tóxicas por lo que inhibieron el proceso de nodulación y el correcto establecimiento de la asociación rizobio - *M. sativa*.

## ***BIBLIOGRAFÍA***

- Alrumman, S. A., Standing, D. B., & Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University - Science*, 27(1), 31-41. doi: 10.1016/j.jksus.2014.10.001
- Arias-Trinidad, A., Del, M., Rivera-Cruz, C., & Narcía, A. T. (2017). FITOTOXICIDAD DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO FRESCO SOBRE *Phaseolus vulgaris* L. (LEGUMINOSAE). *Rev. Int. Contam. Ambie*, 33(3), 411-419. doi: 10.20937/RICA.2017.33.03.05
- Benavides, L. de M. J., Quintero, G., Guevara, V. A. L., Jaimes, C. D. C., Gutiérrez, R. S. M., & Miranda, G. J. (2006). Bioremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. *NOVA*, 4, 82-90.
- Bianco, L. (2020). Principales aspectos de la nodulación y fijación biológica de nitrógeno en Fabáceas. *Idesia (Arica)*, 38(2), 21-29. doi: 10.4067/S0718-34292020000200021
- Botello, A. V. (2005). Características, Composición y Propiedades Físicoquímicas del Petróleo. En R. O. J. . G.-B. G. & A.-H. C. Botello A. V. (Ed.), *Golfo de México: contaminación e impacto ambiental : diagnóstico y tendencias* (2da edición, pp. 261-268). Campeche, México.
- Chan-Quijano, J. G., Jarquín-Sanches, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L. N., & Lázaro-Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, 17,

123-144. Recuperado a partir de  
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=456144902006>

- Chávez Álvarez, K., Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., & Espinoza Molar, E. (2019). Aislamiento y adaptación de *Azospirillum* spp y *Rhizobium* spp asociados con la leguminosa *Mimosa pigra* L. expuesta a petróleo crudo ligero. En *Investigaciones Científicas y Agrotecnológicas para la Seguridad Agroalimentaria*. (pp. 383-388.). México.
- Delgadillo-Martínez, J., Aguirre-Zamora, M., & Ferrera-Cerrato, R. (2020). Técnicas de estudio de fijadores de nitrógeno atmosférico. En M. J. Delgadillo, C. R. Ferrera, L. J. Alvarado, A. Alarcón, M. J. Pérez, & S. J. J. Almaraz (Eds.), *Microbiología aplicada a la agricultura y agroecosistemas Principios y técnicas para su investigación*. (Primera ed, pp. 67-89). Texcoco, México.
- Esquivel-Cote, R., Ferrera-Cerrato, R., & Alarcón, A. (2018). El papel de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal en la fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos. En L. Brutti, M. Beltrán, & D. S. I. García (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1a. edición, pp. 200-231). Buenos Aires, Argentina.
- Figuroa, J. M. de L., Martínez, M. M. R., Ortiz, S. C. A., & Fernández, R. D. (2018). Influencia de los factores formadores en las propiedades de los suelos en la Mixteca, Oaxaca, México. *Terra Latinoamericana*, 36(3), 287-299. doi: 10.28940/TERRA.V36I3.259
- Frioni, L. (1999). *Procesos microbianos*. Argentina.
- Gob.mx. (2021). *Tipos de petróleo crudo en México*. Gobierno de México. Recuperado a partir de <https://www.puertodosbocas.com.mx/ultimas-noticias/288-tipos-de-petroleo-crudo-en-mexico-2019#:~:text=El petróleo crudo se clasifica,son Olmeca%2C Istmo y Maya>.
- Grageda-Cabrera, O. A., Vera-Núñez, J. A., Castellanos, J. Z., & Peña-Cabriales, J. J. (2003). Comparación de métodos para estimar la fijación de N<sub>2</sub> en frijol en condiciones de campo. *Terra Latinoamericana*, 21(1), 65-71. Recuperado

a partir de <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57321108>

Guzmán, D. D., & Montero, T. J. (2021). Interacción de bacterias y plantas en la fijación del nitrógeno. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales*, 8(2), 87-101. doi: 10.53287/UYXF4027GF99E

Hernández-Valencia, I., Manuel Lárez, L., & García, J. V. (2017). EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DE UN SUELO CONTAMINADO CON DIFERENTES TIPOS DE CRUDOS SOBRE LA GERMINACIÓN DE DOS PASTOS TROPICALES. *Bioagro*, 29, 73-82.

Hernández, Rodríguez Consuelo, Ojeda, Q. L. J., Arteaga, R. O., & Cordero, L. S. (2019). Emergencia y desarrollo del maíz (*Zea mays* L.) en un suelo contaminado con Hidrocarburos Totales del Petróleo en fase inicial y a 340 días de biorremediación en biopilas. En *Revista Científica Agroecosistemas* (Vol. 7, Número 2, pp. 94-102). Recuperado a partir de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/297>

Hernández, Rodríguez Consuelo, Ojeda, Q. L. J., & Bernal, C. Y. (2022). Comportamiento del Maíz (*Zea mays* L.) en un suelo contaminado con dosis crecientes de Hidrocarburos totales de petróleo (htp) resultante de un proceso de Biorremediación en Biopilas con una combinación de Texturizantes. *Revista Científica Agroecosistemas*, 10, 24-34. Recuperado a partir de <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/536/509>

Hernández Valencia, I., Navas, G., & Infante, C. (2017). FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO EXTRA PESADO CON *Megathyrus maximus*. *Rev. Int. Contam. Ambie*, 33(3), 495-503. doi: 10.20937/RICA.2017.33.03.12

Hidalgo, K. J., Sierra-Garcia, I. N., Dellagnezze, B. M., & De Oliveira, V. M. (2020). Metagenomic Insights Into the Mechanisms for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Oil Supply Chain. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2250. doi: 10.3389/FMICB.2020.561506/BIBTEX

Ibañez, C. N., Palomeque, S. D., & Fontúrbel, F. N. (2004). Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del

- suelo. En C. & A. G. Fontúrbel, F.; Ibáñez (Ed.), *El Recurso Suelo: Bases Edafológicas, Problemática, Administración Y Contaminación*. (1a ed., p. 450). La Paz, Bolivia.
- Jaramillo, J. D. F. (2002). *Introducción a la ciencia del suelo*. Medellín, Colombia.
- Li, X., Feng, Y., & Sawatsky, N. (1997). Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils: plant growth. *Plant Soil*, 219-226.
- Ling, H., Hou, J., Du, M., Zhang, Y., Liu, W., Christie, P., & Luo, Y. (2023). Surfactant-enhanced bioremediation of petroleum-contaminated soil and microbial community response: A field study. *Chemosphere*, 322. doi: 10.1016/J.CHEMOSPHERE.2023.138225
- López-Ortiz, C., Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Almaraz, J. J., Martínez-Romero, E., & Mendoza-López, M. R. (2012). ESTABLECIMIENTO Y RESPUESTAS FISIOLÓGICAS DE LA SIMBIOSIS *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* EN PRESENCIA DE FENANTRENO Y NAFTALENO. *Rev. Int. Contam. Ambie.*, 28, 333-342.
- Maceo, M. Y., Torres, R. E., Alarcón, Z. A., & Salgado, C. Y. (2017). Germination of *Paspalum densum* (cortadera) on soil contaminated with oil. *Revista Química Viva*, 16, 25-31.
- Maldonado-Chávez, E., Rivera-Cruz, M., Izquierdo-Reyes, F., & Palma-López, D. (2010). EFECTOS DE RIZOSFERA, MICROORGANISMOS Y FERTILIZACIÓN EN LA BIORREMEDIACIÓN Y FITORREMEDIACIÓN DE SUELOS CON PETRÓLEOS CRUDO NUEVO E INTEMPERIZADO Effects of rizosphere, microorganisms and fertilization on bioremediation and phytoremediation of soils with. *Universidad y Ciencia*, 26, 121-136. Recuperado a partir de [www.ujat.mx/publicaciones/uciencia](http://www.ujat.mx/publicaciones/uciencia)
- Mendoza, R. (2018). Biorremediación de suelos contaminados con petróleo. En L. Brutti, M. Beltrán, & D. S. I. García (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1a. edición, pp. 171-199). Buenos Aires, Argentina.
- Morales-Guzmán, G., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Rivera-Cruz, M.-C., Torres-

- Bustillos, L.-G., Mendoza-López, M.-R., Morales-Guzmán, G., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Rivera-Cruz, M.-C., Torres-Bustillos, L.-G., & Mendoza-López, M.-R. (2020). Efecto de bacterias emulsificantes en la atenuación de la fitotoxicidad de suelos contaminados con petróleo intemperizado. *Revista de Biología Tropical*, 68(2), 692–703. doi: 10.15517/RBT.V68I2.39327
- Nápoles, J., Marañón, A., Cumba, F., Anllo, Y., & Abalos, A. (2005). TRATABILIDAD DE SUELOS CONTAMINADOS CON PETRÓLEO APLICANDO MICROCOSMOS. *Revista Cubana de Química*, 17, 179–188.
- Ñústez, C. D. C., Paredes, C. D., & Cubillos, V. J. (2014). Bioremediation for degradation of total hydrocarbons present in the sediments of a fuel service station. *Rev. Téc. Ing. Univ. Zulia*, 37(1), 20–28.
- Peña-Castro, J. M., Barrera-Figueroa, B. E., Ruiz-Medrano, R., & Xoconostle-Cázares, B. (2006). BASES MOLECULARES DE LA FITORREMEDIACIÓN DE HIDROCARBUROS TOTALES DEL PETRÓLEO. *Terra Latinoamericana*, 24, 529–539.
- Pérez-Armendáriz, B., Castañeda-Antonio, D., Castellanos, G., Jiménez-Salgado, T., Tapia-Hernández, A., & Martínez-Carrera, D. (2011). Efecto del antraceno en la estimulación del crecimiento en maíz y frijol. *Terra Latinoamericana*, 29, 95–102. Recuperado a partir de [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0187-57792011000100095](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-57792011000100095)
- Perez-Vargas, J., Vigueras-Carmona, S. E., Gómez-Guzmán, O., & Calva-Calva, G. (2015). Degradación microbiana con BFNA de hidrocarburos aromáticos por bioaumentación en Biopilas. *Revista CENIC. Ciencias Biológicas*, 46, 416–423.
- Pérez López, J. P., & Boronat Gil, R. (2016). Aspectos básicos de la fijación de nitrógeno atmosférico por parte de bacterias. Estudio en el laboratorio de educación secundaria. *Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias*, 13(1), 203–209. Recuperado a partir de <https://revistas.uca.es/index.php/eureka/article/view/2962>
- Postgate, J. (1998). *Nitrogen Fixation* (3ra. edici). Australia.

- Pozzo, A. M. G. (2018). La biorremediación aplicada a la rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. En L. Brutti, M. Beltrán, & I. García de Salamone (Eds.), *Biorremediación de los recursos naturales* (1a. Edición, pp. 137-170). Instituto de Suelos, Centro de Investigación de Recursos Naturales Hurlingham Buenos Aires.
- Ramírez-Puebla, S. T., Ormeño-Orrillo, E., Rogel, M. A., López-Guerrero, M. G., López-López, A., Martínez-Romero, J., Negrete-Yankelevich, S., & Martínez-Romero, E. (2019). La diversidad de los rizobios nativos de México a la luz de la genómica. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 90. doi: 10.22201/ib.20078706e.2019.90.2681
- Ramirez, M. A. G. (2012). *ESTADOS FENOLÓGICOS TEMPRANOS DE FRIJOL [Vigna unguiculata (L.) Walp], BACTERIAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: INDICADORES DE TOXICIDAD DEL PETRÓLEO INTEMPERIZADO*. Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco.
- Ravi, A., Ravuri, M., Krishnan, R., Narenkumar, J., Anu, K., Alsalhi, M. S., Devanesan, S., Kamala-Kannan, S., & Rajasekar, A. (2022). Characterization of petroleum degrading bacteria and its optimization conditions on effective utilization of petroleum hydrocarbons. *Microbiological Research*, 265, 127184. doi: 10.1016/J.MICRES.2022.127184
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárata-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar biorremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208. doi: 10.15359/RCA.56/1.9
- Sánchez, G., & Hernández, E. (2018). *Environmental biotechnology and cleaner bioprocesses*. Taylor And Francis.
- Saval, S. (1999). “Éxitos y fracasos de la remediación de suelos en sitios contaminados con hidrocarburos”. En *Conservación y restauración de suelos* (pp. 511-526). México.
- Seethepalli, A., Guo, H., Liu, X., Griffiths, M., Almtarfi, H., Li, Z., Liu, S., Zare, A., Fritschi, F. B., Blancaflor, E. B., Ma, X. F., & York, L. M. (2020). Rhizovision

- crown: An integrated hardware and software platform for root crown phenotyping. *Plant Phenomics*, 1-15. doi: 10.34133/2020/3074916
- Torres-Guerrero, C. A., Etchevers, B. J. D., Fuentes-Ponce, M. H., Govaerts, B., De León-González, F., & Herrera, J. M. (2013). INFLUENCIA DE LAS RAÍCES SOBRE LA AGREGACIÓN DEL SUELO Influence of the Roots on Soil Aggregation. *Terra Latinoamericana*, 31, 71-84.
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D., & Herrera-Tenorio, M. F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 511-523. Recuperado a partir de <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93920942029>
- Velasco-Jiménez, A., Castellanos-Hernández, O., Acevedo-Hernández, G., Clarenc Aarland, R., & Rodríguez-Sahagún, A. (2019). Bacterias rizosféricas con beneficios potenciales en la agricultura. *Terra Latinoamericana*, 38, 333-345. doi: 10.28940/terra.v38i2.470
- Velasco, J. A., & Volke Sepúlveda, T. L. (2003). El composteo: una alternativa tecnológica para la biorremediación de suelos en México. *Gaceta ecológica*, 66, 41-53.
- Volke, S. T., & Velasco, T. J. A. (2002). *Tecnologías de remediación para suelos contaminados* (INE-SEMARNAT (ed.)). México.
- Voroney, R. P., & Heck, R. J. (2015). The Soil Habitat. En *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry* (Fourth edi, pp. 15-39).
- Wong-Villarreal, A., Santiago-Mendez, E., Hernández Núñez, E., Yáñez-Ocampo, G., Giácoman Vallejos, G., González Sánchez, A., Ramírez González, S. I., Espinosa-Zaragoza, S., & López-Báez, O. (2017). Degradación de Fenantreno por bacterias del género Burkholderia y Rhizobium aisladas de nódulos de mimosas. *Nova scientia*, 9(19), 291-305. doi: 10.21640/NS.V9I19.995
- Xie, W., Li, R., Li, X., Liu, P., Yang, H., Wu, T., & Zhang, Y. (2018). Different responses to soil petroleum contamination in monocultured and mixed plant systems. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 161, 763-768. doi:

10.1016/J.ECOENV.2018.06.053

Zamudio Chimal, B. F., & Rosas Castro, J. A. (2018). *IMPACTO ECONÓMICO, SOCIAL Y AMBIENTAL GENERADO POR EL CAMPO PETROLERO PUERTO CEIBA EN PARAÍSO, TABASCO, MÉXICO*. Universidad Nacional Autónoma de México y Asociación Mexicana de Ciencias para el Desarrollo Regional A.C, Coeditores. Recuperado a partir de <http://ru.iiec.unam.mx/id/eprint/3784>

Zúñiga, D. D. E. (2012). *Manual de Microbiología agrícola. Rhizobium, PGPRS, Indicadores de fertilidad e inocuidad*.