



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ATENUACIÓN NATURAL Y FITORREMEDIACIÓN DEL PETRÓLEO
FRESCO CON *Leersia hexandra* EN SUELO INUNDADO**

NADIA STEPHANY CALAO LEON

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2021



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe **Nadia Stephany Calao Leon**, alumna de esta institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección de la Profesora **Dra. María del Carmen Rivera Cruz**, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis **Atenuación natural y fitorremediación del petróleo fresco con *Leersia hexandra* en suelo inundado**, y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la institución, la Consejera de Tesis y el que suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta institución.

H. Cárdenas, Tabasco, 25 de febrero de 2021.

Nadia Stephany Calao Leon

Firma

Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Firma

La presente tesis, titulada: “**ATENUACIÓN NATURAL Y FITORREMEDIACIÓN DEL PETRÓLEO FRESCO CON *Leersia hexandra* EN SUELO INUNDADO**”, realizada por la alumna: **NADIA STEPHANY CALAO LEON**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA:

DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

ASESOR:

DR. JULIÁN DELGADILLO MARTÍNEZ

ASESOR:

DR. ROBERTO DE LA ROSA SANTAMARÍA

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO, 25 DE FEBRERO DE 2021.

ATENUACIÓN NATURAL Y FITORREMEDIACIÓN DEL PETRÓLEO FRESCO CON *Leersia hexandra* EN SUELO INUNDADO

Nadia Stephany Calao Leon, MC

Colegio de Postgraduados, 2021

RESUMEN

Los humedales tropicales de México y el mundo en zonas petroleras han estado expuestos a derrames accidentales de hidrocarburos que se acumulan en el medio inundado, por lo que existe la necesidad de generar tecnologías biológicas nativas, amigables y sustentables para el ambiente que descontaminen estos suelos en tiempos cortos. Este estudio se realizó durante 180 días en microtúnel con el objetivo de seleccionar una tecnología natural para Gleysoles inundados y contaminados con petróleo fresco del sureste de México. La tecnología basada en degradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), estimulación de la microflora nativa, carbono orgánico (COS), N total (Nt), crecimiento y producción de *Leersia hexandra*. Se estableció un experimento en condiciones de humedal artificial completamente al azar con arreglo de factores (4x2) en Gleysol. Cuatro concentraciones de petróleo (0, 30, 60 y 90 g/kg base seca), dos tecnologías [atenuación natural (AN) y fitorremediación (FR) con pasto *L. hexandra*]. Las variables evaluadas fueron: longitud de estolones (LE), tasa de crecimiento relativo (TCR), número de plantas en macollo (PM), número de raíces primarias (NRP), raíces secundarias en ápice (NRSA), materia seca aérea (MSA), materia seca raíz (MSR), población de bacterias heterótrofas (BH), hidrocarbonoclasticas (BHC), desnitrificadoras (BDES), hongos heterótrofos (HH) y microalgas (MAL), COS, Nt y degradación de HTP (DEG). Al día 180 de exposición a petróleo la LE y MSA fue mayor en suelo testigo, similar a PM, NRP, NRSA y MSR en suelo con 52 y 76 g/kg, lo que muestra adaptación de *L. hexandra* al petróleo. La mayor población de BH (38×10^5 UFC g⁻¹ r.s) y BHC (36×10^4 UFC g⁻¹) fue en rizosfera sin petróleo, mientras BDES (22×10^3) en rizosfera con 76 g/kg de petróleo. La AN favoreció la población de HH (120×10^2 UFC g⁻¹ s.s) y MAL (88×10^4 cel/mL) en 76 g de petróleo, indujo mayor DEG de HTP (86%), y derivó una relación positiva significativa con HH y MAL, sin embargo, la FR con 31 % de degradación se relaciona significativa y positivamente con BH, BHC, BDES, MSA y MSR. Se recomienda aplicar AN en Gleysoles de humedales con petróleo, y usar FR con *L. hexandra* en caso de priorizar la producción de forraje y descontaminar en tiempos mayores a 180 días.

Palabras claves: Bacterias hidrocarbonoclasticas, hongos heterótrofos, microalgas, *Leersia hexandra*.

NATURAL ATTENUATION AND PHYTOREMEDIATION OF FRESH OIL WITH *Leersia hexandra* IN FLOODED SOIL

Nadia Stephany Calao Leon, MC

Colegio de Postgraduados, 2020

ABSTRACT

The tropical wetlands of Mexico and the world in oil areas have been exposed to accidental spills of hydrocarbons that accumulate in the flooded environment; there is a need to generate native, friendly, and sustainable biological technologies for the environment that decontaminate these soils in relative times. This study was carried out during 180 days in a microtunnel with the objective of selecting a natural technology for Gleysols flooded and contaminated with fresh oil from the southern of Mexico. The technology based on the degradation of total petroleum hydrocarbons (HTP), stimulation of native microflora, organic carbon (COS), total N (Nt), growth and production of *Leersia hexandra*. An experiment was set up under completely randomized man-made wetland conditions according to factors (4x2) in Gleysol. Four concentrations of oil (0, 30, 60 and 90 g / kg dry basis), two technologies [natural attenuation (AN) and phytoremediation (FR), with *L. hexandra* grass]. The variables evaluated were: stolon length (LE), relative growth rate (TCR), number of plants in tiller (PM), number of primary roots (NRP), secondary roots at apex (NRSA), aerial dry matter (MSA), root dry matter (MSR), population of heterotrophic bacteria (BH), hydrocarbonoclastic (BHC), denitrifying (BDES), heterotrophic fungi (HH) and microalgae (MAL), COS, Nt and degradation of HTP (DEG). At day 180 of exposure to oil, LE and MSA were higher in control soil, similar to PM, NRP, NRSA and MSR but in soil with 52 and 76 g / kg, which shows adaptation of *L. hexandra* to oil. The largest population of BH (38×10^5 CFU g⁻¹ r.s) and BHC (36×10^4 CFU g⁻¹) was in the rhizosphere without oil, but the BDES (22×10^3) in the rhizosphere with 76 g / kg of oil. AN favored the population of HH (120×10^2 CFU g⁻¹ ss) and MAL (88×10^4 cells / mL) in 76 g of oil, and induced a higher SDR of HTP (86%), and a significant positive relationship with HH and MAL, without However, the RF with 31% SDR, and a significant and positive relationship with BH, BHC, BDES, MSA and

MSR. It is recommended to apply AN in Gleysols of wetlands with oil, and to use FR with *L. hexandra* in case of prioritizing forage production and decontamination in periods of times greater than 180 days.

Keywords: Hydrocarbonoclastic bacteria, heterotrophic fungi, microalgae, *Leersia hexandra*.

DEDICATORIA

*Primero que nada quiero agradecer a Dios por prestarme la vida y salud aun en estos tiempos tan difíciles donde el mundo entero nos encontramos luchando contra una peligrosa enfermedad, y aun así pude concluir una meta más en mi vida y en mi formación académica
¡Gracias Dios por ser tan misericordioso!*

Dedico mi tesis de maestría en ciencias a mis padres que son el mayor ejemplo de que con esfuerzo y dedicación se cumplen sueños, agradezco a ellos que han estado conmigo apoyándome en cada una de las decisiones que tomo y este grado mas no fue la excepción, estuvieron incondicionalmente cada día de los dos años que duró la maestría aconsejándome, apoyándome y animándome para no rendirme.

En general dedico y agradezco a mi familia por todo el apoyo que siempre me han brindado y por qué en cada etapa de mi vida me brindan su ayuda incondicional ¡LOS AMO!

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico, lo cual forma parte de mi formación profesional, académica y sobre todo una meta más.

Al Colegio de Postgraduados en Campus Tabasco por la oportunidad de realizar mis estudios de Maestría en Ciencias y la accesibilidad para el uso de sus instalaciones para finalizar con éxito mi proyecto de investigación.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora, responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, quien dedicó todo su tiempo, conocimiento, apoyo y confianza hacia mí. ¡Gracias por sus consejos, recomendaciones e incluso llamados de atención los cuales me ayudaron a forjarme en mi formación profesional y personal!

Al Dr. Roberto de la Rosa Santamaría por sus consejos, aportaciones y sugerencias realizadas en el desarrollo de la investigación y documento de tesis.

Al Dr. Julián Delgadillo Martínez por su apoyo, disposición y consejos en el desarrollo de la investigación.

Al Dr. Alejandro Alarcón por sus valiosas recomendaciones y aportaciones en el documento de tesis.

A Estela y Alexander mis incondicionales, gracias por sus consejos, motivaciones y apoyo ya que cuando las cosas se ponían difíciles siempre estuvieron al pie del cañón y me ayudaron a sobrellevar y aligerar esta gran meta en mi vida.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. El petróleo y su composición	4
2.1.1. Hidrocarburos saturados	5
2.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos	7
2.1.3. Asfáltenos	8
2.1.4. Resinas	9
2.2. El suelo y sus características	10
2.2.1. Suelo del humedal	11
2.2.2. Importancia del carbono y nitrógeno en el suelo	12
2.2.2.1. Importancia del carbono en el suelo para plantas y microorganismos	12
2.2.3. Importancia del nitrógeno en el suelo para plantas y microorganismos	14
2.3. Importancia de las bacterias en suelo y rizosfera	15
2.3.1. Bacterias hidrocarbonoclasticas	17
2.3.2. Bacterias desnitrificantes	18
2.3.3. Bacterias y hongos heterótrofos	20
2.3.4. Microalgas en suelo inundado	20
2.4. Efecto de los hidrocarburos del petróleo en plantas y microorganismos	21
2.4.1. Efecto en planta	21
2.4.1.1. Efecto de los hidrocarburos del petróleo en pastos	22
2.4.2. Efecto en microorganismos	23
2.4.2.1. Efecto del petróleo en microorganismos	23
2.5. Tecnologías biológicas de recuperación de suelos	24
2.5.1. Atenuación natural de los hidrocarburos	25
2.5.1.1. Atenuación natural como tecnología biológica de recuperación de suelos	26
2.6. Bioquímica de la degradación de hidrocarburos de petróleo	28
2.6.1. Degradación aerobica	28
OBJETIVOS	33
3.1. Objetivo general	33
3.2. Objetivos específicos	33
HIPÓTESIS	34

4.1. Hipótesis general	34
4.2. Hipótesis específicas	34
MATERIALES Y MÉTODOS	35
5.1. Etapa I. Trabajo de campo y producción de plántulas	36
5.1.1. Colecta y procesamiento de suelo	36
5.1.2. Colecta y producción de plántula	36
5.2. Etapa II. Experimento y seguimiento de crecimiento en <i>L. hexandra</i>	37
5.2.1. Contaminación del suelo y diseño experimental	37
5.2.2. Análisis de crecimiento	38
5.3. Etapa IV. Laboratorio	39
5.3.2. Levantamiento del bioensayo experimental	39
5.4. Etapa IV. Trabajo de Laboratorio	40
5.4.1. Variables en raíz	40
5.4.2. Materia seca aérea y raíz	41
5.4.3. Población de bacterias, hongos y microalgas	41
5.4.3.3. Microalgas en agua	45
5.4.3.3.1. Diversidad de bacterias y hongos heterótrofos y bacterias hidrocarbonoclastas	47
5.4.4. Análisis químicos del suelo y rizosfera	47
5.5. Etapa V. Procesamiento de datos	48
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	50
6.1. Crecimiento y producción de <i>Leersia hexandra</i>	50
6.1.2. Efecto de los factores concentración de petróleo y tiempo de exposición	52
6.1.3. Efecto del petróleo en raíces	53
6.1.4. Volumen radical según petróleo	55
6.2. Producción de <i>Leersia hexandra</i>	55
6.2.1. Materia seca aérea, radical y total según concentración de petróleo	55
6.3. Efecto del petróleo en bacterias, hongos y microalgas asociados a la atenuación natural y fitorremediación	57
6.3.1. Población de bacterias en suelo con petróleo tratado con atenuación natural y fitorremediación	60
6.4. Carbono y nitrógeno según concentración de petróleo	61
6.5. Degradación de petróleo	63
6.5.1. Relación degradación y mineralización de nitrógeno	65

6.5.2. Degradación respecto a tecnología, propiedades químicas y actividad microbiana	66
CONCLUSIONES.....	68
7.1. Conclusión general.....	68
7.1.1. Conclusiones particulares.....	68
LITERATURA CITADA	69
APÉNDICES ESTADÍSTICOS	94
Apéndice A. Análisis de varianza de las respuestas fisiológicas de Leersia hexandra en diferentes tiempos y concentraciones de petróleo	94
Apéndice B. Análisis de varianza de las respuestas microbiológicas en fitorremediación usando Leersia hexandra y atenuación natural contaminadas con petróleo	100
Apéndice C. Análisis de varianza de las respuestas químicas usando dos tecnologías biológicas para la recuperación de suelos contaminados con petróleo.	102

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Listado de fórmulas y estado físico de los hidrocarburos saturados.....	6
Cuadro 2. Listado, estado físico y estructura química de hidrocarburos policíclicos	7
Cuadro 3. Ejemplo de microorganismos importantes en suelo y rizosfera	17
Cuadro 4. Efecto del petróleo y tiempo de exposición en crecimiento de <i>Leersia hexandra</i> ...	53
Cuadro 5. Efecto de la concentración de petróleo en suelo sobre longitud y número de raíz primaria, número de raíz secundaria en tramo basal, medio y ápice después de 180 días de exposición.....	54
Cuadro 6. Microorganismos en suelo inundado con petróleo tratado con atenuación natural y fitorremediación con <i>Leersia hexandra</i>	59
Cuadro 7. Características fenotípicas de los aislados de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas a partir del suelo con atenuación natural y fitorremediación.....	61
Cuadro 8. Estimulación de la tecnología en el carbono orgánico y nitrógeno en suelo con petróleo fresco, al día 180.....	63
Cuadro 9. Correlación de variables	67

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco	5
Figura 2. Estructura química de asfálteno	8
Figura 3. Estructura molecular del asfálteno para el crudo Maya (México).	9
Figura 4. Modelo de estructura molecular promedio de (a) fracción de resina alquitrán - arena y; (b) fracción de resina de petróleo	10
Figura 5. Composición del suelo	11
Figura 6. Polímeros orgánicos comunes encontrados en el medio ambientes, A) La celulosa. B) La hemicelulos. C) El almidón. D) La quitina. E) Las paredes celulares bacteriana.	13
Figura 7. Composición de la rizosfera	16
Figura 8. Etapas de la reducción desasimiladora del nitrato.	19
Figura 9. Clasificación de tecnologías de remediación biológicas.	25
Figura 10. Pasos en la degradación aeróbica de un hidrocarburo alifático, el primero de los cuales está catalizado por una monooxigenasa	29
Figura 11. Paso en la degradación aeróbica de la hidroxilación del benceno a catecol por una monooxigenasa, donde el NADH es el donador de electrones	30
Figura 12. Degradación anóxica del benzoato por vía del benzoil-CoA.	31
Figura 13. Catabolismo anóxico del hidrocarburo alifático hexano.	32
Figura 14. Flujograma del proceso de investigación	35
Figura 15. Procesamiento de suelos. a) colecta, b) secado y c) tamizado.	36
Figura 16. a) Rizomas sembrados en almácigos, b) Riego diario con abundante agua y c) rizomas de pastos a los 25 días después de la siembra.	37
Figura 17. a) Peso de suelo Gleysol (2 kg), b) mezcla de suelo y petróleo para cada unidad experimental, c) lámina de agua en atenuación natural y fitorremediación.	38
Figura 18. a) Medición de longitud de estolones y b) conteo de plantas jóvenes al macollo. .	39
Figura 19. Cosecha de experimentos: a) separación de raíz y materia aérea de <i>L. hexandra</i> , b) homogenización del suelo sometido a la atenuación natural, c) colecta de muestra, d) lavado de raíz, e) secado de raíz bajo techo, y f) materia seca de raíz en bolsa de papel.	40

Figura 20. Variables en raíz: a) conteo de número de raíz primaria, b) longitud raíz primaria, c) tramo de 10 mm de raíz secundaria para conteo y d) volumen radical.	41
Figura 21. Peso de materia seca aérea y raíz.	41
Figura 22. Técnica de cuenta viable por dilución; a) peso de muestra, b) muestra en dilución inicial, c) homogenizar muestra, d) diluciones seriadas en tubos, e) mezcla de diluciones para alícuota, f) alícuota sobre medio de cultivo y g) distribución de alícuota.	43
Figura 23. Unidades formadoras de colonias en medios de cultivos: a) bacterias hidrocarbonoclastas medio mineral, b) bacterias heterótrofas en agar nutriente y c) hongos heterótrofos en papa dextrosa agar.	44
Figura 24. Técnica del número más probable para población de bacterias desnitrificantes: a) preparación de tubos Hungate, b) esterilización, c) mezcla muestra + agua estéril, d) dilución seriada, e) mezcla de diluciones, f) alícuota en medio de cultivo, g) incubación, h) cuenta (positivo y/o negativo observación burbuja de nitrógeno).	45
Figura 25. Toma de muestra para microalgas: a) Agua-microalga en UE para colecta de muestra, b) muestra representativa, c) microalgas en el campo de conteo en microscopio (objetivo 10x).	46
Figura 26. Cuadriculas marcadas con letra L, es donde debe hacerse el conteo de células en la cámara de Neubauer.	46
Figura 27. Extracción y cuantificación de HTP: a) Muestra de suelo 10 g en dedal, b) extracción de petróleo en Soxhlet y c) peso de petróleo.	48
Figura 28. Longitud de estolones (A), Tasa de crecimiento relativo (B) y plantas al macollo (C) de <i>Leersia hexandra</i> por efecto de dosis de petróleo en seis tiempos hasta el día 180 después del transplante.	52
Figura 29. Volumen radical de <i>Leersia hexandra</i> (A) según concentraciones de petróleo y (B) sin y con petróleo.	55
Figura 30. Materia seca de <i>L. hexandra</i> al día 180 de exposición a petróleo. (A) Materia seca aérea y raíz en suelo con diferentes concentraciones de petróleo. (B) materia seca total en suelo sin y con petróleo.	57
Figura 31. Microorganismos en suelo con petróleo tratados con atenuación natural y fitorremediación usando <i>Leersia hexandra</i> , al día 180.	60

Figura 32. Carbono orgánico, nitrógeno total y relación carbono nitrógeno en suelo asistido con tecnología de atenuación natural y fitorremediación con <i>L. hexandra</i> al día 180.	63
Figura 33. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en suelo con petróleo según tecnología biológica.....	65
Figura 34. Mineralización de N y degradación de petróleo.	66

INTRODUCCIÓN

La extracción de petróleo crudo, y su conducción a los centros de procesamiento industrial, conlleva a la posibilidad de su liberación accidental al medio ambiente (Lee *et al.*, 2016). En la región de las Cuencas del Sureste Mexicano, dentro de la zona cálido húmedo de México, se localiza el estado de Tabasco con una extensión de 681 248.40 ha de humedales continentales (Barba-Macías *et al.*, 2006; CNH, 2014). El anegamiento del humedal incrementa la probabilidad de daños a los ductos subterráneos, y mayor riesgo de contaminación por la liberación de petróleo hacia el medio inundado (Rivera-Cruz *et al.*, 2016), y su acumulación en el suelo (Beyer *et al.*, 2016; Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016).

En los humedales contaminados con hidrocarburos del petróleo se han implementado métodos para removerlos, entre estos: (1) atenuación natural (AN), (2) contención física, y (3) biológicos y químicos. La AN y la fitorremediación (FT) con plantas autóctonas son tecnologías naturales para la recuperación de sedimentos, suelos y aguas afectados con hidrocarburos del petróleo; son métodos ecológicos amigables con el ambiente, ahorran energía y economía (Azubuiké *et al.*, 2016; Xu *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2016; Chiu *et al.*, 2017). La AN involucra varios mecanismos naturales *in situ* para dispersar y degradar al petróleo derramado, y se ha aplicado en lugares remotos o inaccesibles, cuando se espera que la tasa de remoción sea rápida, y que el sitio no se perturbe aún más al aplicar técnicas físicas y químicas (Khan *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2016). La FT es una técnica que bioestimula los mecanismos físicos, químicos y biológicos a través de la rizosfera de plantas que crecen en la presencia de niveles altos de contaminantes (Gerhardt *et al.*, 2009). La AN y FT son usadas para remediar y controlar la contaminación e incluyen: el uso de microorganismos nativos, volatilización, emulsión, advección, dispersión, dilución, difusión, sorción/desorción y reacciones químicas (intercambio iónico, complejación, transformación abiótica) (Lee *et al.*, 2003; Declercq *et al.*, 2012; Chiu *et al.*, 2013; Chiu, 2017).

Diversos investigadores informan que la eficiencia de la AN respecto a la bioestimulación y bioaumentación es igual para descontaminar suelos afectados por la presencia de hidrocarburos del petróleo, por lo que representa una estrategia prometedora para la

biorremediación en sitios con derrames de petróleo (Aleer *et al.*, 2011; Makadia *et al.*, 2011). González-Moscoso *et al.* (2019) compararon la AN con FT usando el pasto *Leersia hexandra* para descontaminar hidrocarburos totales del petróleo presentes en el suelo, y concluyó que la AN estimulada con humedad induce mayor degradación. Sin embargo, Merkl *et al.* (2005) y Maier *et al.* (2015) indican que el sistema rizosférico de pastos permite máxima eficiencia en la degradación del carbono biogénico y petróleo, a demás de que los exudados radicales orgánicos e inorgánicos de raíz permiten el establecimiento de mayor población de microorganismos respecto a suelo sometido a procesos de AN. Es la rizosfera un espacio que induce cometabolismo microbiano este oxida innecesariamente un segundo sustrato, pero es incapaz de usarlo como nutriente y como fuente de energía (Atlas y Bartha 2002).

La biodegradación de sustancias orgánicas a compuestos inorgánicos por AN y FT en el humedal con ambientes anaeróbicos y aeróbicos se relaciona con la concentración y disponibilidad de la molécula (Zheng *et al.*, 2016), con factores ambientales (oxígeno, carbono orgánico, nitrógeno, sulfatos, fosforo, hierro, salinidad y pH), y con la diversidad de microorganismos (Almeida *et al.*, 2012; Méndez *et al.*, 2011; Terry *et al.*, 2015). En ambientes anaeróbicos el catabolismo de los hidrocarburos degrada a CH₄, CO₂ y H₂O. En este proceso intervienen bacterias hidrocarbonoclasticas, bacterias desnitrificantes, reductoras de sulfatos y hierro que respiran de forma anaerobia, y disponen del suministro adecuado de electrones SO₄, NO₃ y Fe³ para la biodegradación bajo condiciones redox (Madigan *et al.*, 2015; Pepper *et al.*, 2015). Las microalgas son organismos que habitan el humedal, asimilando carbono orgánico influenciado por la luz, a través de la fotosíntesis, donde asimilan compuestos orgánicos a través de la respiración aeróbica, que depende de la disponibilidad de carbono orgánico (azúcares, alcoholes y ácidos orgánicos) (Chojnacka y Noworyta, 2003; Park *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012).

La AN con sistema rizosfericos de plantas acuáticas como: *Leersia hexandra*, *Cyperus articulatus*, y *Eliocharis palustris*, nativas del humedal, remueven hidrocarburos totales del petróleo en suelo contaminados entre 60916-1119373 mg/kg petróleo y bioestimulan la población de bacterias fijadoras de N en la rizosfera de *L. hexandra* (Rivera-Cruz *et al.*, 2016). Se ha documentado que la población de hongos heterótrofos e hidrocarbonoclasticos es mayor en suelo con petróleo sometido a la AN, pero la población de bacterias heterótrofas e

hidrocarbonoclasticas son mayor en FT usando *L. hexandra* (González-Moscoso *et al.*, 2019). Otra población importante en el humedal son las microalgas ellas; han mostrado aclimatización y adaptación genética al petróleo en ambientes marinos (Hook y Osborn 2012; Park *et al.*, 2012). No existe información de las bacterias desnitrificantes asociados al petróleo, pero ellas son importantes porque participan en el ciclo de N y carbono, elementos que se relacionan con la degradación de hidrocarburos en el humedal.

En este estudio se aplicó la AN y la FT usando al pasto *Leersia hexandra* a suelo inundado de humedal contaminado artificialmente con petróleo crudo. *Leersia hexandra* es un pasto que crece en humedales contaminados con hidrocarburos en el trópico húmedo, y con potencial para descontaminar suelos bajo condiciones aeróbicas. Comparar la respuesta de la AN y FT, así como las relaciones con factores químicos y microbiológicos con los que interactúan permitirá conocer la sustentabilidad de estas tecnologías.

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El petróleo y su composición

La palabra petróleo proviene de las palabras latinas *petra* (roca) y *óleum* (aceite) que significa roca oleosa o aceite de piedra (Garritz, 2001). El petróleo es un aceite que resulta de la degradación anaeróbica de materia orgánica, que permaneció almacenada durante largos periodos de tiempo bajo condiciones de alta temperatura y presión, que la convierten en gas natural, crudo y derivados del petróleo (Vargas *et al.*, 2004). El petróleo crudo es una mezcla compleja que se caracteriza por ser un líquido negro, viscoso y miles de compuestos químicos de la familia de los hidrocarburos, integrados por hidrógeno y carbono, además de heterocompuestos de nitrógeno, oxígeno, azufre y metales como el vanadio y níquel (Rosini, 1960; Kirk-Othmer, 2001; IMP, 2014).

Los crudos tienen características físicas y químicas muy variables de un campo de producción a otro e incluso dentro de un mismo yacimiento. La clasificación más burda, pero no menos importante, es la clasificación en crudos, pesados y ligeros al estar formado principalmente por moléculas hidrocarbonadas, la densidad de un crudo será tanto menor sea la relación atómica H/C. La densidad de los crudos puede oscilar entre 0,7 y 1, expresándose con mucha frecuencia en grados API (American Petroleum Institute) cuyo valor varía entre 70 y 5 ° API (Wauquier, 2004).

El petróleo fresco es aquel extraído recientemente del yacimiento subterráneo, contiene entre un 60 y 90% de los diferentes hidrocarburos (Morales, 2007), también lo componen compuestos minoritarios de N, O y S, así como pequeñas concentraciones de metales pesados como V, Ni, Pb y Fe (Kirk-Othmer, 2001).

La mayor cantidad de hidrocarburos son alcanos de cadena lineal (n-alcanos o n-parafinas), alcanos ramificados (en menor cantidad), cicloalcanos (o naftenos) y cantidades variables de hidrocarburos aromáticos. (Fernández *et al.*, 1992). Los principales componentes se subdividen y purifican en distintas fracciones: i) fracción saturada (n-alcanos, alcanos ramificados con cadenas alquílicas y las cicloparafinas), ii) fracción aromática (monoaromáticos, diaromáticos e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), iii) fracción de resinas y iv) fracción de asfaltenos (Speight, 1991) (Figura 1).

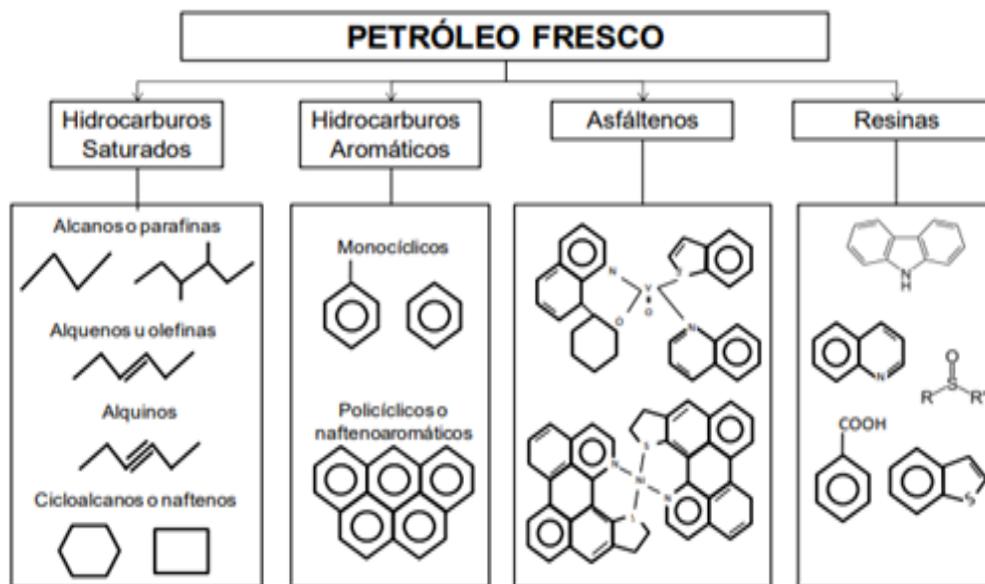


Figura 1. Clasificación de los componentes químicos del petróleo fresco (Castillo *et al.*, 2005).

2.1.1. Hidrocarburos saturados

Los hidrocarburos saturados están integrados por enlaces sencillos de carbono-carbono (Garritz, 2001). Los más ligeros (metano, etano, propano y butano) se encuentran en los gases naturales, los medios (pentano hasta hexano) en el petróleo y los más pesados en ceras minerales (Fraume, 2007).

Los hidrocarburos saturados están constituidos por una cadena de átomos de carbono enlazados cada uno de 0 a 3 átomos de hidrógeno, excepto en el más sencillo, el metano (CH_4). Cada carbono está ligado siempre a otros cuatro átomos (carbono o hidrógeno), su fórmula general es $\text{C}_n\text{H}_{2n+2}$. La estructura de cadena recta se llaman parafinas normales o n-alcanos y su fórmula desarrollada es: $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-\text{CH}_3$ (Waquier, 2004).

Los alcanos tienen baja reactividad, ya que para producir un cambio en su estructura se requieren temperaturas elevadas, que aumentan de acuerdo con el incremento de sus pesos moleculares (McCurry, 2008). Su punto de ebullición aumenta con el número de átomos de carbono. En las cadenas más cortas, la adición de un carbono aumenta el punto de ebullición unos 25°C y disminuye cuando esta aumenta (Waquier, 2004). Ejemplo de hidrocarburos saturados se observan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Listado de fórmulas y estado físico de los hidrocarburos saturados

<i>n</i> -alcanos	Fórmula	Estado físico
Metano	CH ₄	Gas
Etano	C ₂ H ₆	Gas
Propano	C ₃ H ₈	Gas
Butano	C ₄ H ₁₀	Gas
Pentano	C ₅ H ₁₂	Líquido
Hexano	C ₆ H ₁₄	Líquido
Heptano	C ₇ H ₁₆	Líquido
Octano	C ₈ H ₁₈	Líquido
Nonano	C ₉ H ₂₀	Líquido
Decano	C ₁₀ H ₂₂	Líquido
Undecano	C ₁₁ H ₂₄	Líquido
Dodecano	C ₁₂ H ₂₆	Líquido
Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	Líquido
Tetradecano	C ₁₄ H ₃₀	Líquido
Pentadecano	C ₁₅ H ₃₂	Líquido
Hexadecano	C ₁₆ H ₃₄	Líquido
Heptadecano	C ₁₇ H ₃₆	Líquido
Octadecano	C ₁₈ H ₃₈	Líquido
Nonadecano	C ₁₉ H ₄₀	Líquido
Eicosano	C ₂₀ H ₄₂	Líquido
Heneicosano	C ₂₁ H ₄₄	Líquido
Ducosano	C ₂₂ H ₄₆	Líquido
Tricosano	C ₂₃ H ₄₈	Líquido
Tetracosano	C ₂₄ H ₅₀	Líquido
Pentacosano	C ₂₅ H ₅₂	Líquido
Hexacosano	C ₂₆ H ₅₄	Líquido

Fuente: Atkins y Jones, 2006; Klage, 2006; PTR, 2007; Zumdahl y Decoste, 2012; UNAM, 2016.

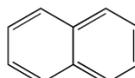
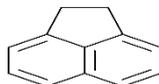
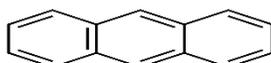
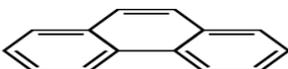
2.1.2. Hidrocarburos aromáticos policíclicos

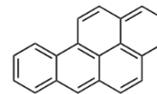
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) están integrados por dos o más anillos de benceno con anillos adyacentes que comparten dos átomos de carbono. Se encuentran con frecuencia en el medio ambiente y se ha detectado en el agua potable, estos son incoloros o blanquecinos (Jiménez- Cisneros, 2001).

Los HAP forman parte del petróleo crudo en concentraciones muy bajas (alrededor del 1%); sin embargo, la principal fuente es la combustión incompleta a altas temperaturas del petróleo, sus derivados (500-800°C) o de materia orgánica (100-300° C) (Haritash y Kaushik, 2009) y de los incendios de bosques o pastizales (Zambrano-Monrroy, 2011).

Existen dos clases de HAP; (1) bajo peso molecular que contienen de 2 a 3 anillos aromáticos (naftaleno, floureno, antraceno), y (2) alto peso molecular entre 4 a 7 anillos aromáticos (pireno, benzo (a) pireno y criseno). Las características físicas y químicas de estos hidrocarburos varían en su peso molecular, e influyen su persistencia en el ambiente y sus efectos en los sistemas biológicos, ya que se distinguen por tener una baja volatilidad y solubilidad (Zambrano-Monrroy, 2011). En el Cuadro 2, se observa la estructura química y estado físico de varios hidrocarburos policíclicos.

Cuadro 2. Listado, estado físico y estructura química de hidrocarburos policíclicos

Hidrocarburo	Estado físico	Fórmula	
		Molecular	Desarrollada
Benceno	Gas	C_6H_6	
Naphthalene	Sólido	$C_{10}H_8$	
Acenaphthene	Sólido	$C_{12}H_{10}$	
Anthracene	Sólido	$C_{14}H_{10}$	
Phenanthrene	Gas	$C_{14}H_{10}$	



Fuente: Chaudhry, 1994.

2.1.3. Asfáltenos

Los asfáltenos son moléculas formados por compuestos poliaromáticos de alto peso molecular que va desde 1000 hasta 20000 Daltons y punto de ebullición arriba de de 540°C (Sheu y Mullins, 1995; Centeno *et al.*, 2004; Marroquín, 2007). La estructura química y molecular se observa en la Figura 1. La composición química de los asfáltenos según Sheu y Storn (1995) es; 82.7, 8.4, 0.92, 7.72 %, 145 y 308 mg/kg C, H, N, S, Ni y V, respectivamente, estas transforman a los asfáltenos en fracciones de petróleo más polares y pesadas (Morisoon, 2009). Su estructura consiste en un núcleo aromático condensado que puede contener desde 4 hasta 20 anillos bencénicos, los cuales están ligados con cadenas alquílicas y cicloalcanos, además de compuestos heterocíclicos que poseen nitrógeno y oxígeno (Figura 2) (Speight, 1980; Groenzin y Mullins, 1999).

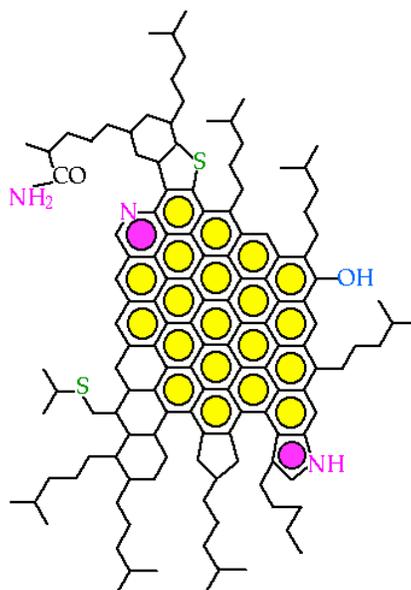


Figura 2. Estructura química de asfálteno (Carbognani, 1992)

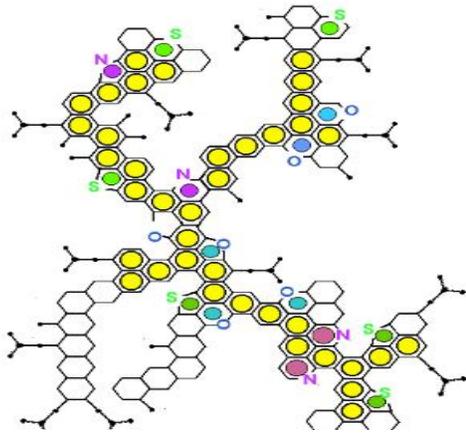


Figura 3. Estructura molecular del asfálteno para el crudo Maya (México) (Altamirano *et al.*, 1986).

2.1.4. Resinas

La resina es una sustancia orgánica sólida o de consistencia pastosa, de color café oscuro a negro, insoluble en el agua, no volátil, soluble en el alcohol y en los aceites esenciales, y capaz de arder en contacto con el aire, dependiendo de su naturaleza química (polaridad, aromaticidad etc.) (Ferrándiz-Gómez, 1995). La resina de petróleo es un término de uso común para resinas de hidrocarburos termoplásticos con una gravedad específica de 1.0 y bajo peso molecular, alrededor de 500 a 5000 kg/kgmol, derivadas de fracciones del petróleo (Sugihara, 2014). La fórmula general $C_mH_nNiO_jSk$ y estructura molecular convencional de la fracción resina alquitrán y petróleo se observan en la Figura 4 (Mansoori, 2009).

Las resinas de petróleo se clasifican en: alifáticas las cuales son polímeros de monómeros con cinco carbonos y aromáticas estas son polímeros de monómeros aromáticos de nueve carbonos (Mexpolímeros, 2020). La resina del petróleo tiene un efecto adherente y es adecuada para uso en pinturas y barnices, recubrimiento, tintas de impresión, tintas litográficas, papel, adhesivos, caucho, compuesto de curado de concreto en donde se requiere pegajosidad (Marroquin, 2007).

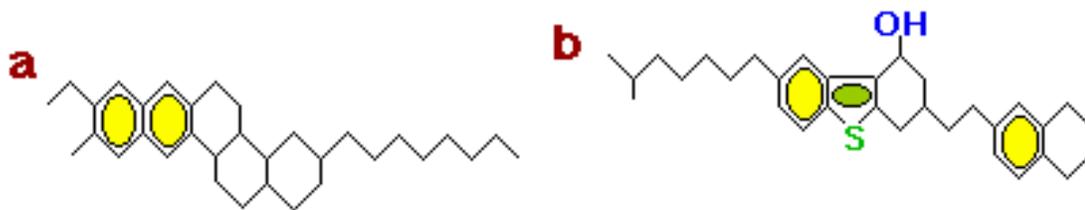


Figura 4. Modelo de estructura molecular promedio de (a) fracción de resina alquitrán - arena y; (b) fracción de resina de petróleo (Mansoori, 2009)

2.2. El suelo y sus características

El suelo es un cuerpo natural formado en la superficie terrestre para el crecimiento de las plantas tenga o no horizontes discernibles, de igual manera es cualquier material dentro de los 2 m de la superficie de la Tierra que esté en contacto con la atmósfera, con la exclusión de organismos vivos, áreas con hielo continuo que no estén cubiertas por otro material, y cuerpos de agua más profundos que 2 m² (FAO, 1998; Soil Survey Staff, 1999).

La IUSS WRB (2007; 2015) informa que el suelo es un cuerpo natural continuo que tiene tres dimensiones espaciales y una temporal. Los tres rasgos principales que gobiernan al suelo son: (1) Está formado por constituyentes minerales y orgánicos e incluye fases sólida, líquida y gaseosa. (2) Los constituyentes están organizados en estructuras, específicas para el medio pedológico, y (3) El suelo está en constante evolución, dando así al suelo su cuarta dimensión, el tiempo. Así mismo Porta *et al.* (2019) indica que el suelo tiene componentes minerales (menores o iguales a 2 mm), fragmentos de roca (mayores de 2 mm), materiales orgánicos y biota (Porta *et al.*, 2019). El suelo con los requerimientos necesarios para la subsistencia de los microorganismos se compone de al menos cuatro componentes, que son: 1) material mineral inorgánico normalmente en torno al 40% del volumen del suelo, 2) materia orgánica, normalmente en torno al 5%; 3) aire y agua rondando el 50% y 4) organismos vivos, tanto microorganismos como mesofauna (Figura 5) (Madigan *et al.*, 2015).

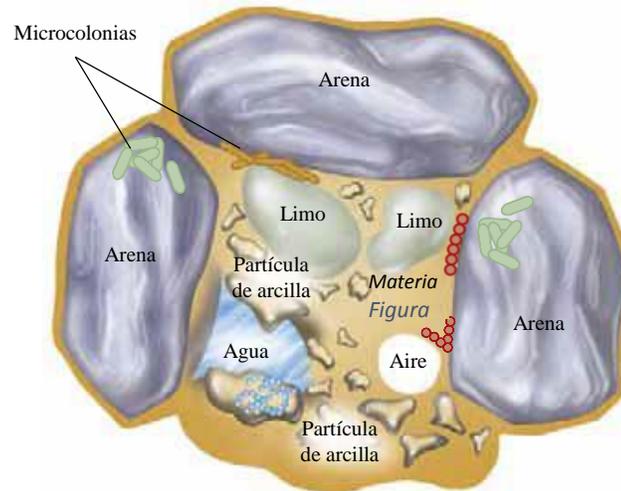


Figura 5. Composición del suelo (Madigan *et al.*, 2015).

2.2.1. Suelo del humedal

Las características de un suelo que permanece por seis meses saturado con agua induce propiedades gleyicas. Las propiedades gleyicas resultan de un gradiente redox entre el agua featica y la franja capilar, causando una distribución desigual de (hidr-) óxidos de hierro o manganeso. Los colores reductimórficos reflejan condiciones permanentemente saturadas de agua. En material franco y arcillosos, dominan los colores azul-verde debido a hidroxisales de Fe (II, III) (herrumbre verde). Si el material es rico en azufre (S), predominan los colores negruzcos debido a los sulfuros de hierro coloidales. Los colores verdes azulados y negros son inestables y con frecuencia se oxidan a pardo rojizos a las pocas horas de exposición al aire. En los suelos francos y arcillosos, los óxidos – hidróxidos de hierro se concentran sobre la superficie de los agregados y en las paredes de los poros grandes (IUSS WRB, 2015).

Los suelos con propiedades stágnicas las condiciones reductoras son causadas por la intrusión de otros líquidos, como la gasolina (IUSS WRB, 2015). En los gleysoles, la naturaleza mineralógica tiene superficies activas (arcillas 2:1) que permiten la acumulación de los hidrocarburos en la masa basal, en contraste con la actividad biológica que arrastra los hidrocarburos a través de los canales; esto origina su fragmentación y las condiciones oxidantes para la precipitación del hierro (Gutiérrez y Zavala, 2002).

2.2.2. Importancia del carbono y nitrógeno en el suelo

2.2.2.1. Importancia del carbono en el suelo para plantas y microorganismos

El carbono es un elemento químico con símbolo C, número atómico 6 y masa atómica 12,01μ. El C llega a la biosfera a través de la acción de las plantas, las cuales utilizan la energía solar para transformar el CO₂ de la atmósfera (Campbell y Reece, 2007), y es un elemento fundamental de los compuestos orgánicos, en los que se combina con nitrógeno, fósforo, azufre, oxígeno e hidrógeno para constituir las moléculas (Jaramillo, 2004).

El carbono orgánico del suelo (COS) es una pequeña parte del ciclo global del carbono ocupa un 69,8 % del carbono orgánico de la biosfera (FAO, 2001). El COS está en forma de polímeros de plantas, polímeros de paredes celulares fúngicas y bacterianas y exoesqueletos de artrópodos, los polímeros más comunes son los polímeros vegetales y se observan en la Figura 6; A) La celulosa es el polímero vegetal más común. Es un polímero lineal de subunidades de glucosa unidas a β-1,4. Cada polímero contiene 1000 a 10,000 subunidades. B) La hemicelulosa es el segundo polímero más común. Esta molécula es más heterogénea y consiste en hexosas, pentosas y ácidos urónicos. Un ejemplo de un polímero de hemicelulosa es la pectina. C) El almidón es un polisacárido sintetizado por las plantas para almacenar energía. El almidón se forma a partir de subunidades de glucosa y puede ser lineal (unido a α-1,4), una estructura conocida como amilosa, o ramificado (unido a α-1,4 y α-1,6), conocido como amilopectina. D) La quitina (hongos, artrópodos) y peptidoglicano (bacteria), y se forma a partir de subunidades de N-acetil glucosamina unida por β-1,4. Este polímero se encuentra en las paredes celulares de hongos. E) Las paredes celulares bacterianas están compuestas de polímeros de N-acetil glucosamina y ácido N-acetilmurámico conectados por enlaces β-1,4 (Pepper *et al.*, 2015).

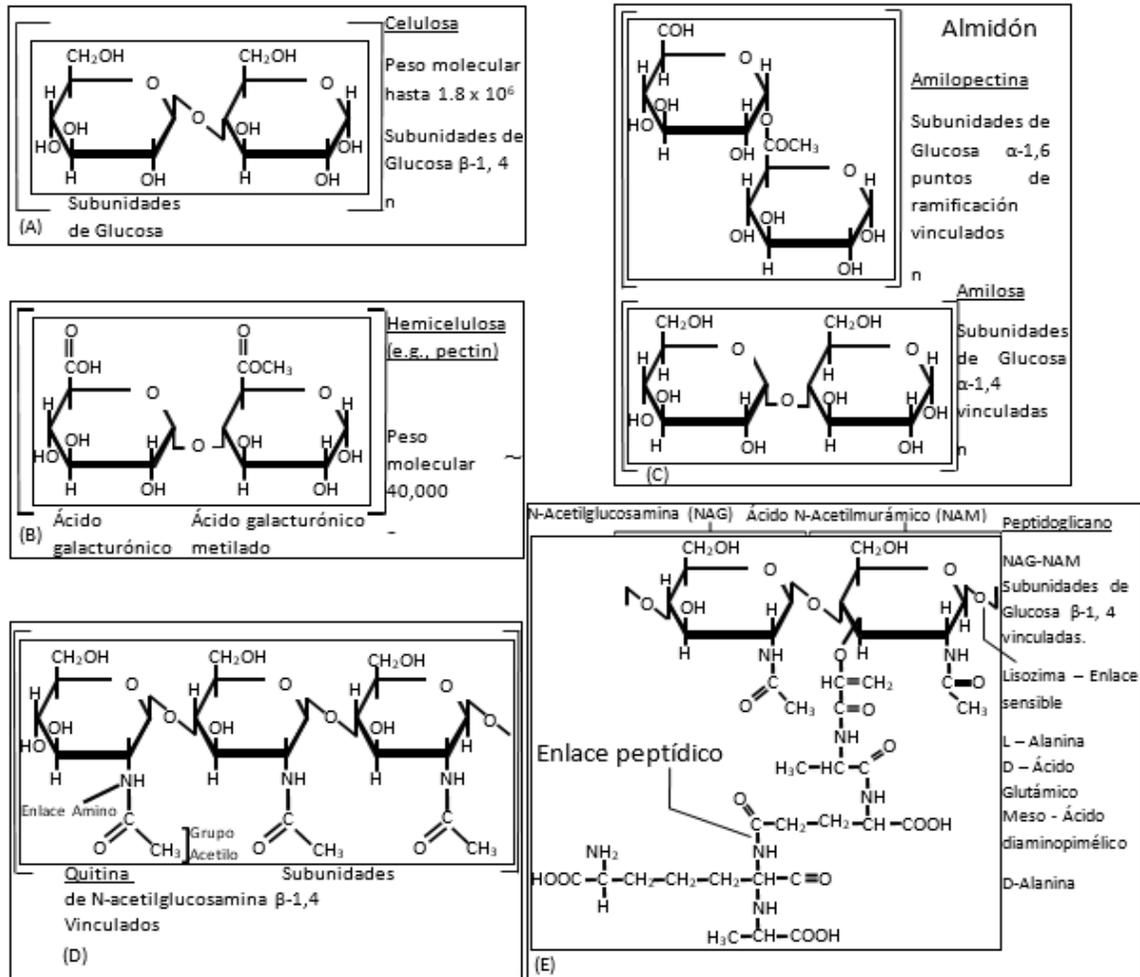


Figura 6. Polímeros orgánicos comunes encontrados en el medio ambiente, A) La celulosa. B) La hemicelulosa. C) El almidón. D) La quitina. E) Las paredes celulares bacterianas (Pepper *et al.*, 2015).

El COS afecta la mayoría de las propiedades químicas, físicas y biológicas del suelo, vinculadas con su: 1) calidad, 2) sustentabilidad y 3) capacidad productiva (Martínez *et al.*, 2008). En ecosistemas agrícolas, la calidad del suelo depende en gran medida de la cantidad, calidad y dinámica de las reservas del COS (Mollogón *et al.*, 2015). Una reducción en el contenido del COS puede acentuar la degradación del suelo por erosión, compactación, pérdida de nutrientes, lavado, acidificación o salinización, y en general, provoca una disminución en la biodiversidad del suelo (Brady y Weil, 2008).

2.2.3. Importancia del nitrógeno en el suelo para plantas y microorganismos

El nitrógeno (N) es un macronutriente para las plantas y microorganismos del suelo constituye entre 1-5% del total de la materia seca de planta y 13% de bacterias, al formar parte de la composición de proteína, ácido nucleico, clorofila, co-enzimas, phytohormonas y metabolitos secundarios (Hawkesford *et al.*, 2012; Madigan *et al.*, 2015). La importancia del N para las plantas promueve el desarrollo de follaje, hojas y tallos en tiempos costos, induce color verde oscuro al material vegetal, las células son más grandes con paredes más delgadas y facilita la formación de carbohidratos (Garzón, 1998).

El N en el suelo forma parte de la materia orgánica (MOS) y entre el 95 a 99% forma parte de compuestos orgánicos. La forma molecular disponible en el suelo para las plantas es nitrato (NO_3^-) y Amonio (NH_4^+), y para los microorganismos las dos formas anteriores más el nitrógeno molecular (N_2). El nitrato tiene mayor movilidad en el suelo que el amonio y es más disponible para la planta y los microorganismos. El N en el horizonte superficial del suelo se localiza en el rango de 0.02 a 0.5% y un valor cerca de 0.15% N representativo en un suelo cultivable. Una hectárea de suelo puede contener entre 3.5 Mg en el horizonte A y quizás un 3.5 Mg adicional en capas más profundas (Brady y Weil, 2008).

El NO_3^- se absorbe por la raíz de la planta de manera activa, es decir, con gasto de energía, y enzimas catalizan el pasaje de los iones NO_3^- a través de las membranas celulares, sobre todo a nivel de los pelos radiculares (Stevenson, 1982), cuando el NO_3^- ha ingresado a la planta se almacena en tejidos radiculares o reducidos y sintetizados en aminoácidos, o depositados en el xilema para ser transportados por los tallos en forma de aminoácidos y NO_3^- , este se almacena temporalmente o se mueve hacia las hojas. La asimilación de NO_3^- se realiza a través de una serie de etapas: 1) NO_3^- se reduce a NO_2^- por acción enzimática y de la presencia de fotosintatos, 2) NO_2^- se reduce a NH_3 por la acción de nitrito reductasa y 3) el NH_3 obtenido es rápidamente incorporado a ácido glutámico por acción de glutamina sintetasa y glutamato, ubicado dentro y fuera de las células (Perdomo *et al.*, 1999).

La absorción de NH_4^+ por la planta puede ser activa y pasiva, cuando es pasiva su tasa de absorción depende más del suministro de energía. Esto se debe a que una vez que es absorbido el NH_4^+ se incorpora a los esqueletos carbonados, y en caso de no existir carbohidratos disponibles para este proceso, el amonio se acumula a niveles tóxicos dentro de la raíz. Una

vez absorbido el NH_4^+ no requiere ser reducido por lo que con relación al NO_3^- existiría un ahorro de energía por parte de la planta (Perdomo *et al.*, 1999).

La disponibilidad del N en forma orgánica e inorgánica para los microorganismos es importante para desarrollar su metabolismo y multiplicación, ellos lo disponen en forma de proteína, aminoácidos libres, compuestos nitrogenados formando complejos o polifenoles, N_2 , NO_3^- y NH_4^+ (Robertson and Groffman, 2015). Los microorganismos inmovilizan el N que ellos mismos mineralizan, debido a que deben asimilar nutrientes inorgánicos a los compuestos orgánicos protoplásmicos (Alexander, 1995). El amonio está asociado con el exceso de productos de desecho en el metabolismo microbiano, en donde el amonio acumulado representa la cantidad de N del sustrato que sobrepasa a la demanda microbiana. Y la nitrificación se asocia con las reacciones que producen energía en el metabolismo de las bacterias autótrofas (Paul, 2015).

2.3. Importancia de las bacterias en suelo y rizosfera

La diversidad de organismos en el suelo y rizosfera son: macrofauna (>2mm), microflora, mesofauna (0.1-2mm), microfauna (<0.1 mm) y microflora (<.1 mm). Los grupos de microorganismos en el suelo y rizosfera es identificada por (1) el número de individuos, (2) peso biomasa por unidad de volumen en el suelo y (3) su actividad metabólica (respiración microbiana) (Brady y Weil, 2008). En el grupo de la microflora se ubican: microalgas, hongos, bacterias y cianobacterias y actinomicetos (Brady y Weil, 2008).

La importancia de los microorganismos del suelo y rizosfera radica en la mineralización del carbono orgánico que llevan a cabo para la transformación de moléculas complejas a moléculas minerales simples que puedan ser aprovechados por las plantas y microorganismos, por ejemplo, en condiciones aeróbicas los almidones, azúcares, lignina, celulosa, ácidos orgánicos y aceites son descompuestos por microorganismos y se forman compuesto intermedios más simples (Ortiz y Ortiz, 1980).

Los microorganismos en el suelo se hospedan en la rizosfera, ella se define como la fina capa de suelo adherida al sistema de raíces de las plantas después de ser sacudida (Figura 7) (Atlas y Bartha, 2002). En la rizosfera la raíz y los microorganismos depositan exudados orgánicos, y son tres grupos, el primero los solubles en agua tales como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, carbohidratos, enzimas, hormonas y vitaminas, el segundo los insolubles en agua

materiales como paredes de celdas, residuos de raíz, mucilagos y células muertas, polímeros y el tercer grupo el dióxido de carbono derivado de la respiración de la raíz (Maschner, 2012; Lynch y de Leij, 2012).

Los microorganismos en la rizosfera son estimulados para colonizarla, debido a los compuestos orgánicos que la componen. La densidad de microorganismos es más grande en la rizosfera que el suelo a distancia. El incremento en el número de microorganismos de esta relación es expresado como la proporción R/S, R es el número por gramo en suelo rizosférico y S es el suelo a distancia (Marschner, 2012). Los microorganismos más beneficiados por la presencia de las raíces son las bacterias que incluso llegan a asociarse con ellas (Cuadro 3) (Porta *et al.*, 2003), al respecto Lynch y de Leij, 2012) informa que la población de microorganismos por gramo es mayor en la rizosfera que en el suelo a distancia.

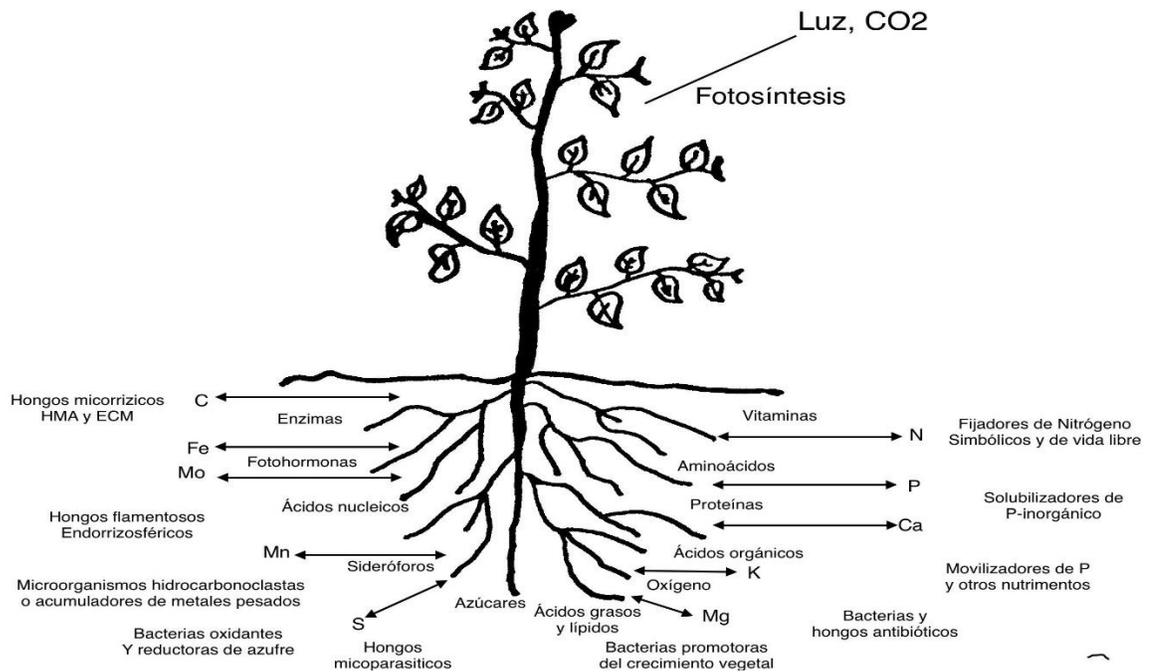


Figura 7. Composición de la rizosfera (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007)

Cuadro 3. Ejemplo de microorganismos importantes en suelo y rizosfera

Organismo	Genero	Rizosfera (moo/g de suelo seco)
Bacterias	<i>Pseudomonas</i> spp, <i>Arthrobacter</i> , <i>Agrobacterium</i> , <i>Radiobacter</i> y <i>Rhizobium</i>	53x10 ⁶
Hongos	<i>Mucorales</i> , <i>Fusarium</i> spp, <i>Cylindrocarpon</i> spp y <i>Penicillum</i> spp.	1x10 ⁵
Actinomicetos	<i>Streptomyces</i> spp y <i>Nacardia</i> spp.	7x10 ⁶

Fuente: (Blasco, 1970; Buscot, 2005).

2.3.1. Bacterias hidrocarbonoclasticas

Las bacterias hidrocarbonoclastas son heterótrofas y capaces de crecer en sustratos que contienen hidrocarburos como fuente de carbono y energía (Janzen y Teresinha, 2018), estas se involucran en la mineralización de contaminantes de hidrocarburos presentes en el medio ambiente (Narjes *et al.*, 2015). La presencia del petróleo en el suelo enriquece selectivamente la comunidad microbiana capaz de adaptarse y utilizar el nuevo sustrato, y crea una situación selectiva. Sin embargo, los componentes tóxicos del petróleo pueden inhibir a algunos miembros de la actividad microbiana. A pesar de ello las bacterias hidrocarbonoclastas son las principales responsables de la biodegradación de hidrocarburos en el suelo (Fernández *et al.*, 2006; Madigan *et al.*, 2015).

La biodegradación de hidrocarburos se realiza con la intervención de las bacterias que utilizan esta fuente de carbono y energía, ellas poseen enzimas capaces de adicionar grupos funcionales al esqueleto de carbono, y polariza a las moléculas de hidrocarburos (Rojo, 2009), esta degradación se desarrolla de forma aerobia y anaerobia, siendo esta última menos frecuente (Wentzel *et al.*, 2007).

Diversos estudios han demostrado la importancia de las bacterias hidrocabonoclastas (BHC'S) en suelo y rizosfera contaminadas con petróleo. Orocio-Carrillo (2019) encontró que, a los 180 días, las poblaciones de BHC's fueron mayor en rizosfera (135×10^2 UFC g^{-1} s.s) con 102 g/kg HTP's y en suelo (128×10^2 UFC g^{-1} s.s) con 54 g/kg HTP's, por lo contrario, la menor población de bacterias fue en suelo con 102 g/kg de petróleo lo que demuestra el incremento en 4.2 veces de BHC's por efecto de rizosfera solo fue inducido en suelo con 102 g/kg. De igual manera González-Moscoso (2015), obtuvo resultados de 19×10^9 UFC g^{-1} s.s en rizosfera utilizando *Leersia hexandra* por 180 días

2.3.2. Bacterias desnitrificantes

Las bacterias desnitrificantes son filogenéticamente diversas y están distribuidas ampliamente en ecosistemas acuáticos (humedales) y terrestres. El proceso de desnitrificación es inducido por muchas especies de Eubacterias y en unas pocas Arqueobacterias, este proceso consiste en la reducción de nitratos con pérdida final de nitrógeno para el suelo. La desnitrificación se produce bien sea porque el organismo requiere el nitrógeno para sus células o el oxígeno para la respiración, la reducción ha sido dividida en dos categorías: a) reducción asimilatoria: por medio de la reductasa asimilatoria los nitratos son reducidos y asimilados por el microorganismo para sus requerimientos celulares b) reducción desasimiladora: por medio de la reductasa desasimiladora el organismo utiliza los nitratos como aceptores de electrones en condiciones anaeróbicas en lugar del oxígeno (Figura 8) (Blasco, 1970; Madigan *et al.*, 2015). Las Proteobacterias y Enterobacterias, son anaerobios facultativos, debido a que cambian el aceptor de electrones como el oxígeno por óxidos de nitrógeno bajo condiciones anóxicas (De Mesa *et al.*, 2006).

La desnitrificación bacteriana es un proceso respiratorio en el que el nitrato es reducido a nitrógeno gaseoso (N_2) bajo condiciones limitadas de oxígeno. El proceso de reducción de nitratos hasta gas nitrógeno ocurre en etapas sucesivas, catalizadas por sistemas enzimáticos diferentes (Hernández *et al.*, 2016).

En humedales se presentan condiciones anoxicas con bajos niveles de oxígeno. Se ha reportado que es un ambiente en donde se establecen bacterias desnitrificadoras y fijadoras de nitrógeno, que se localizan en la capa superficial del suelo a una profundidad de 5 cm (Rösh *et al.*, 2002), regulan la disponibilidad de nitratos, carbono y oxígeno (Song *et al.* 2012),

remueven los nitratos de manera permanente del ecosistema y los retornan la atmósfera, completando así el ciclo del nitrógeno (Hernández y Mistch, 2007).

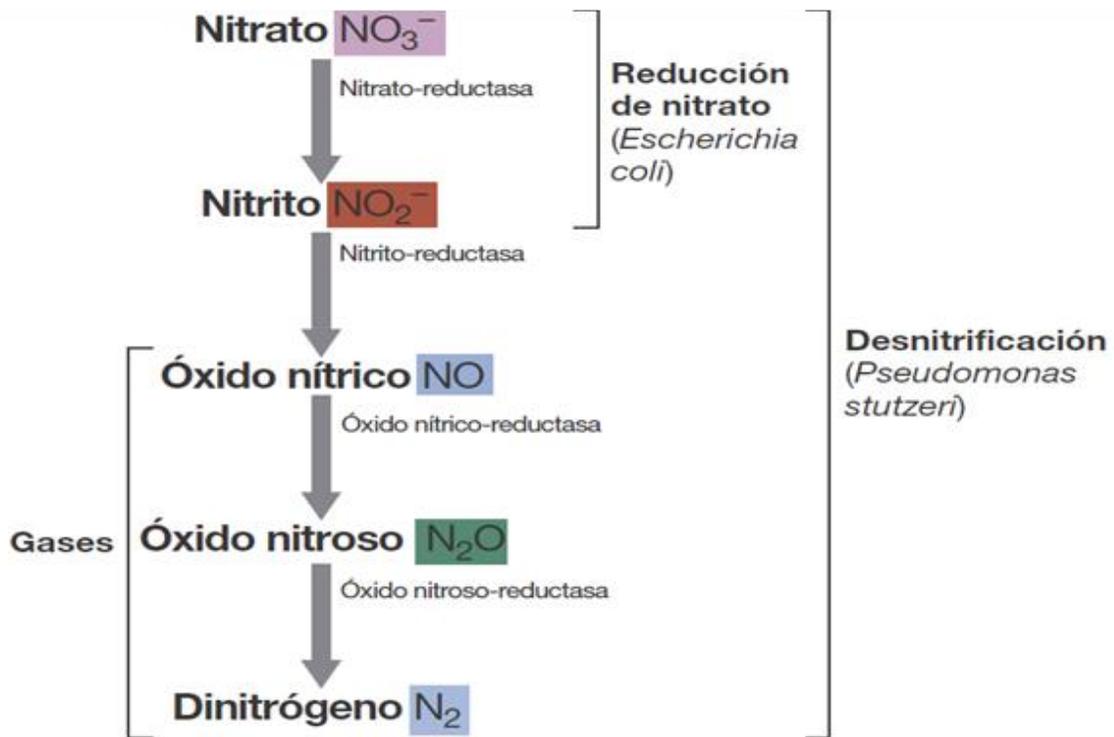


Figura 8. Etapas de la reducción desasimiladora del nitrato (Madigan *et al.*, 2015).

2.3.3. Bacterias y hongos heterótrofos

Las bacterias y hongos heterótrofos requieren compuestos orgánicos como fuente de carbono para su crecimiento, y se encuentran sobre organismos superiores de donde obtienen los compuestos orgánicos o bien en lugares donde existen materiales en descomposición (Campbell y Reece, 2005; Romero, 2007). Ellos requieren materiales orgánicos preformados que utilizan como fuente de energía y como esqueletos carbonatados para la síntesis celular. A causa de su pared celular rígida, no pueden procesar alimento y, por lo general, absorben nutrientes solubles simples que pueden obtener a partir de polímeros complejos por liberación de enzimas extracelulares (Pascual y Calderón, 2000).

Los microorganismos heterótrofos son importantes en el ciclo biogeoquímico del carbono, reciclando o mineralizando el material orgánico en CO₂ y H₂O (Atlas y Bartha, 2002), ellos son exigentes en sustratos carbonados entre ellos; hidratos de carbono, alcoholes y ácidos orgánicos sencillos hasta los compuestos polimerizados (celulosa y la lignina). La mayoría son saprofitos comunes del suelo, eficaces transformadores de sustratos edáficos en biomasa (Julca *et al.*, 2006).

2.3.4. Microalgas en suelo inundado

Las algas son organismos eucariotas o procariotas, uni o pluricelulares sin estructuras de conducción, que presentan un amplio rango de tamaños. Las algas en contraste con otros microorganismos como los hongos crecen mejor en suelos cuyo contenido de humedad es alto, esto es debido principalmente a la diferencia de habilidad para crecer con la cantidad de oxígeno existente en competencia con la humedad en los poros (León, 1991). En relación con el tipo de sustrato al que se asocian pueden ser algas epífitas (sobre la vegetación sumergida), algas epipélicas (en sedimentos blando o limoarcillosos), algas epilíticas (sobre sustratos duros) y algas epipsámicas (asociadas a sustrato arenoso) (Gómez *et al.*, 2009).

Las microalgas constituyen parte esencial de los mares, ríos y lagos y su importancia biológica radica en que son organismos fotosintéticos capaces de convertir la energía del sol en energía química. En ecosistemas acuáticos, tales como arrecifes, manglares, humedales etc., las microalgas no solamente contribuyen de manera considerable a la producción de materia orgánica, si no también al reciclaje de nutrientes y a la producción de oxígeno en sus aguas (Peña *et al.*, 2005). Además, en suelos inundados, las microalgas pueden hacer una

contribución similar o mayor a los incrementos de nitrógeno adicionados al suelo (Salas, 1987).

Dentro del contexto de la biorremediación asistida con microalgas, han demostrado que son capaces de biotransformar y biodegradar contaminantes aromáticos comúnmente encontrados en aguas naturales y residuales (Semple *et al.*, 1999). Las microalgas y cianobacterias proveen carbono reducido y nitrógeno al microbiota presente en los ecosistemas acuáticos, lo que incrementa el potencial de degradación y eliminación de contaminantes. En adición, ciertas algas, cianobacterias y bacterias fotosintéticas son útiles como indicadores de contaminación ambiental y, por lo tanto, tienen aplicación en pruebas de toxicidad (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2006).

2.4. Efecto de los hidrocarburos del petróleo en plantas y microorganismos

Los derrames de hidrocarburos de petróleo son una de las principales fuentes de contaminación de suelos y aguas ya que ocasionan perturbaciones en los ecosistemas al afectar su estructura y bioprocesos (Zamora *et al.*, 2012). Este tipo de contingencias ambientales originan efectos directos sobre la biota, ya que el petróleo contiene compuestos químicos tóxicos que producen daños a plantas, animales y humanos, pero principalmente sobre las poblaciones de microorganismos, los cuales representan parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Vasudevan y Rajaram, 2001; Zamora *et al.*, 2012).

En México existen extensas áreas contaminadas con hidrocarburos procesados del petróleo, debido principalmente a derrames, así como a las actividades propias de la industria petrolera. Se estima que en los últimos 20 años han provocado pérdidas por más de 50 mil millones de dólares, con mayor impacto en el aspecto ambiental y agrícola (Navarro-Machado, 2009). Este tipo de compuestos se acumulan en ecosistemas marinos y terrestres, siendo responsables del deterioro de algunos suelos contaminados. La contaminación del suelo y el agua ha venido en aumento como resultado de las malas prácticas en la explotación, refinación, distribución, mantenimiento y almacenamiento de petróleo crudo y sus derivados (Iturbe *et al.*, 2007).

2.4.1. Efecto en planta

En un derrame de petróleo, el daño inicial a las plantas consiste en la muerte del follaje y tejidos leñosos, pero algunas especies no mueren y se regeneran. Algunas comunidades de

plantas responden a la contaminación con un cambio en la composición de las especies (Freedman, 1989). Los hidrocarburos del petróleo penetran y matan al embrión de las semillas, disminuyen su germinación, inducen un inadecuado desarrollo y comportamiento radicular, provocan achaparramiento, clorosis y amorfismo en plantas, estas sufren deficiencias de nutrimentos (Elías-Murguía y Martínez, 1991; Méndez-Natera *et al.*, 2004). La altura de la planta, germinación y producción de la biomasa también son características fisiológicas sensibles a la toxicidad de los hidrocarburos (Ramírez, 2012). De igual manera la disminución del crecimiento vegetal y la muerte de las plantas son indicadores de la toxicidad de los hidrocarburos (Powell, 1997; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia, 2004).

2.4.1.1. Efecto de los hidrocarburos del petróleo en pastos

Los efectos del petróleo en pastos han sido reportados por diversos Investigadores:

Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia (2004) evaluaron plántulas y plantas *Echinichloa polystachya* y *Bracharia mutica* durante 32 y 150 días, respectivamente, de exposición a tres diferentes concentraciones de petróleo (50000, 100000 y 150000 mg.kg⁻¹). Los resultados muestran efectos negativos en germinación, altura, longitud de raíz y biomasa conforme la concentración de petróleo fresco incrementa en el suelo.

Larenas y De Viana (2005) estudiaron la respuesta de germinación y supervivencia de *Tithonia tubaeformis* a contaminantes derivados del petróleo (gasoil: 0, 1.96, 3.93% y aceite usado de auto: 0, 2.75% y 5.5%). Los resultados informan que el gasoil inhibió completamente la germinación, mientras que el aceite usado de auto en ambas concentraciones no se diferencia del control y permitió la germinación y supervivencia de las plantas; esto pudiera ser debido a que la proporción de hidrocarburos fue menor en aceite usado (1%) que en gasoil (13.7%).

Rivera-Cruz *et al.* (2012) evaluó el efecto de 150, 50000 y 78000 mgkg⁻¹ de petróleo fresco en el crecimiento de *Brachiaria mutica*, y resultó que las variables respuestas tiene tolerancia al petróleo fresco.

Gonzalez-Moscoso *et al.* (2019) elaboró un experimento por 240 días, usando *Leersia hexandra* en la fitorremediación y dosis de petróleo fresco de (0, 26346, 48748, 76585 mg-kg⁻¹

¹), resultando que a dosis altas de petróleo (76585mg·kg⁻¹), se promovió la mayor cantidad de raíces y obtuvo un efecto positivo en la biomasa aérea.

Orocio-Carillo *et al.* (2019) realizó un experimento (180 días) con la finalidad de conocer el efecto de la concentración de petróleo fresco en crecimiento, producción de materia seca y contenido de proteína foliar de *L. hexandra* en un suelo Gleysol. La exposición a una dosis de aceite de 7.9 g·kg⁻¹ aumentó la materia seca aérea en 105% en comparación con el control, con tendencia a disminuir a medida que aumentan las dosis de aceite.

2.4.2 Efecto en microorganismos

Los hidrocarburos del petróleo en los microorganismos provocan disminución y/o aumento de la microflora según el tipo de petróleo y el tiempo de derrame en el sitio (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Rivera-Cruz 2011; Guo *et al.*, 2014). Los compuestos del petróleo influyen en el número, composición, biomasa y actividad microbiana en el suelo (Wang y Bartha, 1994). Sin embargo, existen microorganismos que se adaptan y utilizan como fuente de carbono los hidrocarburos y, así incrementar su actividad metabólica bajo estas condiciones (Labud *et al.*, 2007).

En suelos con petróleo los microorganismos adaptados a este sustrato lo utilizan como fuente de carbono y energía, durante su degradación se generan moléculas tóxicas, estos metabolitos intermedios poseen un alto grado de toxicidad y provocar un daño a la biota microbiana del suelo (Trinidad *et al.*, 2005; Chinios *et al.*, 2010), al respecto según Wang y Bartha, (1994) los metabolitos como los ácidos grasos, materiales fenólicos y terpenoides son fitotóxicos (Wang y Bartha, 1994).

2.4.2.1. Efecto del petróleo en microorganismos

Diversos investigadores reportan el efecto del petróleo en microorganismos:

Cinco cepas bacterianas degradadoras de fenantreno y fijadoras de nitrógeno atmosférico: RM15, RM10S (aisladas de suelo contaminado con petróleo), RM12A (aislada de suelo contaminado con fenantreno), *Azospirillum brasilense* cd y *A. halopraeferens* (aislado de suelo no contaminado), fueron evaluadas por Miranda-Martinez *et al.* (2006), para determinar su dinámica poblacional en área contaminada con fenantreno (30 mg·kg⁻¹) en presencia o no del pasto alemán. Los resultados indican que las cepas RM15, RM10S y RM12A presentaron

un incremento los primeros días, después disminuyó hasta dejar de ser detectada. La mayor población de bacterias inoculadas se observó en los tratamientos sin planta con dosis de 30 mgkg⁻¹ de fenantreno.

Vazquez-Luna *et al.* (2010) evaluaron el impacto del petróleo crudo sobre bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre, en un suelo con cinco concentraciones de petróleo (1200, 3500, 10000, 20000 y 40000 mgkg⁻¹), y los resultados dicen que a las 219 hrs, hubo un incremento exponencial de colonias 2 a 3.5 veces más abundantes en el testigo, en los tratamientos con mayor concentración de petróleo hubo menor diversidad de colonias, pero las poblaciones fueron significativamente mayores.

Medina *et al.* (2014) estudiaron la biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelo con 4.61, 1.5 y 0.48% de petróleo provenientes de la bahía Amuay, en los suelos contaminados se aislaron e identificaron tres especies autóctonas de hongos del género *Aspergillus* (*Niger*, *Flavus* y *Terreus*), resultando que *Aspergillus Niger* es la cepa que presenta mayor aumento (1.66 UFC gss), y concluyen que los hongos del género *Aspergillus* son capaces de crecer y degradar los hidrocarburos totales del petróleo.

2.5. Tecnologías biológicas de recuperación de suelos

Las tecnologías de remediación de suelos contaminados por hidrocarburos del petróleo es la operación unitaria o serie de operaciones unitarias que altera la composición de una sustancia peligrosa o contaminante a través de acciones químicas, físicas o biológicas (EPA 2001). La finalidad de las tecnologías es extraer, destruir, modificar, reducir su toxicidad o movilidad del contaminante, para reducir y/o eliminar su peligrosidad del suelo (Zamudio, 2010). Los métodos y procedimientos para seguir en el proceso de remediación del suelo y humedales con petróleo dependen del sitio, topografía, acceso, cercanía a las cuencas hidrográficas y las condiciones ambientales, también se debe tener en cuenta el esparcimiento y movimiento de la mancha de petróleo (Ecopetrol, 1996; Ortiz *et al.*, 2006).

Las tecnologías de remediación biológicas de suelos con petróleo se clasifican según el lugar en donde se aplique y puede ser *in situ* y *ex situ* (Figura 9).

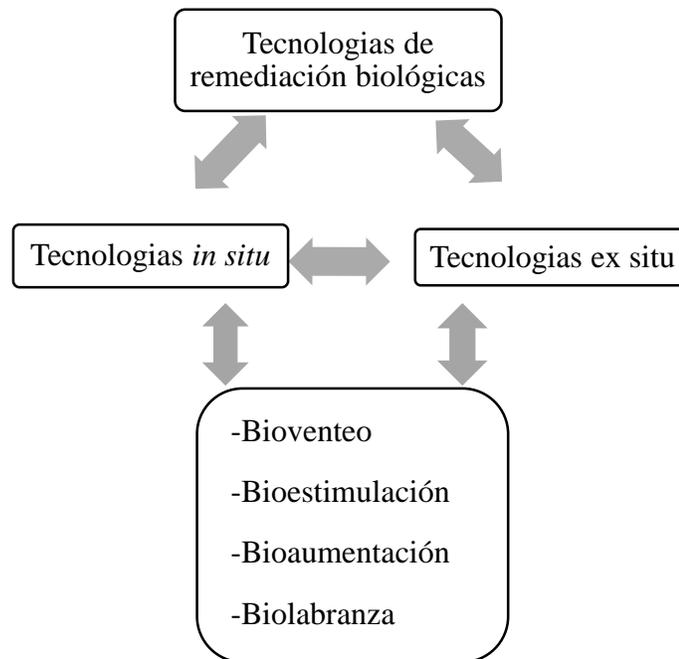


Figura 9. Clasificación de tecnologías de remediación biológicas (INECC, 2007).

2.5.1. Atenuación natural de los hidrocarburos

La atenuación natural (AN) es una tecnología natural que se desarrolla principalmente a nivel *in situ*, y en ella sucede la reducción de las concentraciones del contaminante en el ambiente con procesos biológicos, físicos (advección, dispersión, dilución, difusión, volatilización, sorción/desorción) y reacciones químicas (intercambio iónico, complejación, transformación abiótica) (US Army, 1995).

La biodegradación es uno de los principales procesos que ayudan a la atenuación natural en el suelo, siendo los microorganismos esenciales para cambiar la química de este. La adaptabilidad que tenga la población microbiana, así como el requerimiento nutricional, es lo que permite degradar a los contaminantes por medio de reacciones. Entonces, los cambios químicos causados por los microorganismos pueden disminuir directa o indirectamente las concentraciones de los contaminantes (Corona-Ramírez e Iturbide-Argüelles, 2005) además la AN está propuesta como una práctica “costo-efectiva” óptima de bajo riesgo (Margesin y Shinner, 2001).

2.5.1.1. Atenuación natural como tecnología biológica de recuperación de suelos

Romaniuk *et al.* (2007) evaluó y comparó la tasa de descomposición de dos tipos de hidrocarburos (gasoil y aceite de carter) por medio de las técnicas de atenuación natural y de la incorporación de un producto comercial específico, en un suelo franco, extraído del horizonte A de un *Argiudol Típico* contaminado con gasoil y aceite de carter, y los resultados indican que la AN fue mas lenta y menos efectiva degradando 4.520 y 6.076 mgkg⁻¹ respectivamente, que el uso del producto comercial (23 mgkg⁻¹) a los 180 días.

Gómez-Rivera, (2012) realizó un estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo a través de la atenuación natural, bioestimulación y bioaumentación en un suelo contaminado, los resultados indicaron que la AN tiene desventaja con respecto a la bioestimulación y bioaumentación, esto debido a la ausencia de oxígeno, por otro lado en condiciones naturales (AN), las bacterias degradadoras de hidrocarburos muestran competencia con las bacterias aerobias nativas y *Pseudomonas*.

Gómez *et al.* (2009) en un estudio comparativo de la bioestimulación, la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina-diésel, y los resultados informan que la AN indujo menor porcentaje (52.79%) de degradación de hidrocarburos totales del petróleo con respecto a los otros métodos los cuales alcanzaron porcentajes de remoción de 60.45 y 64.925%, esto es debido a que la AN depende de la presencia o ausencia de los microorganismos degradadores adecuados, oxígeno disuelto y el nivel de biodisponibilidad de los contaminantes.

González-Moscoso *et al.* (2019) realizó un experimento durante 240 días para evaluar la remoción de petróleo mediante atenuación natural y fitorremediación usando *Leersia hexandra*, teniendo que la mejor remoción fue dada en tecnología de atenuación natural 95% en suelo con 48748 mgkg⁻¹ de HTP's contrariamente la menor remoción se encontró en fitorremediación 37.3% en suelo con 79521 mgkg⁻¹ de HTP's.

2.5.1.2. Fitorremediación como tecnología biológica

La fitorremediación es un conjunto de tecnologías que reducen *in situ* o *ex situ* la concentración de compuestos orgánicos e inorgánicos a partir de procesos bioquímicos realizados por microorganismos asociados a plantas adaptadas al estrés ambiental (Delgadillo-López *et al.*, 2011). Se utilizan plantas para bioaumentar al suelo y eliminar a los contaminantes orgánicos siempre que sean moderadamente hidrófobos, y utilizan dos mecanismos principales: a) La absorción directa de contaminantes y la acumulación posterior de metabolitos no fitotóxicos en el tejido vegetal y b) Liberación de exudados y enzimas que estimulan la actividad microbiana y la mejora resultante de las transformaciones microbianas en la rizosfera (Shirdam *et al.*, 2009).

La fitorremediación incluye procesos de remediación basados en plantas, tales como: fitoextracción, fitoestabilización, fitoimmobilización, rizofiltración y fitovolatilización (Ali *et al.*, 2013), la eficiencia de estas técnicas depende de numerosos factores ambientales combinados, donde las plantas descomponen los contaminantes orgánicos en el suelo mediante procesos vegetales internos a través de la actividad microbiana, la cual se ve reforzada por la presencia de la rizosfera (Aisien *et al.*, 2015).

Entre las plantas adaptadas a suelo con hidrocarburos del petróleo se ha reportado a los pastos tropicales, por ejemplo:

Chávez *et al.* (2010) utilizaron pasto Egipto (*Bracharia mutica*), en la fitorremediación de suelo contaminado con petróleo nuevo (biogénico, 50000 y 78000 mgkg⁻¹), y los resultados informan que al día 158 después de establecer el experimento la mayor degradación del petróleo fue de 65% en concentración de 50000 mg kg⁻¹.

Adams *et al.* (2015) estudiaron la relación entre el petróleo crudo extrapesado y crecimiento de un pasto tropical forrajero (*Brachiaria humidicola*), teniendo como resultado que al año después del establecimiento del experimento, la biomasa se incrementó hasta un 73% a las concentraciones más bajas y en concentraciones por encima de 7000 ppm, se presentó una reducción sustancial (-56% con respecto al testigo).

Hernández-Valencia *et al.* (2017) evaluarán la capacidad del pasto *Megathyrsus maximus* (37500 mgkg⁻¹) para fitorremediar un suelo contaminado con petróleo extrapesado, los

resultados mostraron que a los 120 días el contenido de hidrocarburos se redujo en un 17.1% con *M. maximus*.

2.6. Bioquímica de la degradación de hidrocarburos de petróleo

La biodegradación de hidrocarburos es el proceso de oxidación-reducción cuyo fin es la obtención de energía, el cual utiliza microorganismos que toman a los hidrocarburos como sustrato (Eweys, 1998), este proceso de biodegradación se realiza en ambientes sin plantas y con plantas en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. En condiciones oxicas los microorganismos que intervienen contienen enzimas denominadas oxigenasas que son dependientes del oxígeno, para que los microorganismos puedan degradar hidrocarburos, primero tienen que oxidar con oxígeno el último carbono de la molécula gracias al complejo multienzimático que no hacen más que incorporar esta molécula de oxígeno (Cookson, 1995). Así se obtiene un hidrocarburo con un grupo alcohol siendo así una molécula más reactiva. Mediante otras enzimas este grupo alcohol se oxida hasta grupo aldehído y finalmente carboxílico, se obtiene una molécula similar a un ácido graso y puede ser degradado a acetil-CoA por β -oxidación (Madigan *et al.*, 2015). La degradación de los hidrocarburos ocurre mayoritariamente en condiciones aeróbicas, debido a que la degradación es mucho más rápida (Castillo *et al.*, 2005). En la degradación anaerobia o aerobia los microorganismos, necesitan un comburente para oxidar los hidrocarburos, este es el oxígeno en aerobiosis y nitrato, sulfato o Fe (III) en anaerobiosis (Lovley, 1999; Castillo *et al.*, 2005; Villatoro-Monzón *et al.*, 2008).

2.6.1. Degradación aeróbica

La oxidación aeróbica de hidrocarburos alifáticos saturados tiene como paso inicial al oxígeno molecular (O_2) como reactante, uno de cuyos átomos se incorpora en el hidrocarburo oxidado. Esta reacción la lleva a cabo una monooxigenasa con una secuencia típica de reacciones (Figura 10). El producto final es acetil-CoA. Sin embargo, no en todos los casos la oxidación inicial se produce en el carbono terminal. A veces puede producirse en el segundo carbono y entonces las reacciones posteriores son diferentes. La posible ruta de la biodegradación de los hidrocarburos aromáticos inicia con una reacción catalizada por una enzima di-oxigenasa (Camacho-Morales *et al.*, 2010). Los electrones de NADH se transfieren a través de los diferentes componentes de la enzima para incorporar dos átomos de oxígeno en el anillo aromático (Haddock *et al.*, 1997), se forma di-hidroxi-dihidro-diol seguido por una

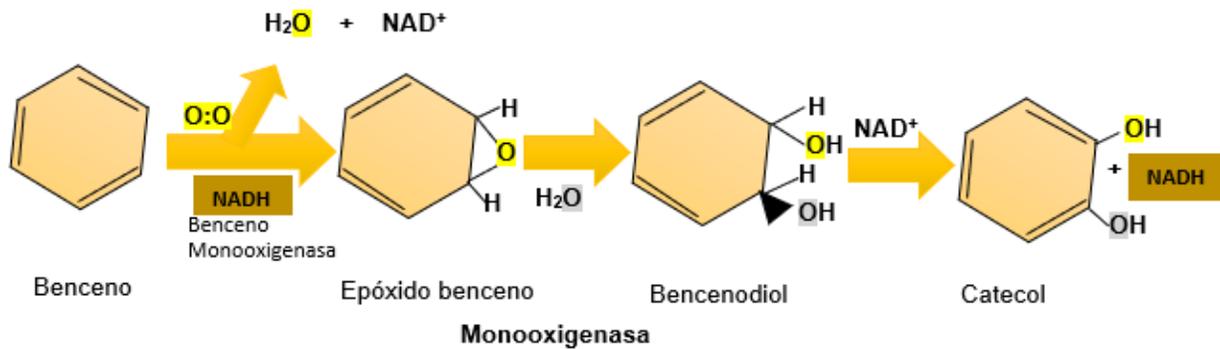
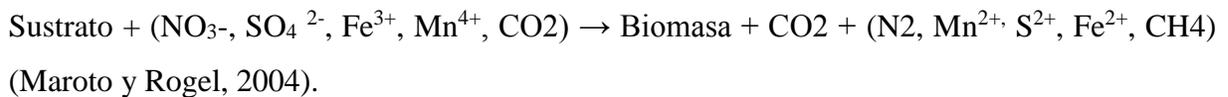


Figura 11. Paso en la degradación aeróbica de la hidroxilación del benceno a catecol por una monooxigenasa, donde el NADH es el donador de electrones (Madigan *et al.*, 2015).

Degradación anaeróbica

En hábitats microbianos anóxicos como los humedales, se desarrolla la reducción anaeróbica de las moléculas orgánicas y se realiza con donadores de electrones como SO_4 , NO_3 y Fe^3 , los compuestos orgánicos se catabolizan por fermentación.

Degradación anaerobia:



El catabolismo anóxico de hidrocarburos lo catalizan bacterias que respiran de forma anaerobia, incluidas las bacterias desnitrificantes y las reductoras de sulfatos. En condiciones anóxicas, el catabolismo de los compuestos aromáticos transcurre mediante la reducción del anillo en vez de la oxidación del anillo. La reducción del anillo prosigue con la escisión de este para producir un ácido graso de cadena lineal o un ácido dicarboxílico que se puede catabolizar posteriormente en intermediario del ciclo del ácido cítrico (Figura 12). Se han obtenido también resultados experimentales que corroboran la degradación anaeróbica del benceno, compuesto aromático que carece de un átomo de oxígeno. El catabolismo del benceno es llevado a cabo por algunas bacterias desnitrificantes y reductoras del hierro férrico (Madigan *et al.*, 2015).

El catabolismo anoxico de hidrocarburos alifáticos hexano, la adición del fumarato proporciona los atomos de oxigeno necesarios para formar un derivado del ácido graso que se puede catabolizar por beta-oxidación para dar acetyl-CoA. Los electrones (H) generadores en el catabolismo del hexano son utilizados para reeducir sulfato o nitrato en la correspondiente respiración anaerobia (Figura 13) (Madigan *et al.*, 2015). Los hidrocarburos altamente clorados (percloroetano) que son recalcitrantes en condiciones aeróbicas, pero susceptibles de biotransformación en condiciones anaeróbicas (Pepper *et al.*, 2015)

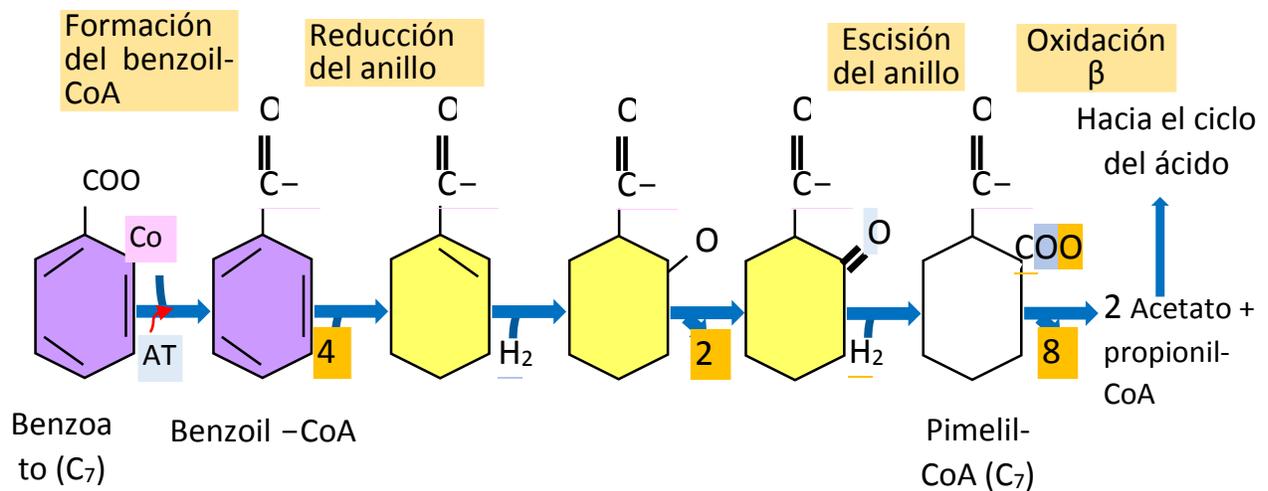


Figura 12. Degradación anóxica del benzoato por vía del benzoil-CoA (Madigan *et al.*, 2015).

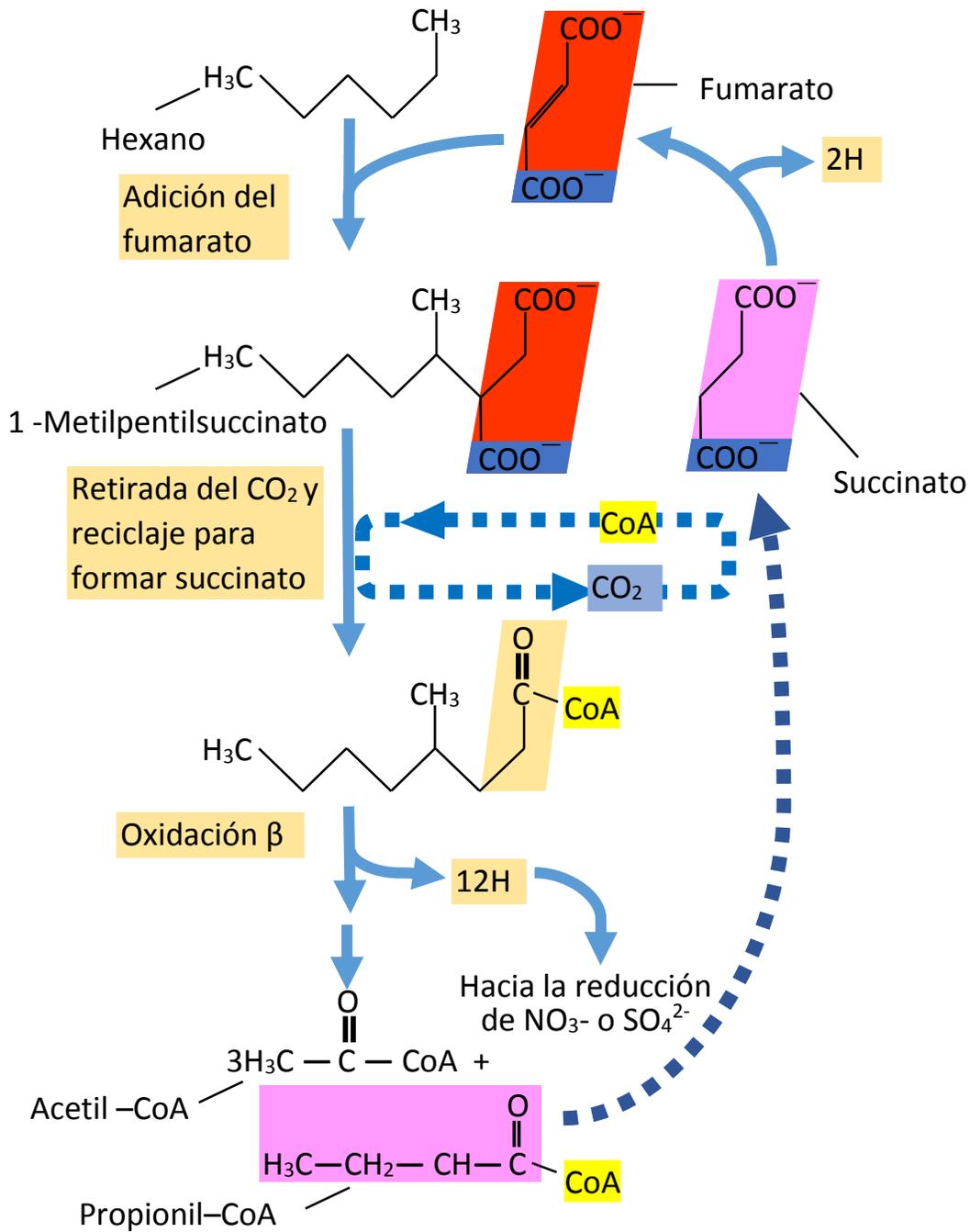


Figura 13. Catabolismo anóxico del hidrocarburo alifático hexano (Madigan et al., 2015).

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Seleccionar una tecnología natural sustentable para suelo arcilloso inundado y degradado por la actividad de la industria petrolera del sureste de México, basada en los niveles de degradación de hidrocarburos totales del petróleo, acumulación de carbono orgánico y N total, estimulación bajo condiciones de saturación de la microflora nativa, y el crecimiento y producción del pasto *L. hexandra*.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar el crecimiento de *L. hexandra* en diferentes concentraciones y tiempo de exposición a petróleo como una especie forrajera alternativa en el humedal contaminado.
2. Determinar el efecto de la tecnología natural y concentración de petróleo en la producción de *L. hexandra*, la población de bacterias, hongos, microalgas, acumulación de carbono orgánico, nitrógeno total en suelo y rizosfera de *L. hexandra*.
3. Analizar la relación de la degradación de hidrocarburos totales del petróleo alcanzados después de la aplicación de la atenuación natural y fitorremediación, con el contenido de carbono orgánico, Ntotal, mineralización del nitrógeno, población de bacterias heterótrofas, hidrocarbonoclasticas, desnitrificadoras, hongos heterótrofos, microalgas y producción de materia seca de *L. hexandra*.

HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

El sistema de tratamiento del petróleo en suelo por atenuación natural del petróleo fresco bajo condiciones de inundación induce una mayor remoción de hidrocarburos totales del petróleo y una mayor actividad microbiana respecto a la fitorremediación asociada a la microflora de la rizosfera del pasto *Leersia hexandra*.

4.2. Hipótesis específicas

1. El crecimiento de la especie forrajera *L. hexandra* en condiciones de inundación y fusionada con la concentración de petróleo y tiempo de exposición, es afectado de manera directa con el incremento de estas.
2. La tecnología biológica de fitorremediación comparada con atenuación natural induce mejor respuesta en variables de población de bacterias (heterótrofas, hidrocarbonoclastas y desnitrificantes), acumulación de carbono orgánico y nitrógeno total en suelo rizosferico.
3. La mayor degradación de hidrocarburos totales del petróleo se presenta en suelo inundado (atenuación natural) induciendo respuestas positivas, relacionadas con la población de hongos, microalgas y COS/Nt, pero de manera negativa con bacterias, COS y Nt, siendo estas afines a fitorremediación, pero con menor degradación de HTP's.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se estableció en un microtúnel ubicado en el Colegio de Postgraduados Campus Tabasco (17.983 N y 93.388 O). Esta investigación se desarrolló durante seis meses en cuatro etapas de trabajo: Etapa I. Campo. Etapa II. Establecimiento de experimento y seguimiento de crecimiento. Etapa III. Laboratorio. Etapa IV. Procesamiento de datos (Figura 14).

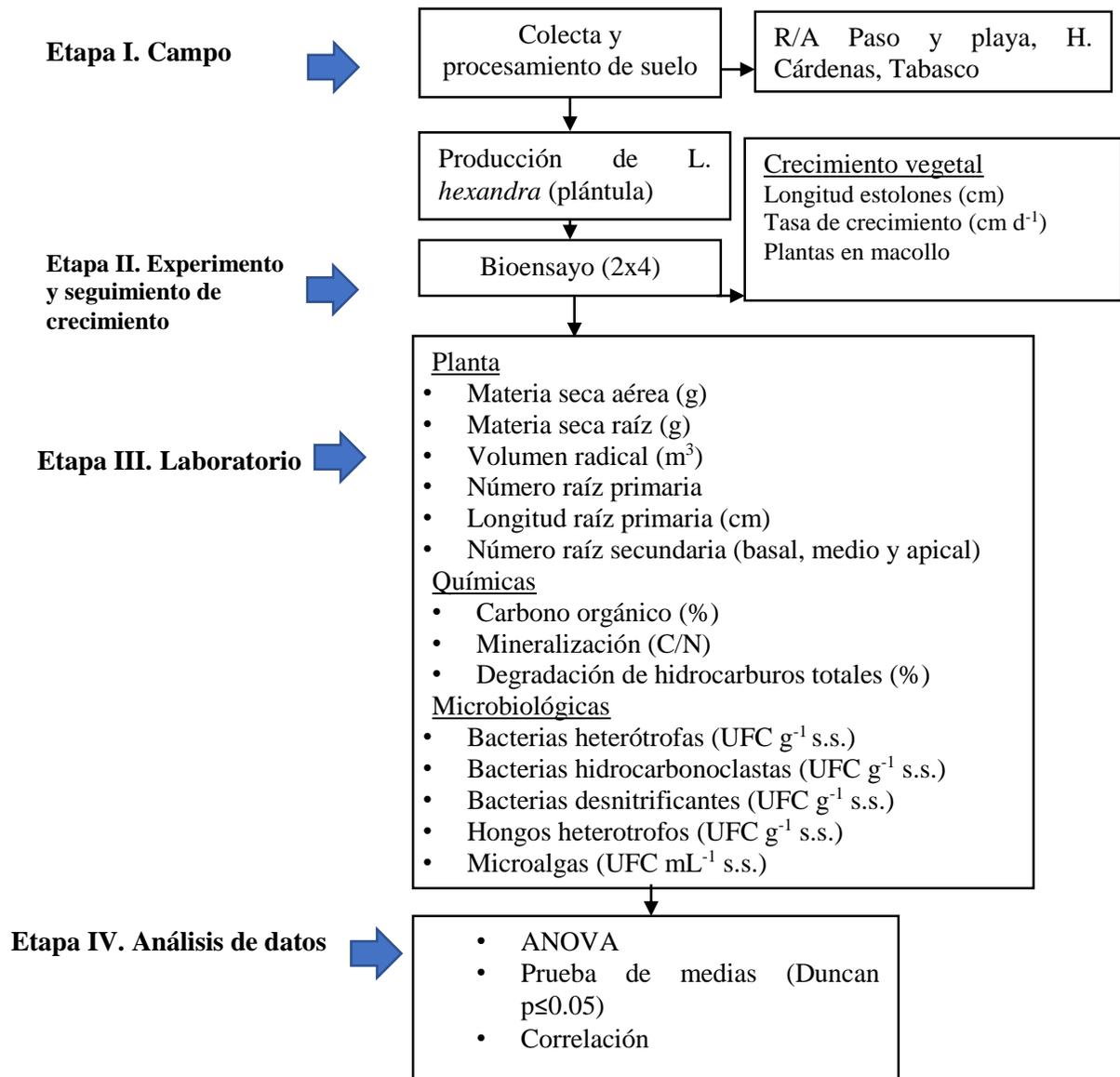


Figura 14. Flujograma del proceso de investigación

5.1. Etapa I. Trabajo de campo y producción de plántulas

5.1.1. Colecta y procesamiento de suelo

El suelo fue tomado del horizonte superficial Ap de un Gleysol cubierto con pasto, en el Km 2 Carretera Cárdenas-Huimanguillo, R/A Paso y Playa, estado de Tabasco (Figura 15a). Las coordenadas geográficas del sitio de muestreo son 17°57'41"N y 92°21'38" a 17 metros sobre el nivel del mar. Se colectaron 150 kg de suelo que se secó bajo sombra (Figura 15b) y se molió con un mazo de madera. La muestra utilizada para establecer el bioensayo se tamizó en malla 0.5 mm (Figura 15c), para los análisis químicos se tamizó en mallas de 0.5 y 2mm. Las propiedades del suelo fueron: textura arcillosa y arcillo arenosa, por sedimentación de Bouyoucos (Bouyoucos, 1962); el pH es moderadamente ácido (6.5) (DOF, 2002); el contenido de materia orgánica por combustión seca va de moderado a alto (2.3 a 3.5%) (Walkley y Black, 1934).



Figura 15. Procesamiento de suelos. a) colecta, b) secado y c) tamizado.

5.1.2. Colecta y producción de plántula

En esta investigación se utilizó el pasto *L. hexandra* que se caracteriza por crecer en humedales del estado de Tabasco, es un pasto perenne, con rizosfera sumergida en el agua y enraizada en el GL inundado al menos durante seis meses al año. Los tallos de *L. hexandra* se colectaron para la producción de plántulas en un sitio contaminado por derrames crónicos de petróleo desde hace 30 años, en el ejido José Narciso Roviroso, a dos kilómetros al suroeste del Complejo Procesador de Gas La Venta, Huimanguillo, Tabasco. Se preparó almácigo en charola de plástico con suelo tamizado en malla 12 (2 mm de diámetro).

De los tallos maduros de *L. hexandra* se cortaron estolones de cinco cm de longitud con raíces, y se sembraron 25 días antes de establecer el experimento (Figura 16a), para el traslado a las unidades experimentales. El riego fue diario y se mantuvo el suelo a capacidad de campo (Figura 16b). La altura de las plántulas establecidas en el experimento fue 9.8 ± 3.5 cm (25 días después de sembradas en el almácigo) (Figura 16c).



Figura 16. a) Rizomas sembrados en almácigos, b) Riego diario con abundante agua y c) rizomas de pastos a los 25 días después de la siembra.

5.2. Etapa II. Experimento y seguimiento de crecimiento en *L. hexandra*

5.2.1. Contaminación del suelo y diseño experimental

El petróleo fresco (PF) utilizado fue extraído del campo petrolero Cinco Presidentes, localizado en la parte noroccidental de Tabasco, en la plataforma continental frente al Golfo de México. El petróleo es del tipo Istmo mediano con 36.31° de densidad, está constituido por 56.4% de la fracción saturados, 23.7% de aromáticos y 19.4% de asfaltenos y resinas (González-Moscó et al., 2019).

El experimento se realizó en microtúnel por 180 días en H. Cárdenas, Tabasco, México. La temperatura promedio bajo microtúnel fue de $32 \pm 4.7^\circ\text{C}$. El diseño experimental fue completamente al azar con arreglo de factores (2x4): Factor 1. Sin planta (atenuación natural) y con *L. hexandra* (fitorremediación). Factor 2. Dosis de petróleo fresco (0, 22, 52 y 76 g/kg base seca). Ocho tratamientos con tres repeticiones. La unidad experimental (UE) fue un contenedor de vidrio (14.5x15 cm, diámetro y altura) con 2.0 kg de suelo tamizado. Esta UE se adecuó a un microcosmo de humedal artificial.

El suelo (2.0 kg) (Figura 17a) se mezcló por separado con 0, 30, 60 y 90 g de PF y se mezcló con una varilla de vidrio. La mezcla suelo-PF se colocó en los contenedores de vidrio (Figura 17b). En las UE para fitorremediación se trasplantó una plántula de *L. hexandra* y se aplicó riego con agua de pozo artesanal cada 24 h para mantener condiciones de anegamiento, con una lámina de agua permanente de 5 cm superficial (Figura 17c), y la UE para atenuación natural se mantuvo bajo condiciones de anegamiento con similar volumen de agua que las UE de fitorremediación (Figura 17c).



Figura 17. a) Peso de suelo Gleysol (2 kg), b) mezcla de suelo y petróleo para cada unidad experimental, c) lámina de agua en atenuación natural y fitorremediación.

5.2.2. Análisis de crecimiento

El crecimiento de *L. hexandra* evaluado con longitud de estolones (LE) y número de plantas en macollo (NPM) se evaluó al día 30, 60, 90, 120, 150 y 180 después del trasplante. LE se midió con regla graduada en cm desde la zona del cuello hasta el ápice de la hoja central (Figura 18a) y PJM consistió en contar directamente el número de plantas que emergen de la base del tallo (Figura 18b).

La tasa de crecimiento relativa (TCR) fue determinada usando la LE en los tiempos antes indicados, mediante la fórmula de Hunt *et al.* (2002):

$$TCR = \frac{\ln(w_2) - \ln(w_1)}{t_2 - t_1} \dots \dots \dots (1)$$

Donde ln: logaritmo natural. w: altura (cm). t: tiempo (días)



Figura 18. a) Medición de longitud de estolones y b) conteo de plantas jóvenes al macollo.

5.3. Etapa IV. Laboratorio

5.3.1. Colecta de muestra de agua

Cinco días antes de levantar el experimento se colectó 10 mL de agua de cada unidad experimental. La muestra se depositó en frascos de vidrios estériles, y se procesó la muestra para observar en el laboratorio.

5.3.2. Levantamiento del bioensayo experimental

Al día 180 después de establecido el experimento y que el suelo de las UE mantuviera una humedad a capacidad de campo, se cosecharon las plantas. Esto consistió en separar el suelo, tallo y raíz de *L. hexandra* (Figura 19a, b). El suelo y rizosfera se homogenizó por UE y se colectó de cada una de ellas para análisis químicos y microbiológicos (Figura 19c). El tipo de muestra y cantidad se depositaron por separado en bolsas de polietileno. Se tomó 20 g para hidrocarburos totales del petróleo, 30 g para población de microorganismos y 50 g para humedad, pH, carbono orgánico y nitrógeno total. Las muestras para hidrocarburos totales se almacenaron en refrigerado a temperatura (-4 °C), y para propiedades químicas y microbiológicas a 4 °C hasta su procesamiento en laboratorio.

Los tallos con hojas fueron separados de la raíz y colocados en bolsas de papel previamente etiquetadas para cada UE. Finalmente, la raíz se lavó con abundante agua de la llave para quitar el suelo adherido a estas (Figura 19d), se dejaron secar bajo techo por 24 horas (Figura 19e), pasado este tiempo se colocaron en bolsas de papel previamente etiquetadas (Figura 19f).

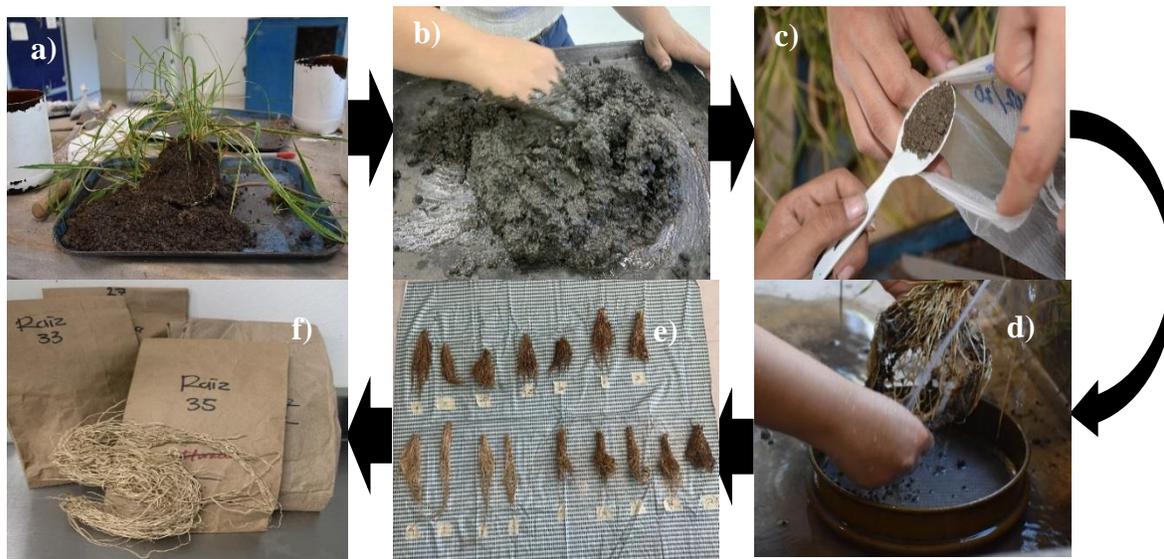


Figura 19. Cosecha de experimentos: a) separación de raíz y materia aérea de *L. hexandra*, b) homogenización del suelo sometido a la atenuación natural, c) colecta de muestra, d) lavado de raíz, e) secado de raíz bajo techo, y f) materia seca de raíz en bolsa de papel.

5.4. Etapa IV. Trabajo de Laboratorio

5.4.1. Variables en raíz

En raíz fresca al día 180 se evaluó número de raíces primarias por conteo directo (Figura 20a), longitud de raíz con regla graduada en mm (Figura 20b), número de raíces secundarias en base, media y ápice de la raíz primaria (tramos de 10 mm) usando estereoscopio Steemi 2000 (Carl Zeiss Microimagen Gmb H (Figura 20c), diámetro de raíz primaria con un vernier digital (Mitutoyo 500-196-30) y volumen radical el cual fue evaluado en raíces frescas con la técnica de desplazamiento de agua con probeta (Böhm, 1979), que consiste en colocar las raíces en una probeta graduada procurando que estas queden lo más compactada posible, después se le agrega agua del grifo hasta cubrir todas las raíces y finalmente se midió por volumetría (Figura 20d).

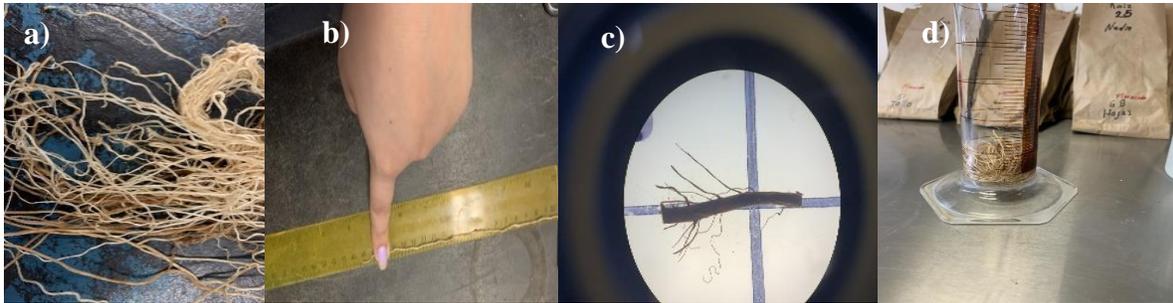


Figura 20. Variables en raíz: a) conteo de número de raíz primaria, b) longitud raíz primaria, c) tramo de 10 mm de raíz secundaria para conteo y d) volumen radical.

5.4.2. Materia seca aérea y raíz

La materia aérea y raíz se colocó en horno a temperatura de 65°C por 72 horas. Pasado este tiempo se procedió a pesar la materia seca con balanza semi analítica (Ohaus, modelo Scout Pro SP2020) (Figura 21).



Figura 21. Peso de materia seca aérea y raíz.

5.4.3. Población de bacterias, hongos y microalgas

La población de bacterias heterótrofas (BH), bacterias hidrocarbonoclasticas (BHC), hongos heterótrofos (HH), bacterias desnitrificantes y microalgas se evaluó en suelo y rizosfera al día 180 después de establecido el experimento. Los cinco grupos microbianos fueron determinados por el conteo de células viables.

5.4.3.1. Bacterias, hongos heterótrofos y bacterias hidrocarbonoclasticas

Tres grupos de microorganismos en medios de cultivos específicos por cuenta viable en caja petry (Pepper and Gerba, 2015): (a) bacterias heterótrofas en medio agar nutriente (15 g de agar, 3 g de extracto de carne, 5 g de peptona y 8 g de NaCl) (Johnson and Curl, 1972), (b) hongos heterótrofos en medio papa dextrosa agar (15 g de agar, 200 g de papas, 20 g de dextrosa, y 3.5 mL de rosa de bengala fenol) (Johnson and Curl, 1972), y (c) bacterias hidrocarbonoclasticas fueron crecidas en medio de cultivo mineral (20 g de agar, 0.8 g de K_2HPO_2 , 0.2 g de KH_2PO_4 , 0.1 g de KCl, 0.025 g de $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 4.9mL y $Na_2FeEDTA$, 0.2 g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.06 g de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ y 1.0 L de agua) (Rennie, 1981) y 200 μ L of oil.

La cuenta técnica de cuenta viable por dilución seriada se realizó de la siguiente manera; a) Pesar 10 g de muestra (Figura 22a), b) Mezclar muestras (10 g) en 90 mL de agua destilada estéril (Figura 22b). c) Homogenizar mezcla por 10 minutos a 180 rpm (Figura 22c). d) Dilución seriada, toma 1 mL de la mezcla y diluir en 9 mL de agua destilada contenida en tubos de ensayo previamente etiquetados para obtener dilución 10^2 , se repite esto consecutivamente hasta 10^5 (Figura 22d). e) Cada dilución contenida en los tubos de ensayo se agita para homogenizar (Figura 22e). f) Tomar alícuota de 0.1 mL de cada dilución y se inocular sobre el medio de cultivo contenido en la caja Petri, las cajas Petri se etiquetan antes de inocular por dilución (Figura 22f), después se rastrilla la alícuota en la caja Petri tratando de cubrir todo el espacio disponible para esta (Figura 22g). Finalmente, las cajas Petri sembradas se colocaron en bolsas de polietileno y se incubaron a $30^\circ C$ durante 48 hrs. El conteo de colonias viables se realizó en la dilución en donde crecieron entre 30 a 300 unidades formadoras de colobnias (UFC) (Figura 23). La población de cada grupo microbiana se reportó en forma de UFC por gramo de suelos seco, se usó la fórmula siguiente:

$$UFC/g. ss = \frac{UFC \text{ total} \times \text{peso suelo seco}}{\text{peso suelo húmedo}} \dots\dots\dots (2)$$

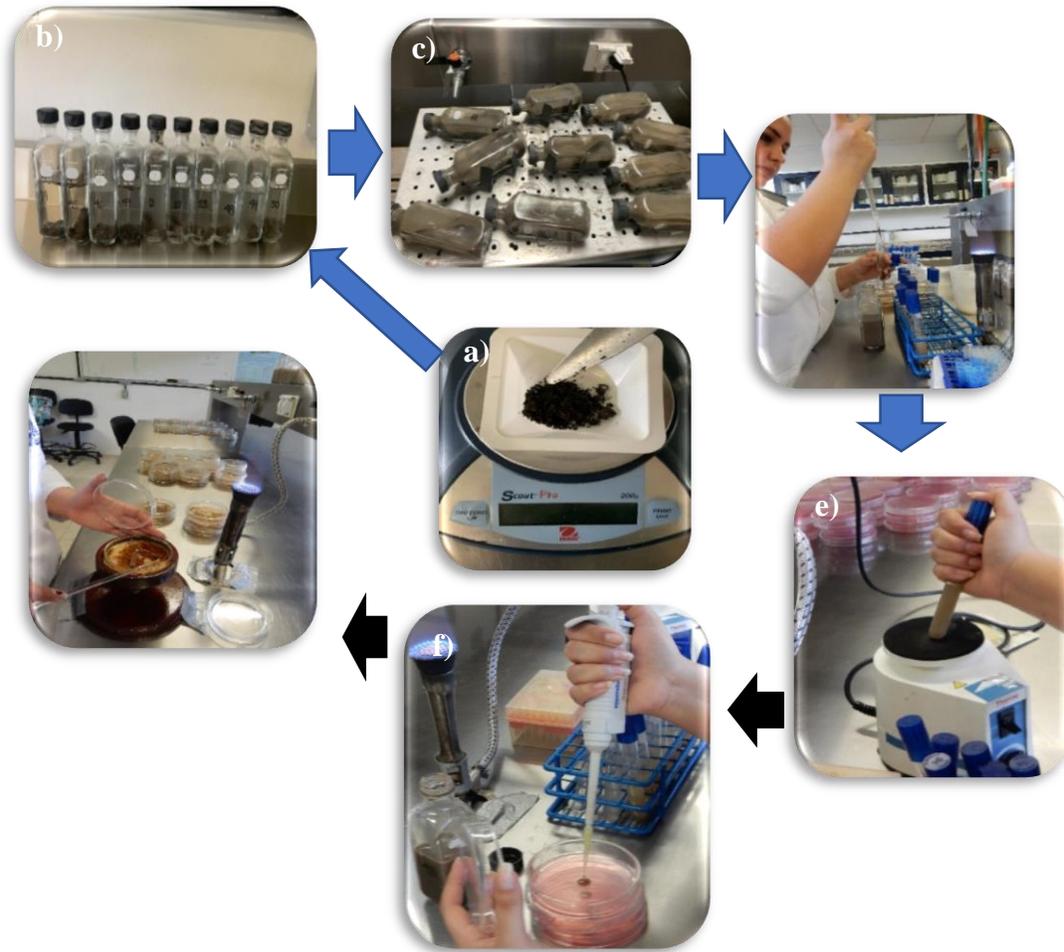


Figura 22. Técnica de cuenta viable por dilución; a) peso de muestra, b) muestra en dilución inicial, c) homogenizar muestra, d) diluciones seriadas en tubos, e) mezcla de diluciones para alícuota, f) alícuota sobre medio de cultivo y g) distribución de alícuota.

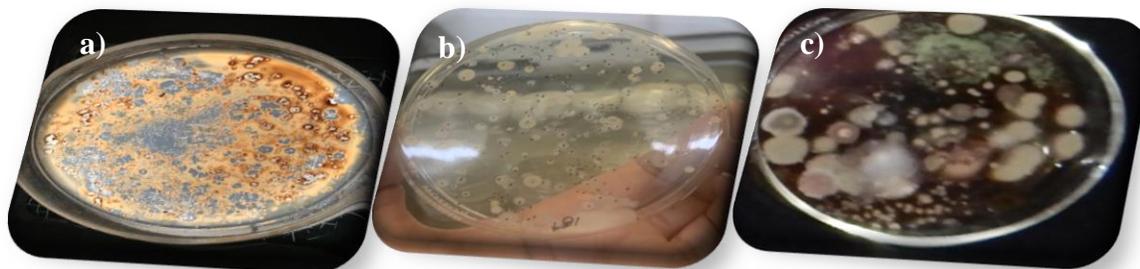


Figura 23. Unidades formadoras de colonias en medios de cultivos: a) bacterias hidrocarbonoclastas medio mineral, b) bacterias heterótrofas en agar nutricional y c) hongos heterótrofos en papa dextrosa agar.

5.4.3.2. Bacterias desnitrificantes

El grupo de bacterias desnitrificantes fue evaluado por la técnica del número más probable (NMP) (Pepper and Gerba 2015). La composición del medio líquido desnitrificante usado en este experimento fue la siguiente: Sodio citrato 5,0; KNO_3 2,0; KH_2PO_4 1,0; $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 1,0; $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 (pH 7,0) (Pei *et al.*, 2010). Los cultivos se incubaron a 30°C durante dos semanas, después de la cual el NO_3^- se probó la remoción y aquellos con crecimiento y producción de gas fueron anotados. Se consideraron los tubos que cumplían con los siguientes criterios (crecimiento, eliminación de nitrato, producción de gas) positivos para la desnitrificación.

La técnica NMP consistió en agregar 9 mL de agua destilada para siembra en tubos Hungate (Figura 24a), b) se esterilizan los tubos en la autoclave a 121°C por 18 minutos (Figura 24b), c) se pesan 10 g de suelo y se agitan con 90 mL de agua destilada por 15 minutos a 180 rpm (Figura 24c), d) se pipetea 1 mL de alícuota de la muestra madre y se deposita en los tubos de dilución (Figura 24d), e) se agitan los tubos de dilución en agitador (Figura 24e), f) de los tubos de dilución se transfiere 1mL de la muestra a los tubos Hungate por cada U.E. se tomaran cinco tubos para la dilución seriada (Figura 24f), g) Los tubos se introducen a incubadora a 35°C por 72 horas (Figura 24g) y h) pasado este tiempo los tubos que presentan burbujas o turbidez se toman como positivos (Figura 24h). La población bacteriana se reportó en forma de UFC por gramo de suelos seco para lo cual se calculó el NMP de la muestra, primero se determinó el número característico, para ello se seleccionó como P1 la dilución más baja en la que todos o el mayor número de tubos resulto positivo; P2 y P3 representan el número de tubos positivos en las siguientes diluciones, después de localiza el numero característico registrado en la tabla NMP, con lo que se obtiene la cantidad de microorganismos

inoculados en la dilución intermedia, para obtener las UFC se multiplica el NMP obtenido en tablas por el recíproco de la dilución media, posteriormente para obtener UFC g⁻¹ s.s. se aplica la siguiente fórmula (Ramírez-Gama *et al.*, 1998) :

$$UFC/g. ss = \frac{UFC \text{ total} \times \text{peso suelo seco}}{\text{peso suelo húmedo}} \dots\dots\dots (3)$$

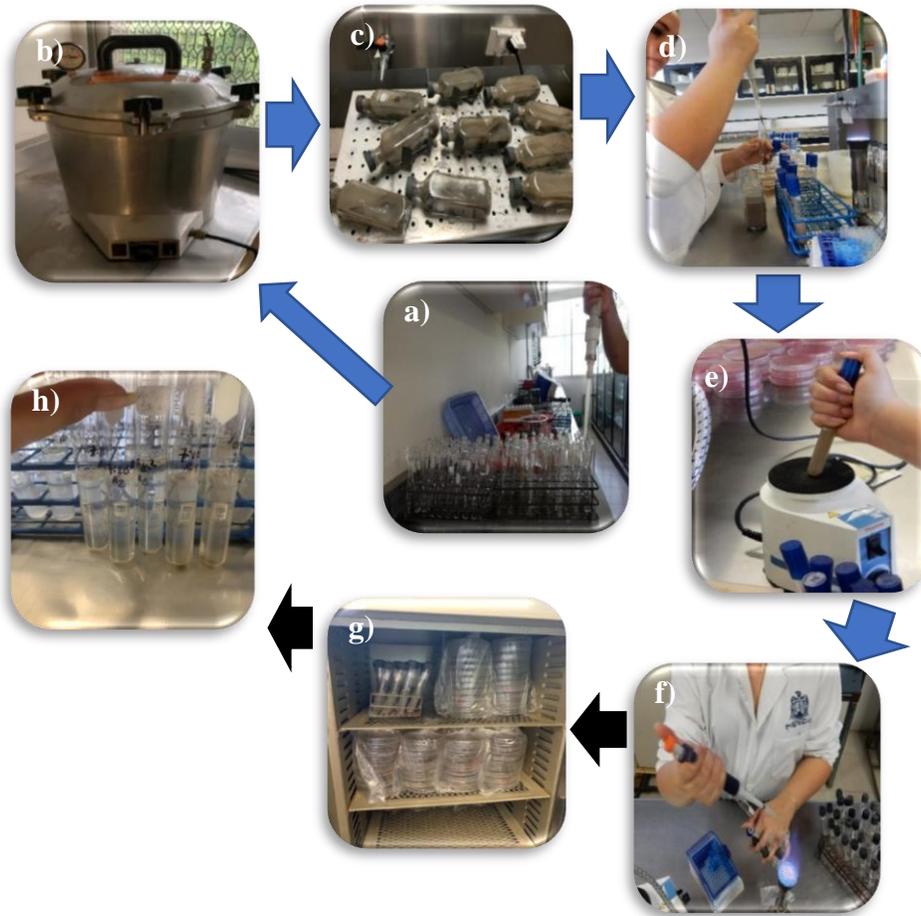


Figura 24. Técnica del número más probable para población de bacterias desnitrificantes: a) preparación de tubos Hungate, b) esterilización, c) mezcla muestra + agua estéril, d) dilución seriada, e) mezcla de diluciones, f) alícuota en medio de cultivo, g) incubación, h) cuenta (positivo y/o negativo observación burbuja de nitrógeno).

5.4.3.3. Microalgas en agua

La técnica para el recuento celular de microalgas en agua superficial por UE fue directo usando una cámara de Neubauer (Arredondo- Vega *et al.*, 2017).

El procedimiento fue el siguiente; a). Toma 10 mL de agua superficie contenida en cada unidad experimental (U.E) (Figura 25a). b) Depositó de muestra en frascos previamente estéril (Figura 25b). c) Se preservaron las muestras en fresco y se trasladaron al laboratorio. d) en el laboratorio, se agita en frasco con la muestra y se procede a succionar una muestra de 10 µL con micropipeta. e) se llena la cámara con el cubreobjetos ya puesto, colocando la punta de la pipeta en la muesca en forma de V que tiene la cámara, cuidando que el volumen depositado sea suficiente para que una parte llegue a los canales laterales, pero sin inundarlos. f) Generalmente se enfoca la cámara con el objetivo 10x (Figura 25c). El registro se hace contando las células que quedan dentro de cada una de las cuadrículas marcadas como L y usando la siguiente fórmula (Arredondo- Vega *et al.*, 2017) (Figura 26).

$$\text{Concentración (Cels/mL)} = \frac{\text{no. de células} \times 10,000}{\text{no. de cuadros contabilizados}} \dots\dots\dots (4)$$



Figura 25. Toma de muestra para microalgas: a) Agua-microalga en UE para colecta de muestra, b) muestra representativa, c) microalgas en el campo de conteo en microscopio (objetivo 10x).

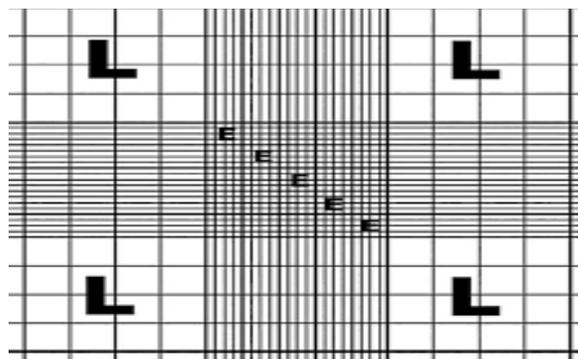


Figura 26. Cuadrículas marcadas con letra L, es donde debe hacerse el conteo de células en la cámara de Neubauer.

5.4.3.3.1. Diversidad de bacterias y hongos heterótrofos y bacterias hidrocarbonoclastas

La diversidad de colonias de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclasticas que crecieron sobre el medio de cultivo se realizó en base a rasgos macroscópico como; color, tamaño, borde y forma (Ramírez-Gama *et al.*, 1998). Las colonias de hongos heterótrofos se caracterizaron por color a los cinco días de crecimiento.

5.4.4. Análisis químicos del suelo y rizosfera

En suelo y rizosfera seca de cada unidad experimental se evaluó el potencial hidrógeno (pH), conductividad eléctrica, Carbono orgánico, Nitrógeno total al día 180, y los hidrocarburos totales del petróleo (día 1 y 180).

El pH se determinó con potenciómetro (Hanna HI 9811-5 portable) relación 1:2 con H₂O; 10 g de suelo y 20 mL de agua (Jackson, 1964). La conductividad eléctrica fue evaluada con un conductímetro (Hanna HI 9811-5 portable), C orgánico oxidable (Walkley y Black, 1934), Ntotal (micro Kjeldhal; Page *et al.*, 1982), usando el extracto de suelo y rizosfera y la siguiente ecuación:

$$N (\%) = \frac{1.401[V_1M_1 - V_2M_2] - (V_3M_1 - V_4M_2)}{P} \times fd \dots\dots\dots (5)$$

Dónde:

V1= mililitros de ácido estándar puesto en matraz receptor para muestras

V2= mililitros de NaOH estándar usado en la titulación

V3= mililitros de ácido estándar puesto en matraz para blanco

V4= mililitros de NaOH estándar usado en la titulación en blanco

M1= Normalidad de ácido estándar

M2= Normalidad de NaOH estándar

P= peso de muestra tomada (1g)

fd= factor de dilución de la muestra

Hidrocarburos totales del petróleo (HTP). La extracción de los HTP se hizo en equipo soxhlet (EPA, 1996), se utilizó el diclorometano con 99.5% de pureza. La cuantificación fue con gravimetría (DOF, 2006). 10 g de suelo húmedo fue transferido al dedal de papel filtro (Figura 27a) y la extracción se realizó por ocho horas (Figura 27b), el sobrenadante se concentró en

matraces. Los matraces junto con el concentrado de petróleo permanecieron por 24 hrs en desecador, pasado este tiempo se pesó el matraz + concentrado (Figura 27c).

La concentración de HTP residual se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\text{HTP (g/kg suelo seco)} = \frac{(\text{HTP}'s \text{ g})(1000 \frac{\text{g}}{\text{kg}})}{ps \text{ g}} \dots\dots\dots (6)$$

Dónde: HTP= (PM + HTP extraídos del suelo) - (PM)

PM= peso del matraz de extracción a peso constante. Ps = peso del suelo de extracción.

La degradación del petróleo (%) se realizó determinado el porcentaje de pérdida de HTP de la rizosfera y suelo al día 180 respecto a los HTP inicial.



Figura 27. Extracción y cuantificación de HTP: a) Muestra de suelo 10 g en dedal, b) extracción de petróleo en Soxhlet y c) peso de petróleo.

5.5. Etapa V. Procesamiento de datos

Los datos de las variables longitud de estolones, tasa de crecimiento relativo y número de plantas al macollo de *L. hexandra* se ordenaron según cuatro concentraciones de petróleo y seis tiempos evaluadas (factorial 4x6). La longitud de raíz, número de raíces, materia seca raíz, aérea obtenida al día 180 según concentraciones de petróleo, y las variables población de bacterias heterótrofas, hidrocarbonoclasticas, desnitrificadoras, hongos heterótrofos y microalgas, degradación, carbono orgánico y N total al día 180 se ordenaron según la integración concentración de petróleo y tecnología (factorial 4x2). Para cada variable se

verificó la prueba de distribución normal y análisis de varianza (ANOVA) y se efectuó la prueba de comparación múltiple de medias para obtener el nivel de significancia entre las interacciones por el método Tukey ($p \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS versión 9.4 (SAS, 2005). La correlación de Pearson se aplicó a los datos de las variables degradación, carbono orgánico, nitrógeno, microbiológicas, plantas en macollo y materia seca radical obtenidos al día 180.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Crecimiento y producción de *Leersia hexandra*

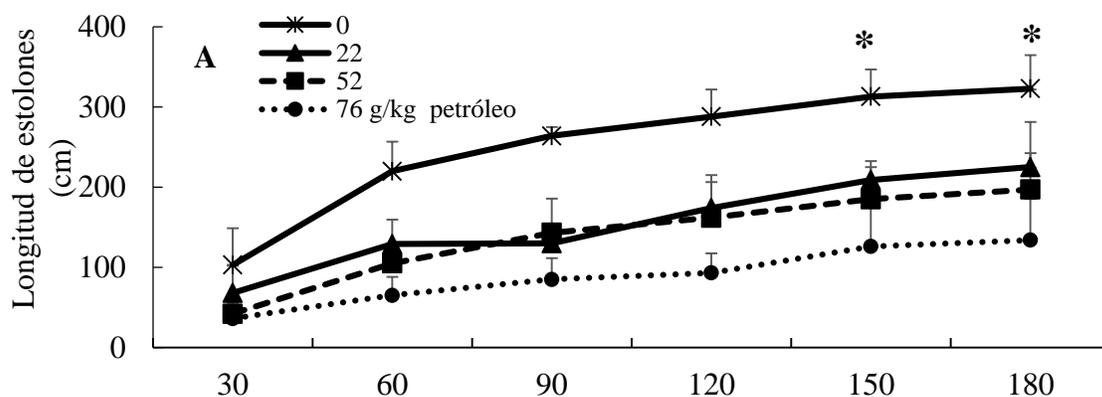
6.1.1. Interacción del petróleo y tiempo de exposición

Los análisis de varianza indican que la interacción en la concentración de petróleo (CP) y tiempo de exposición (TE) provocan diferencias estadísticas significativas para longitud de estolones (LE) (Apéndice, Cuadro 9.2), dándose el valor mas alto (313 y 323 cm) en suelo testigo a los días 150 y 180 de exposición (Figura 30A). La LE determinada al día 30, 60, 90, 120 y 180 de exposición a 22, 52 y 76 g/kg de petróleo fue afectada negativamente, conforme incrementa la concentración de éste, ocurre una disminución en la variable, siendo la mínima de (36 cm) en suelo con concentración de 76 g de petróleo al día 30 (Figura 28A) (Apéndice, Cuadro 9.1). La LE expuesta a 22 g el rango en el tiempo fue 36 a 134 cm, en 52 g (68 a 225 cm) y expuesta a 76 g de petróleo (42 a 197 cm), mientras que la planta sin petróleo fue mayor entre 103 a 323 cm (Figura 28A). El efecto negativo del petróleo entre 30.6 a 58.5% encontrado en esta investigación en la longitud de *Leersia hexandra* ha sido reportado por otros autores (Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Vázquez-Luna *et al.*, 2010; Trujillo-Narcia *et al.*, 2014; Arias-Trinidad *et al.*, 2011), por lo anterior Baker (1970) menciona que el petróleo varia su toxicidad según el contenido de compuestos en cuanto mayor sea la concentración, más tóxico será, provocando daños severos a las plantas como la inhibición de rebrotes, la disminución de la elongación radical y el crecimiento vegetal (Kapustka y Reporte 1998), ya que los hidrocarburos totales del petróleo impiden la absorción del agua y los nutrientes (Quiñones *et al.*, 2003).

En la tasa de crecimiento relativo (TCR) se obtuvieron resultados similares a LE, teniendo que la mayor tasa de crecimiento relativo (4 cm día⁻¹) fue en suelo testigo al día 30 de exposición y la menor (0.2 cm día⁻¹) en suelo con la mayor concentración de petróleo (76 g) a los días 90 y 120 (Figura 28B) (Apéndice, Cuadro 9.5) tal respuesta se debe a que concentraciones bajas de petróleo estimulan el crecimiento vegetativo (Plice, 1948), de igual manera (Zhang *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008, y You *et al.*, 2014) mencionan que *Leersia hexandra* Swartz es un

hidrofíto con una alta capacidad de acumulación y tolerancia para adaptarse e invadir con facilidad ambientes alterados por el hombre (Awah *et al.*, 2012).

En plantas al macollo (PM) se observaron diferencias estadísticas significativas por efecto de la interacción CP*TE (Apéndice, Cuadro 9.4), pero mayor PM (41) en suelo con 52 g de petróleo al día 150, y la menor (3) en 76 g de petróleo al día 30 (Figura 28C) (Apéndice, cuadro 9.3). El rango mayor de PM (4.3 a 41 y 3.3 a 39) en los seis tiempos fue cuando *L. hexandra* estuvo expuesta a 52 y 76 g de petróleo respectivamente, y la menor en suelo sin petróleo que se muestra a través del tiempo entre 6 a 23 nuevas PM (Figura 2B). El efecto positivo del petróleo en la formación de nuevas PM ha sido reportado en *L. hexandra* por González-Moscoso *et al.* (2017) y Orocio-Carrillo *et al.* (2019) aunque autores como Rivera-Cruz *et al.* (2001) reportan respuestas contrarias en el pasto *Echinochloa polystachya*. El efecto positivo del petróleo puede deberse a que *Leersia hexandra* es un pasto adaptado a la contaminación provocada por éstos, a causa de su sistema rizosférico que permite que se desarrollen procesos de degradación y mineralización de moléculas orgánicas para proporcionarle los nutrientes necesarios a su desarrollo y crecimiento (Maldonado-Chávez *et al.*, 2010; Phillips *et al.*, 2012), además de que la respuesta de esta gramínea al estrés al que fue sometido puede deberse a mecanismos de defensa antioxidantes que utiliza para protegerse del daño y poder tener la capacidad de crecer y producir (Orocio-Carrillo *et al.*, 2019).



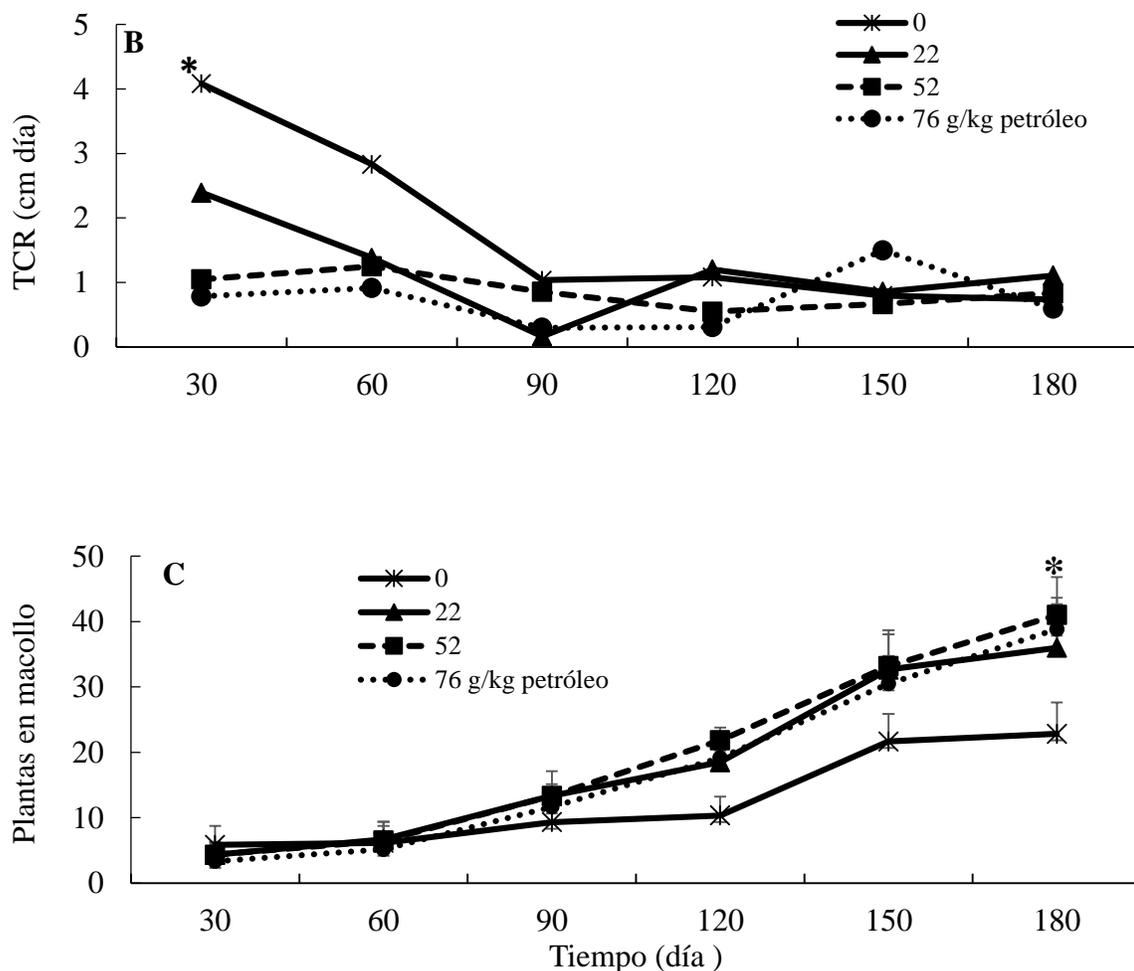


Figura 28. Longitud de estolones (A), Tasa de crecimiento relativo (B) y plantas al macollo (C) de *Leersia hexandra* por efecto de dosis de petróleo en seis tiempos hasta el día 180 después del transplante. *Indica media con mayor nivel de significancia estadística (Tukey; $p < 0,05$; $a < b$; $n = 6$).

6.1.2. Efecto de los factores concentración de petróleo y tiempo de exposición

En el Cuadro 4 se observa una reducción significativa de LE (38 a 64.7%) y de TCR (33 a 58.9%) por efecto de la concentración de petróleo. Contrariamente PM incrementó de manera significativa (27.7 a 35%) con la concentración de petróleo en el suelo, siendo la dosis de 52 g/kg de petróleo el tratamiento que indujo el mayor efecto en esta variable.

En lo que respecta al tiempo de exposición de *L. hexandra* al petróleo fue positivo y significativamente para LE y PM hasta el día 180; sin embargo, la TCR fue afectada de manera negativa. La mayor LE y PM fue de 220 cm y 35 con incrementos de 57.6 a 77% para la primera variable LE y 34 a 90.6% para la segunda variable (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto del petróleo y tiempo de exposición en crecimiento de *Leersia hexandra*

Petróleo	LE	TCR	PM	Efecto (%)		
	(cm)	(cm d ⁻¹)	(Número)	LE	TCR	PM
<u>Concentración (g/kg)</u>						
0	252a	1.8a	13b
22	156b	1.2ab	18ab	-38	-33.3	+27.7
52	139b	.86b	20a	-44.8	-52.2	+35
76	89c	.74b	18ab	-64.7	-58.9	+27.7
<u>Exposición (día)</u>						
30	50d	2a	3.3c
60	118cd	2a	5c	57.6	0	34
90	124c	.58b	12b	59.7	-71	72
120	179b	.78b	17b	72	-61	82
150	208ba	.95b	29ba	76	-52	88.6
180	220a	.82b	35a	77	-59	90.6

LE: Longitud de estolón. TCR: Tasa decrecimiento relativo. PM: Plantas en macollo. Efecto se obtuvo de la media menor por variable multiplicada por 100 y dividida con el valor mayor en cada variable. Valores negativos la variable es afectada y valores positivos la variable se estimula. Letras diferentes por factor indican diferencias estadísticas significativas (Tukey ≤ 0.05 , n= 24).

6.1.3. Efecto del petróleo en raíces

La media de la longitud de raíz primaria (LRP), número raíces secundarias en la base (NRSB) y número de raíces secundarias en la parte media (NRSM) expuesta a 22, 53 y 76 g de petróleo al día 180 fueron estadísticamente iguales al testigo (Cuadro 5) (Apéndice, Cuadro 9.7). Contrario a lo anterior el número de raíces primarias (NRP) y número de raíces secundarias en ápice de raíz primaria (NRSA) de *Leersia hexandra* fueron diferentes estadísticamente por efecto de la dosis de petróleo en el suelo, con una relación directamente proporcional a la concentración de petróleo (Cuadro 5) (Apéndice, Cuadro 9.7). El mayor NRP (203 y 206) fue en planta expuesta a 52 y 76 g/kg petróleo, mientras que la menor (82) en suelo sin petróleo (testigo), los incrementos fueron 59.6 y 60%, respectivamente. El NRSA mayor (20) en el ápice de la raíz primaria fue en 76 g/kg de petróleo, con un incremento de 40% en relación con el suelo sin petróleo. Lo anterior en primer término pudiera deberse a que

el suelo posee altos contenidos de nutrientes incrementando el enraizamiento sobre suelos con petróleo en proceso de fitorremediación (Hou *et al.*, 2001), o por que los pastos crean una rizosfera extendida con tolerancia a los hidrocarburos totales del petróleo (Merkl *et al.*, 2005; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010). Por otro lado, Lynch *et al.* (2002) mencionan que con disponibilidad de agua existe crecimiento en la raíz gracias al incremento de la biosíntesis del ácido abscísico y ácido indolacético que se incrementa por estrés ambiental. Al respecto, Orocio-Carillo *et al.* (2019) encontró que longitud radical a los 180 días es similar estadísticamente al control, resultados similares a los obtenidos en esta investigación. Por otro lado, en número de raíces encontró un efecto estimulador conforme la dosis incrementa, mientras que en raíz secundaria en tercio medio basal estas indujeron una relación dosis-respuesta directamente proporcional a las concentraciones de petróleo, los resultados anteriores son contrarios a los encontrados en esta investigación ya que en tramo tercio basal y medio se encontró estimulación en dosis muy altas.

Cuadro 5. Efecto de la concentración de petróleo en suelo sobre longitud y número de raíz primaria, número de raíz secundaria en tramo basal, medio y ápice después de 180 días de exposición

Petróleo (g/kg)	Raíz primaria		Raíz secundaria (número)		
	Longitud (cm)	Número	Basal	Media	Apical
0	38a	82c	5a	12a	12b
22	40a	179b	3a	10a	12b
52	41a	203a	3a	8a	13b
76	38a	206a	4a	11a	20a
Sin	38A	82B	5A	12A	12A
Con	40A	196A	3A	10A	15A
Media general	39	167	4	10	14
CV (%)	0.03	0.34	0.025	0.16	0.27

En columnas diferentes letras minúsculas similares indican que los valores son estadísticamente iguales (Tukey, ≤ 0.05 , n=6). Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey, ≤ 0.05 , sin petróleo n=6 y con petróleo n=18).

6.1.4. Volumen radical según petróleo

El medio del volumen de raíz muestra diferencias estadísticas significativas por efecto de la concentración del petróleo al día 180 después del transplante (Figura 29A). Los valores de esta variable aumentaron con el incremento de la concentración de petróleo. El mayor volumen (76 cm^3) se formó en plantas que crecieron en suelo con 52 g de petróleo, el incremento fue de 35.3% con respecto a la planta cultivada en suelo testigo (Figura 29B). Resultados similares fueron encontrados por González-Moscoso *et al.* (2017) donde la mayor cantidad de volumen radical se formó en plantas que crecieron en suelo con $90\,000 \text{ mgkg}^{-1}$ de HTP con un incremento de 61.4% respecto al suelo testigo; al respecto, Liu *et al.* (2011) y You *et al.* (2014) indican que posiblemente se debe a que *L. hexandra* es una planta que desarrolla un sistema radical denso en condiciones de estrés. Sin embargo, (García *et al.*, 2013) encontraron resultados diferentes en cuatro gramíneas: *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Chloris gayana* y *Triticum aestivum* ya que el volumen radical al día 56 presentó una reducción significativa debido a la contaminación del suelo.

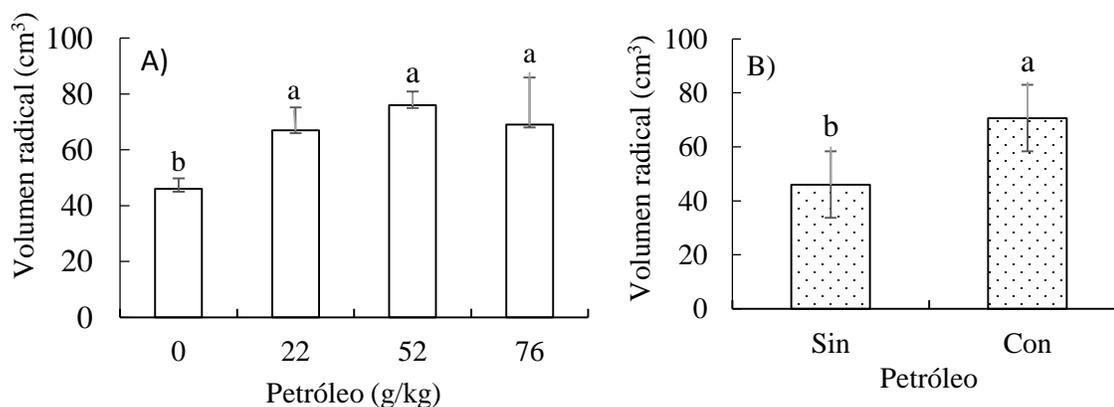


Figura 29. Volumen radical de *Leersia hexandra* (A) según concentraciones de petróleo y (B) sin y con petróleo.

6.2. Producción de *Leersia hexandra*

6.2.1. Materia seca aérea, radical y total según concentración de petróleo

La Figura (30A) muestra que existe diferencias significativas en la materia seca aérea (MSA) y la materia seca radical (MSR) de *Leersia hexandra* por efecto de la concentración de petróleo en el suelo (Apéndice, Cuadro 9.8). La mayor cantidad (15 g) de MSA se encontró en

suelo sin petróleo y la menor 11.8, 12.4 y 11.7 g al exponerse a 22, 52 y 76 g/kg petróleo, resultando un decrecimiento de 21.8, 15 y 22 % respecto al testigo. Estos resultados se comprueban con la relación MSA* concentración de petróleo que negativa y significativa ($r=-450^*$) (Cuadro 10). En contraste los valores de MSR aumentaron con la presencia del petróleo ($r=578^{**}$) (Cuadro 10). La mayor cantidad de MSR (6.3 g) fue en suelo con 52 g de petróleo y la menor (2.0 g) en suelo testigo. La materia seca total (MST) fue menor un 12.6% por efecto del petróleo respecto al testigo (Figura 30B).

Resultados similares obtuvieron González-Moscoso *et al.* (2017), donde el petróleo a diferentes concentraciones provocó un efecto negativo en la materia seca aérea de *L. hexandra*, pero estimuló la materia seca radical y volumen radical. Sin embargo (Ramírez *et al.*, 2018) encontraron que en el día 200 el petróleo promovió la mayor formación de raíz, tallo y hoja en todos los tratamientos, siendo la biomasa radical la que sigue una tendencia gradual directamente proporcional a la cantidad de raíz con el aumento de la dosis de petróleo. Por otro lado, Arias *et al.* (2017) demostraron en *Phaseolus vulgaris* que la biomasa seca total disminuye de manera proporcional según el incremento de las concentraciones de petróleo, y que la biomasa seca aérea y biomasa seca radical fueron las variables más afectadas por la concentración de hidrocarburos totales del petróleo. Por otro lado, Rivera-Cruz *et al.* (2016) encontraron que la materia seca aérea del pasto lambedora a los 12, 24 y 36 meses de exposición disminuye por efecto tóxico del petróleo en el suelo del humedal. Al respecto la disminución de la materia aérea según Al-Yemení *et al.* (2010), es debido a que el petróleo puede afectar la fotosíntesis y el contenido de clorofila en la vegetación, de igual manera este forma una capa cerosa sobre los agregados del suelo y la raíz provocando que los nutrientes en el suelo no puedan ser asimilados por las plantas (Rivera-Cruz *et al.* 2004, Merkl *et al.* 2005).

La mayor MSR de esta gramínea inducida por la presencia del petróleo, según Bona *et al.* (2011) puede ser a que la planta inhibe el crecimiento foliar para aprovechar la mayor cantidad de sus recursos y energía para consolidar la fracción radical. Además, la estimulación de la biomasa radical se debe al estrés inducidos por el anegamiento del suelo provocando la elongación, crecimiento en grosor y formación de raíces adventicias las cuales pueden favorecer la salida del etileno acumulado en los tejidos y favorecer la absorción de oxígeno (Pardos 2004).

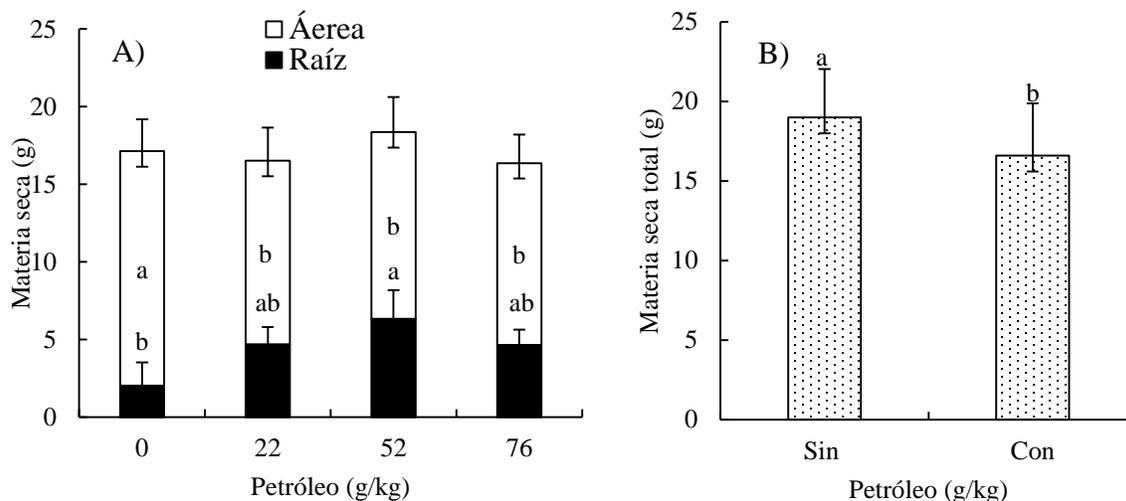


Figura 30. Materia seca de *L. hexandra* al día 180 de exposición a petróleo. (A) Materia seca aérea y raíz en suelo con diferentes concentraciones de petróleo. (B) materia seca total en suelo sin y con petróleo.

6.3. Efecto del petróleo en bacterias, hongos y microalgas asociados a la atenuación natural y fitorremediación

Las poblaciones de los tres grupos de bacterias, hongos y microalgas tuvieron diferencias estadísticas significativas al día 180 por efecto de la interacción concentración de petróleo, y tecnologías biológicas de fitorremediación (FR) y atenuación natural (AN) (Cuadro 7) (Apéndice, Cuadro 9.10).

En lo que respecta al grupo de bacterias, las poblaciones de bacterias heterótrofas (BH) fueron mayores al aplicar FR (38×10^5 UFC g^{-1} s.s.) en suelo testigo, pero en suelo con 22 g/kg de petróleo las mayores poblaciones de BH se dieron en AN (31×10^5 UFC g^{-1} s.s.) y las menores (2×10^5 UFC g^{-1} s.s.) en AN sin petróleo. Resultados similares se dieron en bacterias hidrocarbonoclastas (BHCT) donde las mayores poblaciones fueron en FR (363 y 247×10^3 UFC g^{-1} s.s.) en suelo testigo y en 52 g/kg de petróleo, contrariamente las menores poblaciones se dieron en AN (27 , 19 , 10 , y 8×10^3 UFC g^{-1} s.s.) en concentraciones de 0, 22, 52, y 76 g/kg de petróleo respectivamente.

El incremento de BH y BHCT en la rizosfera de *L. hexandra* puede estar condicionadas por la presencia de la raíz en el suelo, ellas inducen cambios físicos y químicos en el suelo favorables para las bacterias diazotroficas (Porta et al., 2003). Similares resultados reportan

Glick (1995); Lynch *et al.* (2002) e indican que la población de bacterias por gramo de suelo que se halla alrededor de las raíces de las plantas (rizosfera) es mayor que en suelo a distancia, debido a los altos niveles de nutrientes que hay en la zona que rodea a las raíces provocando su rápido crecimiento y disponibilidad para utilizar un amplio rango de sustratos como fuente de carbono y nitrógeno.

Las mayores poblaciones de bacterias desnitrificantes fueron en suelo inundado en donde se aplicó FR (221×10^2 UFC g^{-1} s.s.) en la concentración más alta (76 g/kg) de petróleo, y la menor en suelo contaminado con 22 y 52 g de petróleo tratado con AN. Al respecto las poblaciones de bacterias desnitrificantes en la rizosfera ha sido reportado por Rösh *et al.* (2002) y, ellas se hospedan en la rizosfera posiblemente por las siguientes condiciones; contenidos ricos de N total en el suelo el cual se cumple en los suelos usado en esta investigación (Cuadro 9) y las advecciones de oxígeno y nutrientes entre la superficie de la raíz y el agua subterránea dan como resultado el área oxidada/anóxica en la interfase humedal-sedimento de la zona hiporreica. Y procesos antagónicos, es decir, nitrificación y desnitrificación, pueden ocurrir simultáneamente en las interfaces donde el oxígeno fluctúa frecuentemente (Pei *et al.*, 2010). La nitrificación y desnitrificación son la pérdida biológica para el nitrógeno fijado en el humedal. En consecuencia, la interfaz es un sitio activo de transformación biogeoquímicas que mejora el ciclo del nitrógeno en los sistemas acuáticos que regula el flujo de nutrientes entre ecosistemas (McClain *et al.*, 2003; Kjellin *et al.*, 2007).

Las mayores poblaciones de hongos heterótrofos (HH) (120×10^2 UFC g^{-1} s.s) se establecieron en suelo con 76 g/kg de petróleo en donde se aplicó AN y las menores poblaciones (6×10^2 UFC g^{-1} s.s) en AN y FR en suelo testigo y con 22 g/kg de petróleo. Sobresale en esta investigación que las poblaciones de HH se aumenta al incrementar la concentración de petróleo en el suelo con AN, pero no le favorece la rizosfera de *L. hexandra* usada para fitorremediar. En los tratamientos con AN el petróleo induce un efecto hormésis en las poblaciones de HH al incrementar un 40, 78.6 y 95% expuesta al día 180 a 22, 52 y 76 g/kg de petróleo respecto al testigo (Cuadro 7). Este comportamiento posiblemente se debe a que los HH encuentran en el suelo sin raíz los materiales orgánicos preformados como esqueletos carbonatados para la síntesis celular y sustratos carbonatados que varían desde los hidratos de carbono, alcoholes y ácidos orgánicos sencillos hasta los compuestos

polimerizados, los cuales utilizan como fuente de energía (Pascual y Calderón 2000). Así mismo Julca *et al.* (2006) informan que la gran mayoría de HH son saprofitos comunes del suelo, eficaces transformadores de sustratos edáficos en alimento.

Las poblaciones mayores de microalgas (88×10^4 UFC mL⁻¹) fue en suelo con 76 g/kg de petróleo tratado con AN, y la menor (7×10^4 UFC mL⁻¹) en suelo testigo con AN y FR. Sobresale en esta investigación que las poblaciones de microalgas incrementan al incrementar la concentración de petróleo tanto en los suelos tratados con AN como FR (Cuadro 7), el modelo reporta una correlación de Pearson altamente significativa y positiva entre MAL*PE ($r=.846^{**}$) (Cuadro 9).

El efecto positivo del petróleo en las poblaciones de microalgas en el agua contenida en el humedal artificial y tratado con AN y FR muestran relaciones hormesis. Al respecto los incrementos respecto al testigo de las poblaciones de microalgas por las concentraciones de 22, 52 y 76 g de petróleo en AN fueron 80, 82 y 92 %, y en FR 80, 84 y 85%, respectivamente. Esta respuesta indica que las microalgas tienen aplicación en pruebas de toxicidad característica que ha sido reportada por Ferrera-Cerrato *et al.* (2006); además las condiciones de anegamiento inducidas de manera artificial en esta investigación favorecieron su establecimiento debido a su habilidad para crecer con la cantidad de oxígeno disuelto en el agua y en los poros del suelo (León 1991).

El efecto de la AN y FR en las poblaciones de cada uno de los cinco grupos de microorganismos evaluados en esta investigación es estadísticas diferente y significativo (Tukey $p \leq 0.05$) (Figura 33). Sobresale un incremento de 18, 94 y 79% para BH, BHCT y desnitrificantes en suelos tratados con FR, mientras que las poblaciones de HH y microalgas incrementan 85 y 22% en suelos tratados con AN. Similares resultados reportan González-Moscoso *et al.* (2019) en las poblaciones de BH con 19 y 12×10^2 UFC r.s. de *L. hexandra* en suelos con 26 y 76 g/kg de petróleo tratados con FR; sin embargo, las BHCT son iguales en suelo con FR y AN.

Cuadro 6. Microorganismos en suelo inundado con petróleo tratado con atenuación natural y fitorremediación con *Leersia hexandra*

Microorganismo	Atenuación natural				Fitorremediación			
	Petróleo (g/kg)							
	0	22	52	76	0	22	52	76
B. Heterótrofas (10^5 UFCg ⁻¹)	2d	31ab	20c	15c	38a	16c	22bc	16c
B. Hidrocarbonoclasticas (10^3 UFC g ⁻¹)	27d	19d	10d	8d	363a	191c	247b	166c
B. Desnitrificantes (10^2 UFCg ⁻¹)	7cd	.9d	.8d	61b	5d	48b	28c	221a
Hongos heterótrofos (10^2 UFC g ⁻¹)	6b	10b	28b	120a	48b	6b	11b	7b
Microalgas (10^4 UFCmL ⁻¹)	7e	35d	40cd	88a	7e	36cd	43bc	48b

Letras diferentes por hileras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=12$)

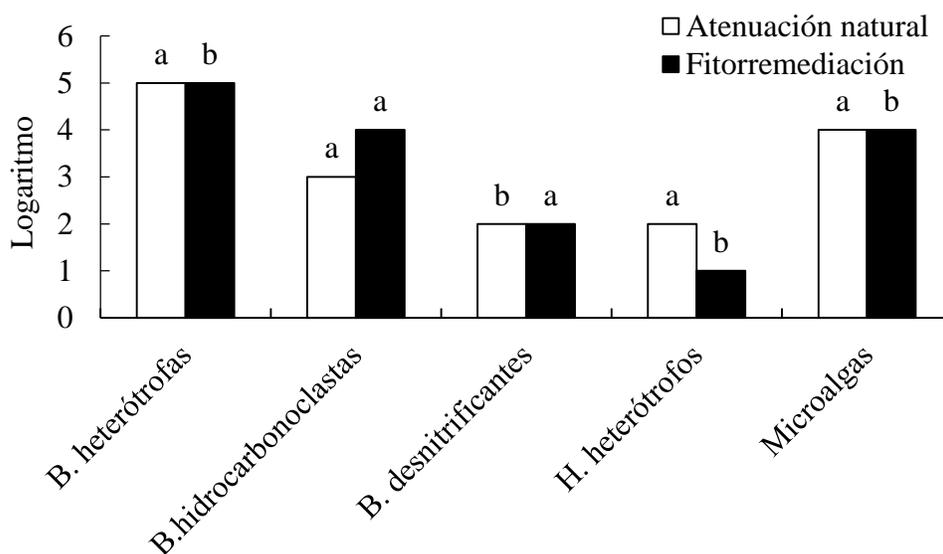


Figura 31. Microorganismos en suelo con petróleo tratados con atenuación natural y fitorremediación usando *Leersia hexandra*, al día 180.

6.3.1. Población de bacterias en suelo con petróleo tratado con atenuación natural y fitorremediación

En el aislamiento de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclasticas según morfología colonial en placa de agar se obtuvo diferente diversidad. Bacterias heterótrofas se obtuvieron siete aislados en suelo con 0, 22 y 52 g de petróleo y sometido a fitorremediación con un incremento de 1.16 veces respecto a las obtenidas en atenuación natural (Cuadro 7). La diversidad mayor (6) de aislados de colonias del grupo hidrocarbonoclastas fue en suelo con 52 g/kg de petróleo sometido a fitorremediación, y la menor diversidad entre 3 y 4 se obtuvo

en suelo sometido a la atenuación natural. La fitoremediación estimula 1.5 y 1.3 en suelo con 52 y 76 g de petróleo, respectivamente, la diversidad de bacterias hidrocarbonoclastas (Cuadro 7). Así mismo, las bacterias hidrocarbonoclasticas se incrementan 13% en suelo con petróleo después de la aplicación de atenuación natural y fitorremediación, posiblemente los hidrocarburos en el suelo presentaban mayor disponibilidad para usarse como fuente de carbono y energía, permitiendo el establecimiento de bacterias poseen enzimas capaces de adicionar grupos funcionales al esqueleto de carbono y polarizando las moléculas de hidrocarburos (Rojo, 2009), esta degradación se puede desarrollar de forma aerobia y anaerobia, siendo esta última menos frecuente (Wentzel *et al.*, 2007).

Cuadro 7. Características fenotípicas de los aislados de bacterias heterótrofas e hidrocarbonoclastas a partir del suelo con atenuación natural y fitorremediación

Bacterias/petróleo (g/kg)	Fitorremediación (FT)	Atenuación Natural (AN)	FT/AN	Características macroscópicas
	Aislado			
<u>Heterótrofas</u>				
0	1,2,3,4,5,6,7	1,2,3,4,5,6	1.16	Siete aislamientos. Colonias blancas amarillas y café, Bordes: entero, ondulado, crenado y lobulado. Formas: circular, puntiforme, amiboide y rizoide. Tamaños (0.1, 0.2, 0.4, 0.5, 0.7, 1, 1.5, 2, 5 mm).
22	1,2,3,4,5,6,7	1,2,3,4,5,6	1.16	
52	1,2,3,4,5,6,7	1,2,3,4,5,6	1.16	
76	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4,5,6	1	
<u>Petróleo</u>				
Sin	7	6	1.6	
Con	6.6	6	1.1	
<u>Hidrocarbonoclastas</u>				
0	1,2,3,4	1,2,3	1.3	Seis aislamientos. Colonias blancas. Bordes: entero y ondulado. Formas: Amiboide, circular y puntiforme. Tamaños (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.7, 1 mm).
22	1,2,3,4	1,2,3,4	1	
52	1,2,3,4,5,6	1,2,3,4	1.5	
76	1,2,3,4	1,2,3	1.3	
<u>Petróleo</u>				
Sin	4	3	1.3	
Con	4.6	3.6	1.27	

6.4. Carbono y nitrógeno según concentración de petróleo

Carbono orgánico, nitrógeno total y la relación COS/N tuvieron diferencias estadísticas significativas al día 180 por efecto de la concentración de petróleo y el uso de tecnologías biológicas de AN y FR (Cuadro 8) (Apéndice, Cuadro 9.12).

El mayor contenido de COS (7.3 y 7.7%) se obtuvo en los tratamientos con 76 g/kg petróleo + AN y 52 g + FR, respectivamente, y el menor contenido (5 y 4.8%) en suelo testigo + AN y testigo + FR. Esto indica que el petróleo induce el incremento en la fertilidad del suelo según la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002) por encontrarse los suelos testigos y concentración de 22 g + AN en el rango bajo (4.1 a 6%) y medio (6.1-10.9%) para suelos contaminados (cinco tratamientos) (Cuadro 8). El incremento de la fertilidad en el suelo por efecto del petróleo según el contenido de COS debe ser monitoreado para recomendar su uso con fines agrícolas, debido a que este COS al ser derivado del petróleo es rico en hidrocarburos aromáticos policíclicos, asfaltenos y resinas, y ellos son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos para los seres vivos (Paris, 2008).

El incremento del COS acumulado en el suelo al día 180 por efecto de la aplicación de la tecnología fue; entre 10.7 a 31.4% por AN, y por FR entre 28 a 37.7%. Esto demuestra que la fitorremediación con *L. hexandra* induce la mayor acumulación de COS en suelo rizosférico con petróleo, pero menor degradación de HTP, al parecer la rizosfera estabiliza el carbono en el suelo. El Ntotal en los suelos sin y contaminado con 22, 52 y 76 g/kg de petróleo asociados a la AN y FR es fértil, clasificado como rico según Rodríguez y Rodríguez (2011) por encontrarse en valores superiores a > 0.250 . Los valores estuvieron en el rango de 1.3 a 1.7 %, siendo mayor 1.7% en suelo testigo con AN y los menores (1.3 y 1.4 %) en suelo con 52 g de petróleo con AN y FR (Cuadro 8).

La relación COS/Nt fue muy alta en suelos conteniendo 52 y 76 g/kg de petróleo asistidos con AN y FR, esto muestra que existe dificultad para mineralizar el nitrógeno total (Cuadro 8). Al respecto, Porta *et al.* (2003) y Pardo-Castro *et al.* (2004) indican que en suelos con alta relación nitrógeno (C/N) las tasas de mineralización son bajas, y cuando estas relaciones son bajas las tasas de mineralización son altas.

El efecto de la tecnología aplicada al humedal permitió al día 180 la acumulación de carbono orgánico en el suelo diferente, pero el Ntotal y relación COS/Nt fue igual en los dos sistemas del tratamiento. (Figura 32). El COS fue 8.15% mayor en suelo sometido a FR con *L. hexandra*, el Ntotal solo 3.29% fue mayor en suelo fitorremediado respecto al suelo con atenuación natural, sin embargo, la relación COS/Nt fue igual.

Cuadro 8. Estimulación de la tecnología en el carbono orgánico y nitrógeno en suelo con petróleo fresco, al día 180

Variable	Atenuación natural				Fitorremediación			
	Petróleo (g/kg)							
	0	22	52	76	0	22	52	76
Carbono orgánico (%)	5d	5.6d	6bc	7.3a	4.8d	6.7ab	7.7a	6.8ab
N total (%)	1.7a	1.5ab	1.3b	1.4b	1.6ab	1.5ab	1.4b	1.6ab
COS/Ntotal	3.2d	3.7cd	4.5abc	5.3ab	2.8d	3.7cd	5.5a	4.4bc

Letras diferentes por hileras indican diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=6$)

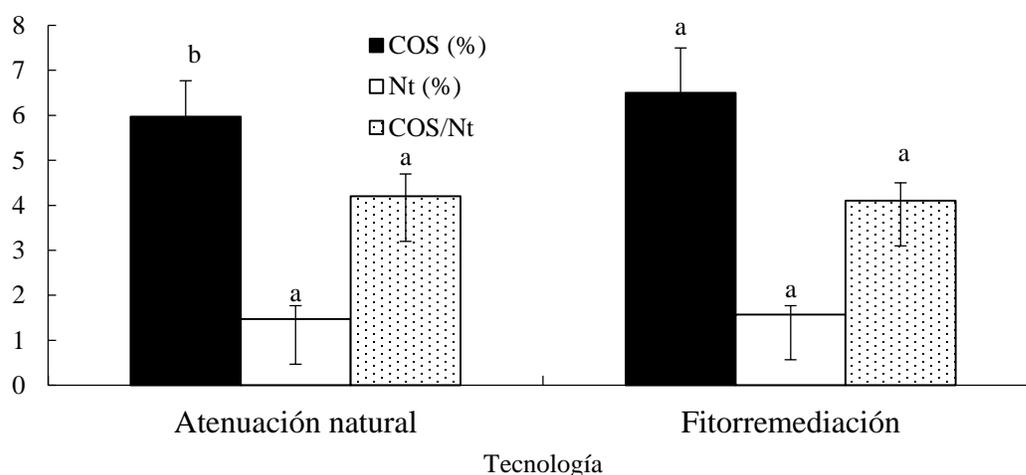


Figura 32. Carbono orgánico, nitrógeno total y relación carbono nitrógeno en suelo asistido con tecnología de atenuación natural y fitorremediación con *L. hexandra* al día 180. Letras diferentes por parámetro indica diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=16$).

6.5. Degradación de petróleo

Los valores medios del porcentaje de la degradación de HTP al día 180 presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto de la interacción concentración de petróleo y la tecnología aplicada (Tukey $p \leq 0.05$) (Figura 32), (Apéndice, Cuadro 9.12). El mayor porcentaje de degradación fue 80 y 85% en suelo con 22 y 52 g de petróleo al usar AN, y los valores bajos (24, 27 y 31 %) fueron en suelos con 22, 52 y 76 g/kg sometidos a FR (Figura 33).

Sobresale en los resultados que la tecnología de AN en suelos inundados de manera permanente y contaminados con 22, 52 y 76 g/kg de petróleo son altos e incrementan 3, 3.1 y 1.96 veces respecto a la FR usando *L. hexandra*. Similares resultados fueron obtenidos por Gómez *et al.* (2009) en la AN de un suelo con gasolina-diesel, y Orocio-Carillo *et al.* (2019) en AN de suelo con 7.9 y 54 g/kg de petróleo que alcanzó a los 180 días remover un 81 y 89.9% de HTP. Al respecto, Adams *et al.* (1997) informa que existe una restauración pasiva muy rápida en zonas inundables, pantanos y manglares tropicales. Esto se debe según Corona-Ramírez e Iturbide-Argüelles (2005) a la disponibilidad inmediata del carbono derivado del petróleo para los microorganismos y el oxígeno disuelto lo que les permite degradar el hidrocarburo, mientras que, en la rizosfera, los microorganismos tienen dos fuentes de carbono, exudados radicales e hidrocarburos del petróleo. Al respecto, Atlas y Bartha (2001) indica que cuando existe en el microbiona dos fuentes de carbono los microorganismos usan una fuente y oxidan la otra, pero no la utilizan en su metabolismo celular, establecen el proceso cometabólico. Otro factor que posiblemente afectó la degradación de los HTP en suelos anóxicos estimulados por rizosfera de *L. hexandra* son los macroagregados que se producen mediante la acción de las raíces e hifas de hongos, que actúan como agentes aglutinantes necesarios entre partículas orgánicas e inorgánicas separadas por mayor distancia o poros (Six *et al.*, 2004).

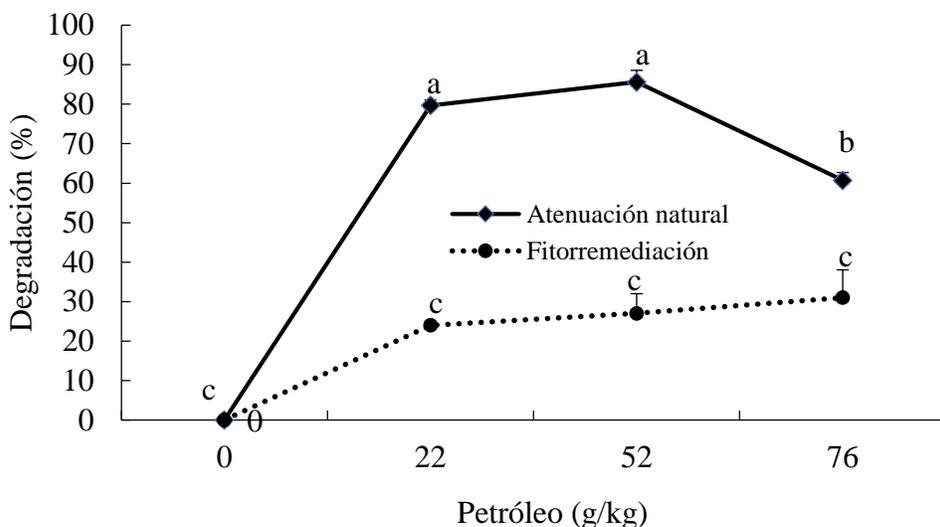


Figura 33. Degradación de hidrocarburos totales del petróleo en suelo con petróleo según tecnología biológica.

6.5.1. Relación degradación y mineralización de nitrógeno

La mayor degradación de HTP (56.4%) y mineralización de N (5) fue en suelo que contenía 52 g de petróleo, y la menor mineralización de N (3) en suelo testigo (Figura 34, Cuadro 9). En este estudio se encontró una relación positiva significativa entre $DEG * COS / N_t$ (0.324*) (Cuadro 10), esto muestra que, aunque sucedió la degradación del carbono, el COS es alto y el N_{total} no se mineraliza. Estos resultados informan que sucedió la degradación de petróleo, pero el COS y el N_t en el suelo de origen biogénico y petrolífero posiblemente se acumuló en estructuras que impiden que las enzimas sean capaces de identificar las sustancias macromoléculas (Almendros, 2003), además se forman complejos polifenol-proteína que protegen al N proteico de la acción microbiana (Duchaufour, 2001).

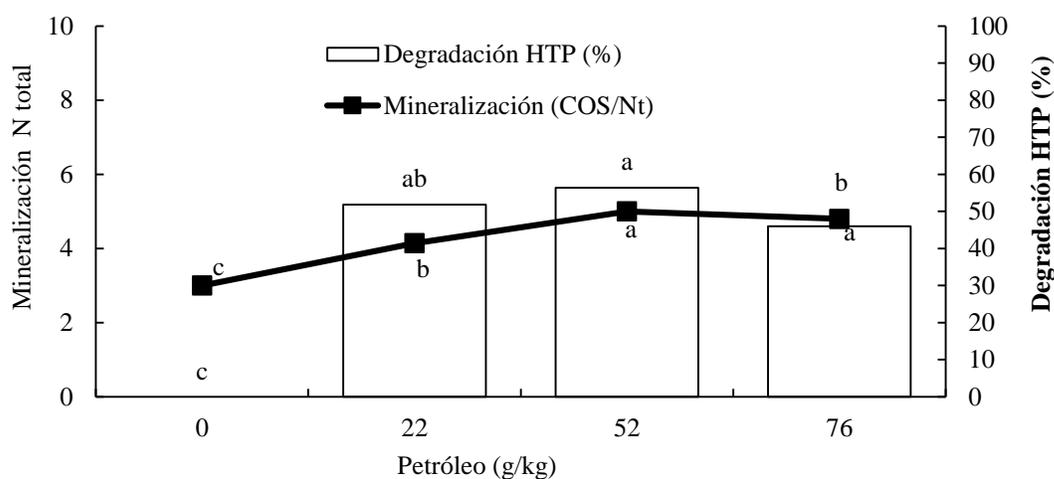


Figura 34. Mineralización de N y degradación de petróleo.

6.5.2. Degradación respecto a tecnología, propiedades químicas y actividad microbiana

La degradación de los HTP en suelo del humedal artificial resultó afectada de manera directa con relación positiva significativa por la concentración de petróleo crudo (PE) ($r=.482^{**}$), mineralización del N (COS/Nt) ($r=.314^{*}$), población de HH (.287*) y población de MAL ($r=.564^{**}$). Los hongos y microalgas prefieren ambientes húmedos y con altos contenidos de carbono orgánico. Por lo tanto la presencia de la microalgas permite suponer que desempeñaron una función importante en la recuperación del suelo contaminado bajo condiciones anaeróbicas, lo que corrobora lo que informan Chojnacka y Noworyta (2003) y Hu *et al* (2012); las microalgas son asimiladoras de compuestos orgánicos a través de la respiración aeróbica, el cual depende de la disponibilidad de carbono orgánico en el agua y sedimento de ecosistemas acuáticos, y ellas producen algunas enzimas capaces de transformar hidrocarburos en compuestos menos tóxicos (Salcedo-Martinez *et al.*, 2019), sin embargo alterno a esta situación se obtuvo relaciones negativas de la degradación de HTP con la tecnología utilizada ($r=-.562^{**}$), el Nt ($r=-.308^{*}$), BHC ($r=-.611^{**}$), PM ($r=-.457^{**}$) y MSR ($r=-.403^{**}$). Estas relaciones negativas permiten inferir que la fitorremediación de suelo con petróleo que permanecen en condiciones anaeróbicas, aunque es menos eficiente en la degradación de contaminantes, es una alternativa que fortalece al humedal debido a que acumula materia aérea que puede servir para alimentar a los animales de pastoreo entre estos; bovinos y ovino (Cuadro 9).

Cuadro 9. Correlación de variables

	DEG	COS	Nt	COS/N	BHC	BDEs	HH	MAL	PM	MSR
PE	.482**	.626**	-.310*	.609**	-.245	.610**	.391*	.846**	.158	.202
TEC	-.562**	.215	.151	.065	.861**	.413**	-.312*	-.188	.942**	.850**
DEG	1	.240	-.308*	.314*	-.611**	-.094	.287*	.564**	-.457**	-.403**
COS		1	-.263	.844**	.010	.310*	.325*	.630**	.362**	.416**
Nt			1	-.716**	.228	.006	-.207	-.275	-.041	-.003
COS/N				1	-.106	.205	-.106	.588**	.216	.302*
BHC					1	.116	-.288*	-.381**	.739**	.639**
BDEs						1	.021	.335	.494**	.420**
HH							1	1	-.285*	-.266
MAL									1	-.059
PM										1
MSR										

PE: Concentración de petróleo. TEC. Tecnología. DEG: Degradación, COS: Carbono orgánico, Nt: Nitrógeno total, BHC: Bacterias hidrocarbonoclastas, BDEs: Bacterias desnitrificadoras, HHT: Hongos heterótrofos. MAL: Microalgas. PM: Plantas al macollo y MSR: materia seca raíz. *,**. Significativo y altamente significativo.

CONCLUSIONES

7.1. Conclusión general

La tecnología de atenuación natural aplicada a suelos arcillosos contaminados con petróleo bajo condiciones de inundación permanente tiene mayor potencial que la fitorremediación usando el pasto *L. hexandra* para recuperar la sustentabilidad de humedales tropicales impactados por la industria petrolera en el trópico húmedo mexicano; esto por lograr al día 180 degradar un 85% de hidrocarburos totales del petróleo, acumular en suelo menor cantidad de carbono orgánico, y establecer una relación positiva entre degradación de HTP con hongos heterótrofos y microalgas.

7.1.1. Conclusiones particulares

1. *L. hexandra* es un pasto que se adapta a suelos arcillosos con inundación permanente que contienen entre 22 a 76 g de petróleo, debido al incremento de plantas en macollo, biomasa de raíz, número de raíces primarias y raíces secundaria en el ápice, pero la producción total de materia seca disminuye un 12.6% en suelo con petróleo.
2. La atenuación natural y el petróleo indujeron una mayor población de hongos heterótrofos y microalgas, menor contenido de carbono orgánico en el suelo, pero la fitorremediación estimulo la producción de materia aérea y raíz, la población de bacterias heterótrofas, hidrocarbonoclasticas y desnitrificadoras.
3. La atenuación natural al día 180 respecto a la fitorremediación indujo una mayor degradación de hidrocarburos totales del petróleo y se relaciona de manera positiva con la mineralización del N_{total} , hongos heterótrofos y microalgas en el suelo arcillo con inundación artificial.

LITERATURA CITADA

- Adams, R. y A. Rodríguez. 1997. Evaluación comparativa de productos para la biorremediación de sitios impactados por hidrocarburos de petróleo en el trópico húmedo. IV Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente. RICA/Univ. Simón Bolívar. Caracas, Venezuela.
- Adams. R.H., A.L. Álvarez-Ovando., y G. Castañon N. 2015. Effect of hydrocarbon concentration of pasture production (*Bracharia humidicola*) in Texistepec, Veracruz. *Phyton International Journal of Experimental Botany*. 84(1): 222-232. <http://ppct.caicyt.gov.ar/index.php/phyton/article/view/8131>.
- Aisien F.A., E.I. Aisien., y I. O. Oboh. 2015. Phytoremediation of petroleum-polluted soils. In: Ansari. A.A., S.S. Gill., G.R. Lanza., y L. Newman. (eds). Phytoremediation Management of Environmental contaminants. *Springer*. New York. 243p.
- Aleer. S., Adetutu. M.E., Makadia. H.T., Patil. S., Ball. S.A. 2011. Harnessing the hydrocarbondegrading potential of contaminated soils for the bioremediation of waste engine oil. *Water Air Soil Pollution*, 218: 121-130. <https://doi.org/10.1007/s11270-010-0628->
- Alegría-Hernández. B. A., S.A. Torres-Sánchez., y J. Chávez M. 2019. Evaluación de los cambios en las concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo en dos tipos de suelos. *Journal of Energy, Engineering optimization and Sustainability*. 3(2):19-32. <https://doi.org/10.19136/Jeeos.a3n2.3406>.
- Almendro G. Dorado. Gonzalez-Villa. F.J., Blanco. M.J. y Lankes. U. 2000. CNMR assessment of decomposition patterns during compositing of forest and shrub biomass. *Soil Biol. Biochem*. 32:793-804. [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(99\)00202-3](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(99)00202-3).
- Alexander M. 1995. Introducción a la microbiología del suelo. AGT editor S.A. México D.F. 491 p.
- Ali. H., Khan. E., y Sajad. M.A. 2013. Phytoremediation of heavy metals: concepts and applications. *Chemosphere*. 91: 869-888. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.01.075>.
- Almeida, R.M., Reis, I., Couto, N.M., Bordalo, A.A. y Mucha, P.A., 2012. Potential of the

- Microbial community present in an unimpacted beach sediment to remediate petroleum Hydrocarbons. *Environmental Science and Pollution Research*, 20: 3176-3184. <https://doi.org/10.1007/s11356-012-1240-2>.
- Al-Sarawi M., y Massoud M.S. 1998. Preliminary assessment oil contamination levels in soils contaminated with oil lakes in the greater Burgan oil fields, Kuwait. *Water, Air, Soil Pollut.* 106: 493-504. <https://doi.org/10.1023/A:1005073031798>.
- Al-Yemeni, M.N., Siddiqui, M.H. y Wijaya, L.F. 2010. Effect of petroleum polluted soil on the performance of *Phaseolus vulgaris* L. *American-Eurasian. J. Agric. Environ. Sci.* 7(4): 427-432. [http://www.idosi.org/aejaes/jaes7\(4\)/8.pdf](http://www.idosi.org/aejaes/jaes7(4)/8.pdf).
- Arredondo. V.B.O y Voltolina D. 2006. Concentración, recuento celular y tasa decrecimiento. En: Arredondo-Vega B.O y Voltolina D (eds). *Métodos y Herramientas Analíticas en la Evaluación de la Biomasa Microalgal*. Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz. BCS. México pp: 21-29 pp.
- Arias-Trinidad. A., Rivera-Cruz. M.C., Aceves-Navarro. L.A., y Quintero-Lizaola. R. 2012. Pasto Japonesa (*Leersia* sp) como especie fitorremediadora en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. EN: XXXVII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Zacatecas, Zacatecas. pp 55-62.
- Arias-Trinidad. A., Rivera-Cruz. M.C., y Trujillo-Narcía. A. 2017. Fitotoxicidad de un suelo contaminado con petróleo fresco sobre *Phaseolus vulgaris* L. (leguminosae). *Revista internacional de contaminación ambiental*, 33(3), 411-419. <https://doi.org/10.20937/rica.2017.33.03.05>.
- Atkins P., y L. Jones. 2006. *Principios de química: los caminos del descubrimiento*. 3ª ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 992 p.
- Atlas R. M., y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y microbiológica ambiental*. Pearson Education. Madrid, España. 696 p.
- Awah T.M., D. Kuitcha., A. Magh a J. Njama., y B.V. K, Kabeyene. 2012. Occurrence of macrophytes in the Mezam river system in Bamenda (Cameroon) and their role in nutrient retention. *Syllabus Review, Science Series.* 3: 1-10. https://ens.cm/files/syllabus_sciences/SyllabusScienceVol3_2012_1_10.pdf.

- Azubuiké. C.C., Chikere. C.B., and Okpokwasili. G.C., 2016. Bioremediation techniques-classification based on site of application: principles, advantages, limitations and prospects. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 32 (11), 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11274-016-2137-x>.
- Baker, J. M. 1970. The effects of oils on plants. *Environmental Pollution*.1 (1):27-44. <https://doi.org/10.1080/19415530903043664>.
- Barba-Macías. E., Rangel-Mendoza. J., y Ramos-Reyes. R. 2006. Clasificación de los humedales de Tabasco mediante sistemas de información geográfica. *Universidad y Ciencia Trópico Húmedo*. 22 (2):101-110.
- Beyer. J., Trannum. H.C., Bakke. T., Hodson. V.P., and Collier. K.T. 2016. Environmental effects of the Deepwater Horizon oil spill: A review, *Marine Pollution Bulletin*, 110 (1) 28-51. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.06.027>.
- Blasco. L. M. 1970. Microbiología de suelos. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA. Centro de Enseñanza e Investigación Departamento de Fitotecnia y Suelos. Turrialba, Costa Rica. 193 P.
- Böhm. W. 1979. Methods of studying root systems. *In: ecological studies no. 33*. Billing. Golley W. D.F., Lange. O.L., Olson. J.S. (Eds). Springer Verlag. Berlin, Alemania.188 p.
- Bona. C., Rezende. M.I., Oliveira. S.G. y Souza. A.L. 2011. Effect of soil contaminated by diesel oil on the germination of seeds and the growth of *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) seedlings. *Braz. Arch. Biol. Tehn.* 54 (6): 1379-138. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132011000600025>.
- Brady N.C., Weil R. R. 2008. The nature and properties of soils. Revised fourteenth edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey Columbus, Ohio. USA. 975 p.
- Britania. 2015. Laboratorios Britania. Caba, Argentina. https://www.britaniainlab.com/back/public/upload/productos/upl_5a28446b169d8.pdf (consultado el 30 de Agosto de 2020).

- Buscot F. 2005. Microorganisms in soil: roles in genesis and functions. A. Varma Ed. Springer. Germany. 426 p.
- Camcho-Morales. R.L., Durón-Castellanos A., Flores-Martínez. A., Zazueta-Sandoval. R. 2010. Actividades dihidroxidiol- deshidrogenasa en *Mucor circinelloides* YR-1 aislada de suelo contaminado con petróleo. *Acta universitaria*. 20: 45-50. <https://www.redalyc.org/pdf/416/41618860006.pdf>.
- Campbell N.A., y J.B. Reece. 2007. Biología. 7ª ed. Editorial medica panamericana. Madrid, España. 1532 p.
- Carbognani. L. 1992. Molecular structure of asphaltene proposed for 510c residue of Venezuelan crude, INTEVEP S.A. Tech. Report.
- Castillo R. F., M.D. Roldán R., R. Blasco P., M.J. Huertas R., F.J. Caballero., D.C. Moreno-Vivián., y M.M. Luque-Romero. 2005. Biotecnología Ambiental. Editorial Tébar. Madrid, España. 616 p.
- Centeno. G., F. Trejo., J. Ancheyta., y A. Carlos. 2004. Precipitación de asfáltenos del crudo maya en un sistema a presión. *Revista de la sociedad de Química de México*. 48:179-188.
- Chaudhry R.G. 1994. Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals. *In: Microbial Metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*. Editorial Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp: 92-124.
- Chávez E.M., M.C. Rivera-Cruz., F.I. Reyes., D.J. Palma-López. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*. 26(2):121-136. <http://www.scielo.org.mx/pdf/uc/v26n2/v26n2a1.pdf>.
- Chen, J., Wang, D. Q., Zhang, X. H., Liu, J., Liang, Y. P., Wei, C. C., y Lu, X. Y. 2008. The ability of *Leersia hexandra* Swartz to remediate heavy metals (Cr, Cu y Ni) contaminated waters. *Journal of Agro-Environment Science*, 27, 1514-1518. http://en.cnki.com.cn/Article_en/CJFDTotál-NHBH200804044.htm.
- Chen, Z., L. Zhang., S. Zhao., Q. Shi., y C. Xu. 2015. Molecular structure and association behavior of petroleum asphaltene. In *Structure and Modeling of Complex Petroleum Mixtures*. Springer, Cham. 1-38. https://doi.org/10.1007/430_2015_181.

- Chiu. H. Y., Hong. A., Lin. S. L., Surampalli. R. Y., y Kao. C. M. 2013. Application of natural attenuation for the control of petroleum hydrocarbon plume: Mechanisms and Effectiveness evaluation. *Environmental Health Perspectives*, 505: 126-137. <https://Doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.09.027>.
- Chiu. H.Y., Verpoort. F., Liu. J.K., Chang Y.M., Kao, C.M. 2017. Using intrinsic bioremediation for petroleum-hydrocarbon contaminated groundwater clean up and migration containment: Effectiveness and mechanism evaluation. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 72: 53-61. <https://Doi.org/10.1016/j.jtice.2017.01.002>.
- Chojnacka.K. and Noworyta. A. 2003. Evaluation of *Spirulina* sp. growth in photoautotrophic, heterotrophic and mixotrophic cultures. *Enzyme Microb. Technol.* 34, 461-465. <https://Doi:10.1016/j.enzmictec.2003.12.002>.
- CNH (Comisión Nacional de Hidrocarburos) 2014. Atlas Geológica Cuencas del Sureste-Cinturón Plegado de la Sierra de Chiapas. México Gobierno de la Republica. México, 55 p. <http://www.cnh.gob.mx>.
- Cookson J. J. T. 1995. Bioremediation engineering: Design and application. McGraw-Hill, Inc.
- Corona-Ramírez L., y R Iturbe-Argüelles. 2005. Atenuación natural en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ing. Inv. Y Tec.* 6 (2): 119-126. <http://www.scielo.org.mx/pdf/iit/v6n2/1405-7743-iit-6-02-119.pdf>.
- Declercq. I., Cappuyns. V., Duclos. Y. 2012. Monitored natural attenuation (MNA) of contaminated soils: State of the art in Europe, A critical evaluation. *Science of the Total Environment*, 426, 393-405. <https://Doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.03.040>.
- Delgadillo-López, A. E., C.A. González-Ramírez., F. Prieto-García., J.R. Villagómez-Ibarra., y O. Acevedo-Sandoval. 2011. Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and subtropical agroecosystems*. 14(2):597-612.

http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S187004622011000200002&script=sci_arttext.

- De Mesa J.L.B.L., G.M. Quintero., y L.O. Ortiz O. 2006. Aislamiento e identificación de diez cepas bacterianas desnitrificantes a partir de un suelo agrícola contaminado con abonos nitrogenados provenientes de una finca productora de cebolla en la laguna Tota. Boyacá, Colombia. *Nova*. 4(6): 50-54.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT, Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F. 85 p.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2006. Norma Mexicana NMX- AA- 134-SCFI- 2006. Suelos Hidrocarburos Fracción Pesada por Extracción y Gravimetría. Metodo de Prueba. Diario Oficial de la Federación Mexico. D.F.
- Duchaufour P.H. 2001. Introduction a la Science du Sol, Végétation, Environment. Dunod, Paris. 331 pp.
- Duke N.C., y A. J. Watkinson. 2002. Chlorophyll-deficient propagules of *Avicennia marina* and apparent longer term deterioration of mangrove fitness in oil polluted sediments. *Mar. Poll. Bull.* 44:1269–1276. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(02\)00221-7](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(02)00221-7).
- ECOPETROL. 1996. Plan Nacional de Contingencia contra derrames de hidrocarburos. Sistema Nacional de equipos y expertos en control de derrames y escapes de hidrocarburos. Tomo. Descripciones básicas. 2041 p.
- Elias-Murguía R.L. y V. Martínez. 1991. Suelos contaminados con hidrocarburos. *In*: Ruiz F. J.F. (ed.). Causas y consecuencias de la contaminación del suelo, mesa redonda. Depto. de suelos. UACH. Chapingo, México. pp. 46-93.
- EPA 1986. Method 418.1 modif. Washington (DC): Petroleum Hydrocarbons Total Recoverable Spectrophotometric Infrared. Environmental Protection Agency.

- EPA-3540C. 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. Available from <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>. Accessed 10 enero 2019.
- EPA U.S. (Environmental Protection Agency). 2001. Treatment Technologies for Site Cleanup: Annual Status Report. 10th Edition. Office of Solid Waste and Emergency Response. <http://www.epa.gov/TIO>.
- Eweys, J. B., S. J. Ergas D., P. Y. Chang and E. D. Shroeder. 1998. Bioremediation principles. McGraw Hill. Series in Water Resources and Environmental Engineering. USA.135 p.
- FAO. 1998. World Reference Base for Soil Resources, by ISSS–ISRIC–FAO. World Soil Resources Report No. 84. Rome
- FAO. 2001. Soil Carbon sequestration for improved land management. World soil reports. Rome. 58 p.
- FAO. 2017. Carbon orgánico del suelo: El potencial oculto. Roma, Italia. 77 p.
- Fernández P., M. Grifoll., A. M. Solanas, J. M. Bayona., y J. Albaigés. 1992. Bioassay-directed chemical analysis of genotoxic components in coastal sediments. Environ. Sci. Technol. 26:817-829.
- Fernández L. L. C., N.G. Rojas A., C. T.G. Roldán C., M. E. Ramírez I., H.G. Zegarra M., R. Hernández U., R.J. Reyes A., D.F. Hernández., y J.M. Arce O. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 179 p.
- Ferrándiz-Gómez. T. 1995. Adición de Resinas de hidrocarburos a adhesivos de policloropreno. Universidad de Alicante. Alicante, España. 194 p.
- Ferrera-Cerrato, R., N. G. Rojas-Avelizapa., H. M. Poggi-Varaldo., A. Alarcón., y R. O. Cañizares-Villanueva. 2006. Procesos de biorremediación de suelo y agua contaminados por hidrocarburos del petróleo y otros compuestos orgánicos. *Revista latinoamericana de Microbiología*, 48(2), 179-187.

- Ferrera-Cerrato, R., y A. Alarcón. 2007. Rizósfera: Interacción suelo, planta microorganismos. *En: Ecología de la raíz*. Fuentes-Dávila, G., y R. Ferrera-Cerrato (eds). 2da ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Cd. Obregón, Sonora, México. pp: 1-26.
- Fine P., E.R. Graber., y B. Yaron. 1997. Soil interactions with petroleum hydrocarbons: abiotic processes. *Soil Tech.* 10: 133-153. https://www.researchgate.net/profile/Pinchas_Fine/publication/222266886_Soil_interactions_with_petroleum_hydrocarbons_Abiotic_processes/links/5b5448e30f7e9b240ff9e002/Soil-interactions-with-petroleum-hydrocarbons-Abiotic-processes.pdf.
- Fraume R.N.J. 2007. Diccionario ambiental. Eco ediciones. 465 p.
- Freedman B. 1989. Environmental Ecology: The impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA. 424 p.
- García, E., Ferrera, R., J.J. Almaráz., R. Rodríguez., y E. García. 2013. Biodegradación de queroseno en la rizósfera de gramíneas en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 37(2), 125-134. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0377-94242013000200011&script=sci_arttext&tlng=en.
- Garzón C. F. 1998. Enfermedades y plagas en el cultivo del caucho (*Hevea brasiliensis*). *En: Actualización tecnológica en ajonjolí, caucho, hortalizas y frutales para la orquídea colombiana*. Carpioca. Colombia. 77 p.
- Garriz R.A. 2001. Tú y la Química. Pearson Educación, México D.F. 848 p.
- Gerhardt. E.K., Xiao-Dong. H., Bernard. R.G., and Bruce. M.G. 2009. Phytoremediation and rhizoremediation of organic soil contaminants: Potential and challenges. *Plant Science*. 176, (1): 20-30. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.09.014>.
- Glick B.R. 1995. The enhancement of plant growth by freeliving bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 109-117. <https://doi.org/10.1139/m95-015>.

- Gómez. N., Donato. J.C., Giorgo. A., Guasch H., Mateo. P., y Sabater. S. 2009. La biota de los ríos: los microorganismos autótrofos. En: Conceptos y técnicas en ecología fluvial. Elozegi S., y S. Sabater (Eds). Rubes Editorial. España. pp: 219-242.
- Gómez-Rivera M.E. 2012. Estudio comparativo de la biodegradación de hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) por medio de la atenuación natural, la bioestimulación y la bioaumentación en un suelo contaminado. Universidad Pontificia Bolivariana, facultad de ingeniería ambiental. Bucaramanga, Colombia. 113 p.
- Gómez W., J. Gaviria., S, Cardona. 2009. Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diesel. Dyna 93 Universidad Nacional de Colombia, Medellín, Colombia. 83 p.
- González-Moscoso. M. 2015. Los surfactantes como pretratamiento a la fitorremediación de un Gleysol con petróleo fresco en el trópico húmedo mexicano. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 147 p.
- González-Moscoso, M., Rivera-Cruz, M.C., Delgadillo-Martínez, J., y Lagunes-Espinoza, L.C. 2017. Análisis de crecimiento y producción vegetal de *Leersia hexandra* Swartz en el trópico húmedo mexicano en función de petróleo y surfactante. *Polibotánica*. 43: 177-196. <https://Doi.org/10.18387/polibotanica.43.8>.
- González-Moscoso. M., Rivera-Cruz. M.C., y Trujillo-Narcia A. 2019. Descontamination of soil containing oil by natural attenuation, phytoremediation and chemical desorption. *International Journal of Phytoremediation*. 21(8): 768-776. <https://Doi.org/10.1080/15226514.2019.1566879>.
- Groenzin, H.; Mullins, O. C. 1999. "Asphaltene Molecular Size and Structure". *The Journal of Physical Chemistry A*. 103(50):11237-11245.
- Guo. S., Fan. R., Li. T., Hartog. N., Li. F., and Yang. X. 2014. Synergistic effects of bioremediation and electrokinetics in the remediation of petroleum-contaminated soil. *Chemosphere* 109. 226-233. <https://Doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.02.007>.

- Gutiérrez C. M.C., y Zavala C. J. 2002. Rasgos hidromórficos de suelos tropicales contaminados con hidrocarburos. *Terra Lationamericana*. 20 (2): 101-111. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57320202.pdf>.
- Haddock J. D., Pelletier. D. A., and Gibson. D.T. 1997. Purification and properties of ferredoxin BPH, a component of biphenyl 2, 3-dioxygenase of *Pseudomonas* sp strain LB400. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 19: 355-359. <https://doi.org/10.1038/sj.jim.2900429>.
- Haritash A. K., y C.P. Kaushik. 2009. Biodegradation aspect of polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs): a review. *Journal of hazardous material*. 169: 1-15. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.03.137>.
- Hawkesford. M., Horst. W., Kichey. T., Lambers. H., Schjoerring. J., Moller. I. S., y White. P. 2012. Functions of macronutrients. In Marschner's mineral nutrition of higher plants pp. 135-189. *Academic Press*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384905-2.00006-6>.
- Hernández M. E. y W. J. Miscth. 2007. Denitrification in created riverine wetlands: influence of hydrology and season. *Ecological Engineering*. 30:78-88. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2007.01.015>.
- Hernández M.E., M.L. Arena-Ortiz., y X. Chiappa-Carrara. 2016. Las bacterias metanotróficas y desnitrificantes en los servicios ambientales. *En: Arena- Ortiz M.L., y X. Chiappa-Carrara (comps). Microbiología Ambiental en México. Universidad Autónoma de México*. 4: 82-92.
- Hernández-Valencia. I., e Infante. C. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado petróleo extrapesado con *Megathursus maximus*. *Revista internacional de contaminación ambiental*. 33(3):495-503. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992017000300495.
- Hook. E.S., and Osborn. L.H. 2012. Comparison of toxicity and transcriptomic profiles in a diatom exposed to oil, dispersants, dispersed oil. *Aquatic Toxicology*. 124-125: 139-151. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.08.005>.

- Hou, F.S.L., M.W. Milke., D.W. Leung y D.J. MacPherson. 2001. Variations in phytoremediation performance with dieselcontaminated soil. *Environ. Tech.* 22: 215-222. <https://www.tandfonline.com/action/showCitFormats?doi=10.1080/09593332208618301>.
- Hu. B., Min. M., Zhou. W., Du. Z., Mohr. M., Chen. P., Zhu. J., Cheng. Y., Liu. Y., and Ruan, R. 2012. Enhanced mixotrophic growth of microalga *Chlorella* sp. on pretreated swine manure for simultaneous biofuel feedstock production and nutrient removal. *Bioresour Technol.* 126:71– 79. <http://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.09.031>.
- Hunt. R., Causton. D.R., Shipley. B., and Askew. P. 2002. A modern tool for classical plant growth analysis. *Annals of Botany.* 90: 485-488. <https://doi:10.1093/aob/mcf214>.
- INECC. 2007. <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/372/tecnolog.html>. Consultado 31/07/2020.
- Iturbe F.R., Castro A.C., y Torres G. L. 2007. Sub-soil contamination due to oil spills in zones surrounding oil pipeline-pump stations and oil pipeline right-of-ways in Southwest-Mexico. *Environmental Monitoring Assess.* 133:20-27. <https://DOI 10.1007/s10661-006-9593-y>.
- IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO, Roma.
- IUSS Working Group WRB, 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, Actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma.
- Jackson. M.L. 1964. Análisis químico de suelos. Traducción al español por Beltrán. J.M. Omega, Barcelona, España. 92 p.

- Janzen S. J., y M.L. Teresinha. 2018. Rhizospheric microorganisms as a solution for the recovery of soils contaminated by petroleum: A review. *Journal of Environmental Management* 210:104-113. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2018.01.015>.
- Jaramillo V.J. 2004. El ciclo global del carbono. *En: Martínez J., y A. Fernández B. (Comps). Cambio climático: Una visión desde México. Instituto Nacional de Ecología. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, D.F. pp: 77-86.*
- Jiménez-Cisneros B.E. 2001. La contaminación ambiental en México: Causas, efectos y tecnología apropiada. Limosa, Colegio de Ingenieros Ambientales de México, A.C., Instituto de Ingeniería de la UNAM y FEMISCA. México, D.F. 926 p.
- Johnson. L., and Curl. E. 1972. Methods for research on the ecology of soilborne plant pathogens. Minneapolis (MN): Burgess Publishing Company.
- Julca A., L. Meneses., R. Blas., S. Bello. 2006. La materia orgánica, importancia y experiencia de su uso en la agricultura. *Idesia*. 24: 49 – 51. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-34292006000100009>.
- Kapustka, L. y Reporter, M. 1998. Terrestrial primary producer. *In: Handbook of ecotoxicology. P. Calow, Ed. Blackwell Science, Oxford, Vol. 1, pp. 280-294.*
- Khan F.I., Husain, T., and Hejazi, R., 2004. An overview and analysis of site remediation technologies. *Journal of Environmental Management*, 71, 95-122. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2004.02.003>.
- Kjellin J., Hallin S., Wörman A. 2007. Spatial variations in denitrification activity in wetland sediments explained by hydrology and denitrifying community structure. *Water Res*, 41:4710-20. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.06.053>.
- Klages F. 2006. Tratado de química orgánica. Tomo 1. 1ª parte. Editorial Reverté. Barcelona, España. 602 p.
- Kirk-Othmer. M. 2001. Enciclopedia de Tecnología Química. Editorial Limosa. México, D.F. 1949 p.

- Kozłowski T, T. 1984. Flooding and Plant Growth. Academic Press, pp. 356
- Labud V., C. García., y T. Hernández. 2007. Effect of hydrocarbons pollution on the microbial properties of a sand and clay soil. *Chemosphere*. 66:1853-1871. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.08.021>.
- Larenas P.G., y M.L. De Viana. 2005. Germinación y supervivencia del pasto cubano *Tithonia tubaeformis* (Asteraceae) en suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo. *Ecologia austral*. 15: 177-181.
- Lee. K., Prince. R.C., Greer. C.W., Doe. K.G., Wilson. J.E.H., Cobanli. S.E., Wohlgeschaffen. G.D., Alroumi. D., King. T., and Tremblay. G.H. 2003. Composition and toxicity of residual Bunker C fuel oil in intertidal sediments after 30 years. *Spill Science and Technology Bulletin*. 8: 187-199. [https://doi.org/10.1016/S1353-2561\(03\)00014-8](https://doi.org/10.1016/S1353-2561(03)00014-8).
- Lee. K., Boufadel. M., Chen. B., Foght. J., Hodson. P., Swanson. S., and Venosa. A. 2016. High-priority Research Needs for Oil Spills in Canada: Summary of a Royal Society Expert Panel Report on the Behaviour and Environmental Impacts of Crude Oil Released into Aqueous Environments, Proceedings of the Thirty-ninth AMOP Technical Seminar, Environment and Climate Change Canada, Ottawa, ON, pp. 966-991.
- León A. R. 1991. Nueva Edafología: Regiones tropicales y áreas templadas de México. 2da Edición. Universidad de Texas. U.S.A. 366 p.
- Liu, J.J, Wang P., and Wang H. Study on denitrification characteristics of a heterotrophic nitrification-aerobic denitrifier. 2008. *Research of Environmental Science*, 21:121-5. (in Chinese).
- Liu, J., Duan, C., Zhang, X., Zhu, Y., y Lu, X. 2011. Potential of *Leersia hexandra* Swartz for phytoextraction of Cr from soil. *Journal of hazardous materials*, 188(1-3), 85-91. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.066>.
- Lovley. D.R., Fraga. J.L., Coates J.D., y Blunt-Harris E.L. 1999. Humics as an electron donor for anaerobic respiration. *Environ, Microbiol*. 1:89-98. <https://sfamjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1046/j.14622920.1999.00009>.

[x?casa_token=c-YGL7vTFeEAAAAA:fVMlqSZVhm3IWjjxg4O-kqAILvzL947Wj7pIxs9HinxZZ6k6t_AZJid23m2oOs8Hm-1kYduFIFzkCCXMw.](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403)

Lynch J. M., and de Leij F. 2012. Rhizosphere. *In: eLS*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
[https://DOI: 10.1002/9780470015902.a0000403.pub2](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000403)

Madigan M.T., Martinko. J.M., Dunlap. P.V., y Clark. D.P. 2015. Brock. Biología de los microorganismos. Duodécima edición. Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 1259 p.

Maier. M.R., and Gentry. J.T. 2015. Microorganisms and organic pollutants. *In: Pepper LI, Gerba PC, Gentry JT, (Eds.)*. Environmental microbiology. 3rd ed. San Diego (CA): Academic Press. p. 377-413.

Makadia. T.H., Adetutu. E.M., Simons. K.L., Jardine. D., Sheppard. P.J., and Ball. A.S. 2011. Reuse of remediated soils for the bioremediation of waste oil sludge. *Journal of Environmental Management*, 92: 866-871.
<https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2010.10.059>.

Maldonado-Chávez. E., M.C. Rivera-Cruz., F. Izquierdo-Reyes y D.J. Palma-López. 2010. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleo crudo nuevo e intemperizado. *Universidad y Ciencia*. 26: 121-136.
http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0186-29792010000200001.

Mansoori A.G. 2009. Phase behavior in petroleum fluids (a detailed descriptive and illustrative account). Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), UNESCO. 33p.

Margesin R., y F. Shinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 3127-3133. [https://DOI: 10.1128/AEM.67.7.3127-3133.2001](https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3127-3133.2001).

- Maroto A. M.E., y J.M. Rogel Q. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa*. División de Protección Ambiental. Guadalajara, México, 4(5): 297-305.
- Marroquín S.G.J. 2007. Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis Doctor en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México. D.F. 129 p.
- Martínez M. V.E., y López S. F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra*. 19: 9-17. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57319102.pdf>.
- Martínez H. E., Fuentes E. J. P., y Acevedo H. E. 2008. Soil organic carbon and soil properties. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*. 8(1): 68-96. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>.
- Marschner P. 2012. Rhizosphere Biology. In: Marschner P (Ed). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Third Edition. Elsevier. San Diego CA.USA. pp: 369-388.
- McClain ME., Boyer EW., Dent CL., Gergel SE., Grimm NB., Groffman PM., Hart SC., Harvey JW., Johnston CA., Mayorg E, McDowell WH., Pinay G. 2003. Biogeochemical hot spots and hot moments at the interface of terrestrial and aquatic ecosystems. *Ecosystems*, 6:301-12. <https://www.jstor.org/stable/3659030>.
- McCurry J. 2008. Química orgánica. 7ª. Edición. Cengage Learning Editores. México, D.F. 1347 p.
- Medina. J., F. Garcia., y B. Paricaguan. 2014. Biodegradación de petróleo por microorganismos autóctonos en suelos contaminados provenientes de la Bahía Amauy de Estado Falcón. *Revista Ingeniería UC*. 21(1):62-69. <https://www.redalyc.org/pdf/707/70732642007.pdf>.
- Méndez-Natera J.R., C. Roque., K. Zapata., y V.A. Otahola-Gómez. 2004. Efecto de la concentración de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) C.V. Himena 95. *Revista UDO Agrícola*. 4: 66-71.

- Méndez, E.D., Castellanos, G.I., Alba, G., Hernández, S., Solís, G., Levresse, M., Vega, F., Rodríguez, E., Urbina, M.C., Cuevas, M.G., y García, E.B. 2011. Effect in the physical and chemical properties of Gleysol soil after an electro-kinetic treatment in presence of surfactant Triton X -114 to remove hydrocarbon. *International Journal of Electrochemical Science*. 6: 1250-1268. <http://www.electrochemsci.org/papers/vol6/6051250.pdf>.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., and Infante, C. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. *Water Air Soil Pollut.* 165(1-4):195–209. <https://doi.org/10.1007/s11270-005-4979-y>.
- Mexpolímeros 2020. <https://www.mexpolimeros.com/resinas%20de%20hidrocarburo.html.consultado>. Consultado 06/05/2020.
- Miranda-Martínez, M.R., J. Delgadillo-Martínez., A. Alarcón., y R. Ferrera-Cerrato. 2006. Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizosfera del pasto alemán. *Terralatioamericana*. 25(1): 25-33. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57311513004.pdf>.
- Mollogón J.P., A. Martínez., W. Rivas., C. Maseda., B. Muñoz., E. Márquez., L. Lemus., y Y. Campos. 2015. Carbono orgánico como indicador del proceso de desertificación en suelos agrícolas al norte de Venezuela. *Suelos Ecuatoriales*. 45(1):24-30.
- Morales G.G. 2007. La fitorremediación de suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de la planta de arroz (*Oriza sativa* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 71 p.
- Maroto A. M.E., y J.M. Rogel Q. 2004. Aplicación de sistemas de biorremediación de suelos y aguas contaminadas por hidrocarburos. *Geocisa*. División de Protección Ambiental. Guadalajara, México, 4(5):297-305.
- Narjes D., A. Needa., M. Elyas., M. Khanafer., N.A. Sorkhon., S.S. Radwan. 2015. Most Hydrocarbonoclastic Bacteria in the Total Environment are Diazotrophic, which

- Highlights Their Value in the Biorremediation of Hydrocarbon Contaminants. *Microbes Enviroments*. 30(1): 70-75. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME14090>.
- National Research Council. 2002. Natural Attenuation for Ground Water Remediation. Committee on Intrinsic Remediation, Water Science and Technology Board, National Research Council. National Academy of Science.
- Navarro Machado R. V. 2009. Los desastres en su interacción con la ciencia, la tecnología y la sociedad. *MediSur, revista electrónica*. 4(2):18-24. <https://www.redalyc.org/pdf/1800/180019831014.pdf>.
- Nawaz, M.F. y Bourrié G. 2012. Soil compaction impact and modelling. A review. *Agronomy for Sustainable Development* 32: 1-19 <https://DOI: 10.1051/agro: 2008054>.
- Orocio-Carrillo. J.A., M.C. Rivera-Cruz., E.M. Aranda-Ibáñez., G. Hernández G., y M. R. Mendoza L. 2018. Evaluación del efecto del petróleo a través del tiempo sobre el crecimiento, producción y proteína de *Leersia hexandra* Sw. In: Martínez H.J., M.A. Ramírez G., y J. Cámara- Córdova (eds). *Investigaciones Científicas y Agro tecnológicas para la Seguridad Alimentaria*. Universidad Autónoma de Tabasco- Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Villahermosa, Tabasco. pp. 603-608.
- Orocio-Carrillo. J.A., M.C. Rivera-Cruz., E.M. Aranda-Ibáñez., A. Trujillo-Narcia., G. Hernández G., y M. R. Mendoza L. 2019. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. used as phytoremediation in clay soil of the Mexican humide tropic. *Ecotoxicology*. 28(9): 1063-1074. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02106-1>.
- Orocio-Carillo. J.A. 2019. Actividad biológica rizosférica de *Leersia hexandra* Sw. en la fitorremediación de suelo degradado por la industria petrolera. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 117 p.
- Ortiz V. B., y C. A. Ortiz S. 1980. Edafología. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 324 p.

- Ortiz-González D.P., Andrade F. F., Rodríguez N. G., Montenegro R. L.C. 2006. Biomateriales sorbentes para la limpieza de hidrocarburos en suelos y cuerpos de agua. *Revista Ingeniería e Investigación*. 26(2):20-27. http://www.ciiq.org/varios/peru_2005/Trabajos/III/1/3.1.07.pdf.
- Page A.L., Miller. R.H., and Keeney. D.R. 1982. Nitrogen total. *In*: Page A. L.R., Miller H. and Keeney D.R. (eds). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological properties*. 2nd ed. ASA. SSSA. Madison, EEUU. Pp. 595-629.
- Pardo C. J.L., M.C. Perdomo R., y J.L. Benavides. 2004. Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos. *NOVA*. 2(2):40-49. <https://doi.org/10.22490/24629448.6>.
- Pardo. J.A. 2004. Respuestas de las plantas al anegamiento del suelo. *Investigación agraria. Sistemas y recursos forestales*. Fuera de serie: 101-107.
- Park. K.C., Whitney. C., McNichol. J.C., Dickinson. K.E., MacQuarrie. S., Skrupski. B.P., Zou. J., Wilson. K.E., O'Leary. S.J.B., and McGinn. P.J. 2012. Mixotrophic and photoautotrophic *J. Appl. Phycol.* 24, 339-348. <https://doi.org/10.1007/s10811-011-9772-2>.
- Paria S. 2008. Surfactant-enhanced remediation of organic contaminated soil and water. *Adv Coll Inter Sci*. 138, 24-58. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2007.11.001>
- Pascual A. M.R., y V. Calderón P. 2000. *Microbiología Alimentaria: Metodología analítica para alimentos y bebidas*. 2ª ed. Díaz de Santos. Madrid, España. 464 p.
- Paul A.E. 2015. *Soil Microbiology, ecology and biochemistry*. 421 p.
- Pei. Y. S., Wang. J., Wang. Z. Y., and Yang, Z. F. 2010. Characteristics of ammonia-oxidizing and denitrifying bacteria at the river-sediment interface. *Procedia Environmental Sciences*. 2: 1988-1996. <https://doi:10.1016/j.proenv.2010.10.214>.
- Pellini. L. 2006. *Biorremediación estimulada por efluentes cloacales tratados de suelos contaminados con hidrocarburos*. Escuela Superior de Salud y Ambiente, Universidad Nacional de Conahue. Neuquén, Argentina. 219 p.

- PMEX (Petróleos Mexicanos). 2020. Informe anual 2019. PEMEX por el rescate de la soberanía.
- Peña S. E.J., M.L. Palacios P., y N. Ospina-Álvarez. 2005. Algas como indicadoras de contaminación. Universidad del Valle. Calí, Colombia.158 p.
- Pepper I. L., C.P. Gerba., y T. J. Gentry. 2015. Environmental Microbiology. 3ª ed. Academic Press. San Diego, CA. U.S.A. 729 p.
- Perdomo C., M. Barbazán., y J.M. Durán. 1999. Nitrógeno. Universidad de la República, Facultad de Agronomía, Cátedra de Fertilidad de Suelos. Montevideo, Uruguay.
- Pinton R., Z. Varanini., y P. Nannipieri. 2007. The rhizosphere: biochemistry ang organic substances at the soil plant interface. CRC press. New York, U.S.A. 449 p.
- Plice M. J. 1948. Some effects of crude petroleum on soil fertility. *Proc. Soil Sci. Soc. Am.* 13: 413416. https://acsess.onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.2136/sssaj1949.036159950013000C0075x?casa_token=LbRkj0N45U0AAAAA:ifM4g7QdRE0ZMsKtF7JCF7pLP0s0XeP4Eb8CjgsKxCjESjlia6XnMnisWxbL0YSDvRcSsB8GQcjKHm6H6g.
- Porta C. J., M. López-Acevedo., y C. Roquero. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 960 p.
- Porta C. J., M. López-Acevedo., y R.M. Poch. 2019. Edafología uso y protección de suelos 4ta edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 594 p.
- PTR (Registro Estatal de Emisiones y Fuentes Contaminantes. 2007. En línea: <http://www.prtr-es.es/CH4-metano,15588,11,2007.html>. Consultado 10 de Julio 2020.
- Powell R .1997. The use of plants as “field” biomonitors. *In*: Wang W., J. Gorsuch., y J. Hughes (Eds.). Plants for Environmental Studies. Lewis. Boca Raton, FL, EEUU. pp. 47-61.
- Quiñones A.E.E., Ferrera C.R., Gavi R.F., Fernández L.L., Rodríguez V.R. y Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*. 37:585-594. <https://www.redalyc.org/pdf/302/30237604.pdf>.

- Ramírez-Gama R.M., Luna M. B., Mejía-Chávez., Velázquez-Madrazo O., Gtsuzuki-Reyes., y Vierna-García. 1998. Manual de prácticas de Microbiología general 3ra ed. Facultad de química, Universidad Autónoma de México.
- Ramírez M. A.G. 2012. Estado fenológico temprano de frijol (*Vigna unguiculata* L.) bacterias y actividad enzimática: indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado. Tesis de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 127 p.
- Ramírez L. H.J., Trujillo-Nacia. A., Rivera-Cruz. M.C., y Valerio-Cárdenas C. 2018. Respuesta adaptativa del pasto *Leersia hexandra* Swartz en suelos contaminados por petróleo. En: Martínez H. J., y Hernández H. C. (eds). Investigaciones Científicas y Agrotecnológicas para la Seguridad Alimentaria. INIFAP, Tab., México. pp: 557-563.
- Rennie. R. J. 1981. A single médium for the isolation of acetylenoreducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. Canadian Journal Microbiology. 27: 8-14. <http://doi:10.1139/m81-002>.
- Rivera Cruz, M. D. C., Ferrera Cerrato, R., Rodríguez Vázquez, R., Linares, F., Caseso, L., Sánchez García, P., & Volke Haller, V. H. 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán (*Echinochloa polystachya* (HBK) Hitchc.) y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y en benzo (a) pireno. Tesis doctoral. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, Instituto de Recursos Naturales, Programa de Edafología.
- Rivera-Cruz M.C, R. Ferrera-Cerrato., V. Volker H., R. Rodríguez V., y L. Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latinoamerica*. 20:423-434. <https://www.redalyc.org/pdf/573/57320407.pdf>.
- Rivera-Cruz M.C., y A. Trujillo-Narcia. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia*. 29(7):369-376. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=33909405>.

- Rivera-Cruz, M. D. C., Trujillo-Narcía, A., Miranda de La Cruz, M. A., y Maldonado Chávez, E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevos e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30(6):15-24. <https://www.redalyc.org/pdf/339/33910503.pdf>.
- Rivera-Cruz M.C. 2011. Flora y microflora rizosferica del pantano: Indicadoras de perturbación causada por petróleo e inundación. *Agroregión*. 5(51):12-15.
- Rivera-Cruz M.C., Maldonado-Chavez. E., y Trujillo-Narcia. A. 2012. Effects of crude oil on the growth of *Brachiaria mutica* and *Leucaeca leucecephola* and on soil and plant macronutrients. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 15: 30-39. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93924626005.pdf>.
- Rivera-Cruz, M. D. C., Trujillo-Narcía. A., Trujillo-Rivera. E.A., Arias-Trinidad. A., y Mendoza-López. M.R. 2016. Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in southeast Mexico. *International Journal of Phytoremediation*, 18(9), 877-884. <https://DOI: 10.1080/15226414.1156632>.
- Robertson P.C and Groffman P.M. 2015. Nitrogen Transformations pp: 421-446. In: Eldor A.P (Ed.). *Soil Microbiology, Ecology, and Biochemistry*. Elsevier. San Diego CA. USA.
- Rodríguez F. H y Rodríguez A.J. 2011. Métodos de Análisis de suelos y plantas. Criterios de interpretación. Editorial Trillas, México D.F. 239 p.
- Rodríguez-Rodríguez. N., Rivera-Cruz. M.C., Trujillo-Narcía. A., Almaráz-Suárez. J.J and Salgado-García. S. 2016. Spatial Distribution of Oil and Biostimulation Through the Rhizosphere of *Leersia hexandra* in Degraded Soil. *Water Air Soil Pollut*. 227(319): 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3030-9>.
- Rojo. F. 2009. Degradation of alkane by bacteria. *Environmental of Microbiology*. 11: 2477-2490. <https://doi:10.1111/j.1462-2920.2009.01948.x>.
- Romaniuk R., J.F. Brant., P.R. Ríos., y L. Giuffré. 2007. Atenuación natural y remediación inducida en suelos contaminados con hidrocarburos. *Ciencia del suelo*. 25(2): 1-11. http://suelos.org.ar/publicaciones/vol_25n2/25_2_romaniuk_139_149.pdf.

- Romero C.R. 2007. Microbiología y parasitología humana: Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias. 3ª ed. Editorial Medica Panamericana. Mexico, D.F. 1725 p.
- Rösh C., A. Mergel., y H. Bothe. 2002. Biodiversity of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in an acid forest soil. *Appl and Environmental Microbiol.* 29: 18-38. <https://DOI: 10.1128/AEM.68.8.3818-3829.2002>.
- Rosini. F. D. 1960. Hydrocarbons in petroleum. *Journal of Chem.Educ.* 39:554-561. <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/ed037p554>.
- Salcedo-Martínez, S. M., S. Moreno-Limón., y A. Rocha-Estrada. 2019. Biorremediación con algas. *Secretario General*, 15(26), 24. https://www.chilebio.cl/wp-content/uploads/2020/05/Planta_26_compressed.pdf#page=24.
- Salas G. 1987. Suelos y ecosistemas forestales; con énfasis en América tropical. IICA. San José, Costa Rica.438 p.
- SAS (Statistical Analysis Systems). 2005. User's Guide, Version 9.1.3. Cary (NC): SAS Institute, Inc.
- Semple. K.T., B.R. Cain., y S. Schmidt. 1999. Biodegradation of aromatic compounds by microalgae. *FEMS Microbiol. Lett.* 170:291-300. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1999.tb13386.x>.
- Sheu Y.E and Storn A.D. 1995. Asphaltene in organic solvents *In*: Sheu Y.E and Oliver C (Eds). Mullins. *Asphaltenes Fundamentals and Applications*. Springer Science. Chicago Illinois. pp: 1-50.
- Sharabi, N.E.D., y R. Bartha. 1993. Testing some assumptions about biodegradability in soil as measured by carbon dioxide evolution. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1201-1205. <https://aem.asm.org/content/aem/59/4/1201.full.pdf>.
- Shirdam R., A.D. Zand., G. Nabibihendi., y N. Mehrdadi. 2009. Enhanced biodegradation of hydrocarbons in the rhizosphere of plant species in semiarid regions. *Asian J chem.* 21: 2357-2368. <http://www.asianjournalofchemistry.com>.
- Six. J., Bossuyt. H., Degryze S y Deneff K. 2004. A history of research on the link between (micro) aggregates, soil biota, and soil organic matter dynamics. *Soil Till Res.* 79:7-31. <https://doi.org/10.1016/j.still.2004.03.008>.

- Soil Survey Staff. 1999. Soil taxonomy. A basic system of soil classification for making and interpreting soil surveys. 2nd Edition. Agric. Handbook 436. Washington, DC, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture.
- Soil Survey Staff. 2003. Keys to soil taxonomy. 9th Edition. Washington, DC, Natural Resources Conservation Service, United States Department of Agriculture
- Song K., K. Hojeong., L. Zhang., y W. J. Mitsch. 2012. Seasonal and spatial variations of denitrification and denitrifying bacterial community structure in created riverine wetlands. *Ecological Engineering* 38:130-134. f a weathered and recently oil-contaminated soils from Brazil: a comparison study. *Chemosphere*. 58: 515-522. <https://doi.org/10.1016/j.ecoleng.2011.09.008>.
- Speight, J. G. 1980. The chemistry and technology of petroleum. Marcel Dekker (ed.). New York. 401-471 p.
- Speight J. G. 1991. The chemistry and technology of petroleum. John Wiley and Sons. New York.
- Stevenson, F. J. 1982. Organic forms of soil nitrogen. *In*: F. J. Stevenson (ed.). Nitrogen in agricultural soils. Monography 22. American Society of Agronomy. Madison, Wisconsin, USA. 67-122 p.
- Sugihara S. 2014. Petroleum Resin. *In*: Kobayashi S., Müllen K. (Eds) Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials. Springer, Berlin, Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-36199-9-240-1>.
- Trinidad P. V.O., L.G. Sobral A., C.L. Rizzo J., G.F. Leite., y A.U. Soriano. 2005. Biorremediation.
- UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México). 2012. En Línea: <https://quimica.unam.mx/wp-content/uploads/2016/12/13hexano.pdf>. Consultado 10 de Julio 2020.
- USEPA-3540C 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/waste/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> [accessed 2012 Jun 20].

- Trujillo-Narcía, A., Rivera-Cruz, M. D. C., Lagunes-Espinoza, L. D. C., Palma-López, D. J., Sánchez-Soto, S., y Ramírez-Valverde, G. 2014. Parámetros biológicos de la restauración de suelos contaminados por petróleo crudo. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*.1 (2):107-122. <http://www.scielo.org.mx/pdf/era/v1n2/v1n2a3.pdf>.
- Vargas. G.P.A., R.R. Cuellar., y J. Dussan. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. *Hipótesis- Apuntes Científicos Uniandino*. 4:44-49.
- Vázquez-Luna. M., A. Montiel-Flores., D. Vázquez-Luna., y M.F. Herrera-Tenorio. 2010. Impacto del petróleo crudo en suelo sobre una microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13: 511-523. <https://www.redalyc.org/pdf/939/93920942029.pdf>.
- Villatoro-Monzón, W.R., M.G. Morales-Ibarra., E.K. Velázquez., H. RamírezSaad., y E. Razo-Flores. 2008. Benzene Biodegradation under anaerobic Conditions coupled with metal oxides reduction. *Water Air Soil Pollut*. 192; 165-172. <https://doi.org/10.1007/s11270-008-9643-x>.
- Vasudevan N., y P. Rajaram. 2001. Bioremediation of soil sludge-contaminated soil. *Environment International* 26: 409-411. [https://doi.org/10.1016/S0160-4120\(01\)00020-4](https://doi.org/10.1016/S0160-4120(01)00020-4).
- Walkley A., and Black. I.A. 1934. An examination of degtjareff method for determining soil organic matter and a prosed modification of the chromic acid titration method. *Soil Science*. 37: 29-38.
- Wang X., R. Bartha. 1994. Effect of biorremediación on toxicity mutagenesis and microbiota in hydrocarbon- polluted soils. *In: Wise D. L., y D.J. Trantolo (eds). Remediation of Hazardous waste contaminated soil*. New York. pp. 213-215.
- Waquier. J.P. 2004. El refinado del petróleo. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 462p.
- Wentzel. A., Ellingsen. T.E., Koltar. H.K., Zorchev. S.B., y Throne-Holst. M., 2007. Bacterial metabolism of long-chain n-alkane. *Applied Microbiology Biotechnology* 76:1209-1221. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1119-1>.

- Widdel, F., y R. Rabus. 2001. Anaerobic biodegradation of saturated and aromatic hydrocarbons. *Current opinion in biotechnology*.12 (3):259-276. [https://doi.org/10.1016/S0958-1669\(00\)00209-3](https://doi.org/10.1016/S0958-1669(00)00209-3).
- Xu, S.Y., Guang-Dong, S., Jing-Hua, J., Ying, L., Mu, L., Zhi-Ping, Z., and Zhi-Pei, L. 2014. Successful bioremediation of an aged and heavily contaminated soil using a microbial/plant combination strategy. *Journal of Hazardous Materials*, 264: 430-438. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2013.10.071>.
- You, S. H., Zhang, X. H., Liu, J., Zhu, Y. N., & Gu, C. 2014. Feasibility of constructed wetland planted with *Leersia hexandra* Swartz for removing Cr, Cu and Ni from electroplating wastewater. *Environmental technology*, 35(2), 187-194. <https://doi.org/10.1080/09593330.2013.822006>.
- Zambrano-Monrroy, B. 2011. Lipasas como biomarcadores en la degradación de alcanos y aromáticos. Tesis de Maestría en ciencias ambientales de la Universidad Autónoma de San Luis Potosí. San Luis Potosí, México. 95p.
- Zamora A., J, Ramos., M. Arias. 2012. Efecto de la contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro*. 24(1):5-12. <https://www.redalyc.org/pdf/857/85723518002.pdf>.
- Zhang, X. H., Liu, J., Huang, H. T., Chen, J., Zhu, Y. N., & Wang, D. Q. 2007. Chromium accumulation by the hyperaccumulator plant *Leersia hexandra* Swartz. *Chemosphere*, 67(6), 1138-1143. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2006.11.014>.
- Zheng, Z., Zhang Y., Su, X., and Cui, X. 2016. Responses of hydrochemical parameters, community structures, and microbial activities to the natural biodegradation of petroleum hydrocarbons in a groundwater-soil environment. *Environmental Earth Sciences*, 75 (1400), 1-13. <https://doi.org/10.1007/s12665-016-6193-1>.
- Zumdahl S.S., y D.J. Decoste. 2012. Principios de química. Cengage Learning Editores. Séptima edición. México. D.F. 654 p.

APÉNDICES ESTADÍSTICOS

Apéndice A. Análisis de varianza de las respuestas fisiológicas de *Leersia hexandra* en diferentes tiempos y concentraciones de petróleo

Cuadro 9.1. Análisis de varianza de la longitud de estolones de *Leersia hexandra* en suelo con petróleo durante 180 días.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30 d					
Tratamiento	3	17055.00	5685.00	6.36	.003
Error	20	17863.00	893.15		
Total	23	34918.00			
60 d					
Tratamiento	3	77881.50	25960.50	5.52	.006
Error	20	93934.33	4696.71		
Total	23	171815.83			
90 d					
Tratamiento	3	105351.00	35117.00	5.35	.007
Error	20	131113.00	6555.65		
Total	23	236464.00			
120 d					
Tratamiento	3	117269.50	39089.83	7.26	.002
Error	20	107560.33	5378.01		
Total	23	224829.83			
150 d					
Tratamiento	3	109700.45	36566.81	7.75	.001
Error	20	94335.50	4716.77		
Total	23	204035.95			
180 d					
Tratamiento	3	11529.00	37176.33	7.41	.002
Error	20	100270.33	5013.51		
Total	23	211799.33			

Cuadro 9.2. Análisis de varianza de la longitud de estolones de *Leersia hexandra* por efecto de dos factores (concentración de petróleo (CP) y tiempo de exposición (TE)) y la interacción entre ellos durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Tratamientos	23	941866.160	40950.703	9.015	.000
CP	3	498189.076	166063.025	36.559	.000
T	5	403079.701	80615.940	17.748	.000
CP * T	15	40597.382	2706.492	.596	.873
Error	120	545076.500	4542.304		
Total	144	5125181.000			

Cuadro 9.3. Análisis de varianza del número de plantas al macollo de *Leersia hexandra* en suelo con petróleo, durante 180 días.

Fuente de variancion	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30					
Tratamiento	3	19.125	6.375	1.264	.313
Error	20	100.833	5.042		
Total	23	119.958			
60					
Tratamiento	3	8.125	2.708	.386	.765
Error	20	140.500	7.025		
Total	23	148.625			
90					
Tratamiento	3	64.500	21.500	1.152	.353
Error	20	373.333	18.667		
Total	23	437.833			
120					
Tratamiento	3	443.458	147.819	14.317	.000
Error	20	206.500	10.325		
Total	23	649.958			
150					
Tratamiento	3	515.000	171.667	3.862	.025
Error	20	889.000	44.450		

Total	23	1404.000			
180					
Tratamiento	3	1195.667	398.556	12.700	.000
Error	20	627.667	31.383		
Total	23	1823.333			

Cuadro 9.4. Análisis de varianza del número de plantas al macollo de *Leersia hexandra* por efecto de factores (concentración de petróleo (CP) y tiempo de exposición (TE)), durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Tratamientos	23	20707.104	900.309	46.212	.000
CP	3	1114.021	371.340	19.061	.000
TE	5	18461.229	3692.246	189.521	.000
CP * TE	15	1131.854	75.457	3.873	.000
Error	120	2337.833	19.482		
Total	144	66413.000			

Cuadro 9.5. Análisis de varianza de Tasa de Crecimiento Relativo de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
30					
Tratamiento	3	40.482	13.494	5.583	.006
Error	20	48.343	2.417		
Total	23	88.825			
60					
Tratamiento	3	12.945	4.315	3.774	.027
Error	20	22.865	1.143		
Total	23	35.810			
90					
Tratamiento	3	3.161	1.054	4.420	.015
Error	20	4.768	.238		
Total	23	7.930			
120					
Tratamiento	3	3.348	1.116	1.073	.383
Error	20	20.810	1.041		
Total	23	24.158			
150					
Tratamiento	3	2.491	.830	.327	.806
Error	20	50.828	2.541		
Total	23	53.320			
180					
Tratamiento	3	.958	.319	.427	.736
Error	20	14.972	.749		
Total	23	15.930			

Cuadro 9.6. Análisis de varianza de la Tasa de Crecimiento Relativo de *Leersia hexandra* por efecto de factores (concentración de petróleo (CP) y tiempo de exposición (TE)), durante 180 días.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Tratamiento	102.520	23	4.457	3.290	.000
CP	22.403	3	7.468	5.512	.001
TE	39.135	5	7.827	5.777	.000
CP * TE	40.982	15	2.732	2.016	.019

Error	162.587	120	1.355
Total	452.340	144	

Cuadro 9.7. Análisis de varianza de Longitud de raíz primaria, numero de raíz primaria, numero de raices secundarias en tramo basal, medio y apical de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
LRP					
Tratamiento	3	26.833	8.944	.040	.989
Error	20	4519.667	225.983		
Total	23	4546.500			
NRP					
Tratamiento	3	61100.458	20366.819	16.332	.000
Error	20	24941.500	1247.075		
Total	23	86041.958			
NRSB					
Tratamiento	3	12.333	4.111	1.068	.385
Error	20	77.000	3.850		
Total	23	89.333			
NRSM					
Tratamiento	3	47.000	15.667	1.384	.276
Error	20	226.333	11.317		
Total	23	273.333			
NRSA					
Tratamiento	3	307.667	102.556	3.299	.041
Error	20	621.667	31.083		
Total	23	929.333			

Cuadro 9.8. Análisis de varianza de materia seca aérea, materia seca radical y materia seca total de *Leersia hexandra* en suelos con petróleo, durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
MSA					
Tratamiento	3	47.546	15.849	3.667	.030
Error	20	86.432	4.322		
Total	23	133.978			
MSR					
Tratamiento	3	56.969	18.990	11.452	.000
Error	20	33.163	1.658		
Total	23	90.131			
MST					
Tratamiento	3	19.524	6.508	.876	.470
Error	20	148.652	7.433		
Total	23	168.176			

Apéndice B. Análisis de varianza de las respuestas microbiológicas en fitorremediación usando *Leersia hexandra* y atenuación natural contaminadas con petróleo

Cuadro 9.9. Análisis de varianza de bacterias heterótrofas, bacterias hidrocarbonoclastas, bacterias desnitrificantes, hongos heterótrofos y microalgas en suelos con petróleo a los 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P > F
BH					
Tratamiento	3	3584938406602.769	1194979468867	.654	.585
Error	44	80394331185384.360	1827143890576		
Total	47	83979269591987.120			
BHCT					
Tratamiento	3	80610220745.569	26870073581.85	1.595	.204
Error	44	741464235572.069	16851459899.36		
Total	47	822074456317.638			
BD					
Tratamiento	3	1450615733.679	483538577.893	23.134	.000
Error	44	919668551.855	20901557.997		
Total	47	2370284285.534			
HH					
Tratamiento	3	208014297.526	69338099.175	2.480	.073
Error	44	1229952536.932	27953466.748		
Total	47	1437966834.458			
Microalgas					
Tratamiento	3	2248153907226.563	749384635742.1	51.643	.000
Error	44	638478514322.917	14510875325.52		
Total	47	2886632421549.479			

Cuadro 9.10. Análisis de varianza de bacterias heterótrofas, bacterias hidrocarbonoclastas, bacterias desnitrificantes, hongos heterótrofos y microalgas por efecto de factores (concentración de petróleo (CP) y tipo de tecnología (TT)), durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F calculada	P > F
BH					
CP	3	3584938406602.757	1194979468867.586	1.330	.000
TT	1	4425292180220.682	4425292180220.682	4.925	.278
CP * TT	3	40028730207994.170	13342910069331.390	14.850	.032
BHCT					
CP	3	80610220745.569	26870073581.856	14.797	.000
TT	1	609644468633.571	609644468633.571	335.712	.000
CP * TT	3	59180859257.973	19726953085.991	10.863	.000
BD					
CP	3	1450615733.679	483538577.893	292.067	.000
TT	1	404957316.219	404957316.219	244.603	.000
CP * TT	3	448488376.496	149496125.499	90.299	.000
HH					
CP	3	208014297.526	69338099.175	3.528	.023
TT	1	61292342.821	61292342.821	3.118	.085
CP * TT	3	382455456.060	127485152.020	6.486	.001
Microalgas					
CP	3	2248153907226.562	749384635742.187	192.658	.000
TT	1	101786617513.021	101786617513.021	26.168	.000
CP * TT	3	381103133789.062	127034377929.687	32.659	.000

Apéndice C. Análisis de varianza de las respuestas químicas usando dos tecnologías biológicas para la recuperación de suelos contaminados con petróleo.

Cuadro 9.11. Análisis de varianza en degradación de hidrocarburos totales del petróleo y mineralización del carbono en suelos contaminados con petróleo a los 180 días.

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Degradación					
Tratamiento	24454.936	3	8151.645	14.767	.000
Error	24288.584	44	552.013		
Total	48743.521	47			
Mineralización					
Tratamiento	30.132	3	10.044	11.792	.000
Error	37.479	44	.852		
Total	67.612	47			

Cuadro 9.12. Análisis de varianza en degradación de hidrocarburos totales del petróleo y mineralización del carbono por efecto de factores (concentración de petróleo (CP) y tipo de tecnología (TT)), durante 180 días.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrado	Cuadrado medio	F calculada	P > F
Degradación					
CP	3	24454.936	8151.645	150.139	.000
TT	1	15417.084	15417.084	283.956	.000
CP * TT	3	6699.747	2233.249	41.133	.000
Mineralización					
CP	3	30.132	10.044	13.848	.000
TT	1	.285	.285	.393	.534
CP * TT	3	8.181	2.727	3.760	.018