



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE EDAFOLOGÍA

FITORREMEDIACIÓN DE *Helianthus annuus* L. DE UN SUELO CONTAMINADO CON UN HIDROCARBURO DE PETRÓLEO (GASOLINA), ASISTIDA CON BACTERIAS Y HONGOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

PATSY JACKELINE ALMAZAN CASTAÑEDA

T E S I S
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

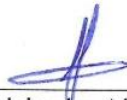
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: **Fitorremediación de *Helianthus annuus* L. de un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina), asistida con bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal**, realizada por la estudiante: **Patsy Jackeline Almazan Castañeda**, 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
EDAFOLOGÍA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



Dr. Alejandro Alarcón

ASESOR



Dr. Ronald Ferrera Cerrato

ASESOR



Dr. Oscar García Barradas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, México, junio de 2023

FITORREMEDIACIÓN DE *Helianthus annuus* L. DE UN SUELO CONTAMINADO CON UN HIDROCARBURO DE PETRÓLEO (GASOLINA), ASISTIDA CON BACTERIAS Y HONGOS PROMOTORES DEL CRECIMIENTO VEGETAL

**Patsy Jackeline Almazan Castañeda, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

RESUMEN

La fitorremediación es una alternativa para limpiar suelos contaminados utilizando plantas y sus microorganismos asociados. El presente trabajo evaluó la fitotoxicidad y la fitorremediación de un suelo contaminado con gasolina con plantas de girasol (*Helianthus annuus* L.) asistida con bacterias rizosféricas nativas. Esta investigación contempló tres fases experimentales partiendo de un suelo recolectado de Palmarito (Puebla), artificialmente contaminado con gasolina. La primera fase evaluó la germinación de semillas de girasol y su crecimiento en un suelo contaminado (0, 200, 400, 800, 1,600, 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹), observándose la germinación y la tolerancia de las plántulas en todas las concentraciones de gasolina, a los 20 días. La segunda fase aisló bacterias totales del suelo contaminado, y se caracterizaron mediante pruebas bioquímicas relacionadas con el crecimiento vegetal y se identificaron molecularmente. La gasolina inhibió el crecimiento bacteriano, y se seleccionaron 10 cepas con capacidad promotora del crecimiento vegetal (en su mayoría gram-negativas en forma de bacilo, productoras de indoles y sideróforos, solubilizadoras de fosfatos, y fijadoras de nitrógeno atmosférico), sobresaliendo los géneros *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Priestia*, *Massilia* y *Sphingobium*. La tercera fase consistió de un bioensayo de fitorremediación del suelo contaminado (0, 1,600 y 3,200 mg kg⁻¹) inoculando plantas con las 10 bacterias aisladas de la fase 2, aplicadas en consorcio. A los 60 días, a pesar de no influir en el crecimiento vegetal, las bacterias disminuyeron significativamente la presencia del contaminante en el suelo (~50 % remoción). La inoculación de girasol con bacterias nativas es una alternativa para reducir la contaminación de gasolina en el suelo.

Palabras clave: *Helianthus annuus*, contaminante orgánico, biorremediación, suelo contaminado.

PHYTOREMEDIATION OF *Helianthus annuus* L. FROM SOIL CONTAMINATED WITH PETROLEUM HYDROCARBON (GASOLINE), ASSISTED BY BACTERIA AND PLANT GROWTH PROMOTING FUNGI

**Patsy Jackeline Almazan Castañeda, M.C.
Colegio de Postgraduados, 2023**

ABSTRACT

Phytoremediation is an alternative for cleaning up contaminated soils by utilizing plants and associative microorganisms. This study evaluated the phytotoxicity and phytoremediation of a gasoline-contaminated soil by sunflower plants (*Helianthus annuus* L.) assisted with native rhizosphere bacteria. The research consisted on three experimental phases based on a soil collected from Plamarito (Puebla) which was artificially contaminated with gasoline. First phase evaluated the seed germination and seedling emergence under a contaminated soil (0, 200, 400, 800, 1,600, 2,400 and 3,200 mg kg⁻¹); during 20 days, seed germination and seedling tolerance was achieved at all concentrations. Second phase isolated bacteria from the contaminated soil, which were characterized by means of biochemical tests related to plant growth promotion, and molecularly identified. Gasoline inhibited bacterial growth, and 10 potential plant growth promoting bacteria were isolated (most of them Gram-negative and rod-shaped, with indole and siderophores production, phosphate solubilization, and atmospheric nitrogen fixation capacity). Bacteria belonged to genera such as *Bacillus*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Priestia*, *Massilia* and *Sphingobium*. Third phase consisted on a bioassay for phytoremediating a gasoline-contaminated soil (0, 1,600 and 3,200 mg kg⁻¹) by inoculating sunflower plants with the 10 bacteria obtained from phase 2, as a bacterial consortium. After 60 days, in spite of not having influenced on plant growth, bacterial inoculation significantly diminished the soil contaminant (~50 % removal). Inoculation of sunflower plants with the 10 native bacteria allowed the reduction of the gasoline contamination in soil.

Key words: *Helianthus annuus*, organic pollutant, bioremediation, soil contamination.

DEDICATORIA

A mi mami Tirsa Castañeda por ser la mejor persona que la vida pudo darme como madre y amiga. Por tu perseverancia, paciencia, amor, cariño y apoyo.

A papá Daniel, a mis hermanas Elideth, Celin y sus bebés, Maggie, Mitzy y Naim.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento otorgado para seguir mis estudios de posgrado.

Al Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, al posgrado de Edafología, Área de Microbiología de Suelos, al laboratorio de fijación de nitrógeno y al laboratorio de micorrizas. Por brindarme la oportunidad de realizar una nueva etapa en mi vida académica.

Mis más sinceras e infinitas gracias a mis padres, Tirsa y Daniel, por que son los seres más maravillosos que la vida me ha dado.

A mi familia, por su apoyo en todo momento. En especial a mis sobrinos, a Maggie, Zoé, Mitzy, Naim, Alessandra, Dulce, Alisson y a los que estan por venir, porque sus sonrisas son mi mayor motivación.

Al Dr. Alejandro Alarcón por haberme permitido realizar mis estudios de posgrado bajo su supervisión, agradezco su atención y su tiempo.

Agradezco a los que forman parte de mi consejo, al Dr. Ronald, al Dr. Oscar, por su disponibilidad y su paciencia.

A la Dra. Caliope por toda su amistad, ayuda, atención, paciencia, tiempo y disponibilidad en cada paso de esta investigación.

A la Dra. Sandra Cortés y a la Dra. María Remedios Mendoza por la ayuda brindada.

Al Dr. Marco Polo Carballo Sánchez por ayudarme a resolver las dificultades técnicas y por sus observaciones.

A Luis Ernesto Estrada García por su apoyo incondicional en todo momento.

A las familias que me abrieron las puertas de su hogar y me hicieron sentir como en casa. A todas aquellas lindas personas que me dieron su hermosa y sincera amistad, por hacer más amenos mis días, muchas gracias.

Al equipo de micorrizas dirigido por el Dr. Jesús Pérez Moreno, Dra. Magdalena, Dr. Faustino y a sus estudiantes.

A todas las personas que me apoyaron y ayudaron directa e indirectamente en la realización de esta investigación.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iii
ABSTRACT.....	iv
DEDICATORIA.....	v
AGRADECIMIENTOS.....	vi
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
2.1 Hidrocarburos de petróleo.....	4
2.2 Gasolina.....	5
2.3 Criterios para considerar un suelo contaminado.....	6
2.4 Contaminación del suelo por hidrocarburos de petróleo en México.....	7
2.5 Efecto de los hidrocarburos de petróleo (HP) en el suelo.....	9
2.6 Impacto ecológico de los hidrocarburos.....	10
2.7 Bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos.....	12
2.8 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la fitorremediación.....	13
2.9 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre.....	17
2.10 Hongos micorrízicos arbusculares en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.....	19
2.11 Técnicas de remediación de suelos contaminados.....	23
2.11.1. Biorremediación.....	24
2.11.2. Fitorremediación.....	25

2.11.3.	Fitoextracción	27
2.11.4.	Fitoestabilización.....	27
2.11.5.	Fitovolatilización	29
2.11.6.	Fitodegradación.....	29
2.11.7.	Rizofiltración	30
2.12	<i>Helianthus annuus</i> L.....	30
III.	OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	33
3.1.	Objetivo general	33
3.2.	Objetivos particulares.....	33
3.3.	Hipótesis general	33
3.4.	Hipótesis particulares	33
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
4.1.	Fase 1. Germinación y crecimiento del girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) en suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina) en diferentes concentraciones	35
4.2.	Fase 2. Caracterización e identificación de bacterias nativas aisladas de un suelo contaminado con gasolina con potencial para la promoción del crecimiento vegetal.....	37
4.3.	Fase 3. Fitorremediación de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina utilizando <i>Heliantus annuus</i> y bacterias tolerantes a hidrocarburos (gasolina).....	41
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	48

5.1. Fase 1. Germinación y crecimiento del girasol (<i>Helianthus annuus</i> L.) en suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina) en diferentes concentraciones	48
5.2. Fase 2. Caracterización e identificación de bacterias nativas aisladas de un suelo contaminado con gasolina con potencial de promotoras de crecimiento vegetal	52
5.3. Fase 3. Fitorremediación de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina utilizando <i>Heliantus annuus</i> y bacterias tolerantes a hidrocarburos (gasolina).....	58
VI. CONCLUSIONES	74
VII. LITERATURA CITADA	75
APÉNDICE.....	102

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Cuadro comparativo de los niveles de hidrocarburos permisibles en suelo agrícola establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, y resultados de niveles de hidrocarburos en suelo después de un derrame.	8
Cuadro 2. Microorganismos aplicados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.	14
Cuadro 3. Uso de BPCV para la desintoxicación de suelos contaminados.	16
Cuadro 4. Parámetros esenciales para que se lleve a cabo la biorremediación (Speight, 2017).	25
Cuadro 5. Tratamientos establecidos en el experimento.	47
Cuadro 6. Caracterización macro y microscópica de 10 cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina.....	53
Cuadro 7. Identificación molecular de las cepas aisladas de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina.	56

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Composición elemental básica del petróleo crudo, que típicamente exhibe poca variación de fuente a fuente (Stauffer et al., 2008)..... 4
- Figura 2. Colonización radical por hongos micorrízicos arbusculares (Pandey et al., 2019)..... 20
- Figura 3. Representación de los impactos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las bacterias beneficiosas sobre el rendimiento de las plantas y la fertilidad del suelo. A la izquierda: una representación visual del ciclo de vida de la HMA y los factores que afectan las diferentes etapas de desarrollo de la HMA; a la derecha: bacterias auxiliares de micorrizas (HM) y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) que interactúan sinérgicamente con la HMA. (Giovannini et al., 2020). 22
- Figura 4. Los principales procesos naturales subyacentes a la fitorremediación (Mahjoub, 2013). 28
- Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), establecidas en suelo agrícola contaminado con gasolina en condiciones de invernadero. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar, n = 5..... 49
- Figura 6. Comportamiento del girasol (*Helianthus annuus*), establecidas en suelo agrícola contaminado con gasolina, después de 20 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Altura de la planta (A), longitud radical (B), y biomasa seca total (C). Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Medias + error estándar, n = 5..... 50

- Figura 7. Comportamiento de la población de BFNVL aisladas de un suelo contaminado artificialmente con tres concentraciones de gasolina, después de 20 días. UFC g⁻¹ = Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo seco. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar, n = 3. 54
- Figura 8. Longitud radical (A), Altura (B) y relación raíz/parte aérea (C) de *Helianthus annuus* crecida en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9. 60
- Figura 9. Número de hojas de *Helianthus annuus* en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9. 62
- Figura 10. Área foliar (A) y área foliar específica (B) de *Helianthus annuus* crecidas en suelos contaminados artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9. 64
- Figura 11. Biomasa seca aérea (A), biomasa seca raíz (B) y biomasa seca total (C) de *Helianthus annuus* en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9. 66
- Figura 12. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (A) y Colonización micorrizica (B) de *Helianthus annuus* crecida en suelo contaminado artificialmente con gasolina

(mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9..... 68

Figura 13. Efecto de *Helianthus annuus* sobre un suelo contaminado artificialmente con gasolina, Contenido de gasolina disponible (A) y Porcentaje de gasolina removida con base a un suelo control sin ningún tratamiento de biorremediación (B). Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 3..... 72

I. INTRODUCCIÓN

En el último siglo, la demanda de la creciente población mundial ha exigido el aumento en la industrialización y la urbanización generando contaminantes de origen antropogénico siendo los ecosistemas los más afectados por el ritmo acelerado del desarrollo humano (de Lorenzo, 2019). El sector petroquímico es uno de los sectores que causa contaminación en agua y suelo (Cocârță *et al.*, 2017) durante las actividades de extracción, transporte y la refinación del petróleo, así como por fugas accidentales derivadas del mal manejo, estructuras en mal estado, robo de hidrocarburos (Castro-Mancilla *et al.*, 2019). Lo anterior afecta la biodiversidad desde la extracción del petróleo así como durante el proceso de exploración y de la perforación de los pozos y la prospección, además se causa la fragmentación del paisaje por la tala de árboles y por el cambio de uso de suelo (Harfoot *et al.*, 2018).

La industria petrolera tiene una producción a nivel mundial de dos mil millones de toneladas de petróleo; y entre 45 a 50 millones de toneladas (alrededor del 2 %) tienen un destino final en el ambiente (Jabbarov *et al.*, 2019) lo que genera afectaciones a la flora, fauna, cuerpos de agua, suelo, y a la salud humana al provocar enfermedades crónicas potencialmente cancerígenas, mutagénicas y teratogénicas (Chan-Quijano *et al.*, 2020). En el suelo, se afecta a las poblaciones microbianas que son parte importante del ecosistema y son claves para los procesos biogeoquímicos (Hazim y Al-Ani, 2019).

Para la descontaminación, existen tratamientos de remediación físicos y químicos que favorecen la dispersión del contaminante pero no de su remoción; éstas alternativas son costosas, pueden causar daños al ambiente e impedir la recuperación de ciertos hábitats. Por lo anterior, se

acude al uso de biotecnologías amigables con el ambiente que promuevan los procesos naturales de remoción de contaminantes, como es el uso de la biorremediación (Hou *et al.*, 2021).

La biorremediación es la tecnología de biorestauración de agua, suelo y aire, que se sustenta específicamente con el potencial de los organismos vivos para degradar contaminantes de forma parcial y/o total, a compuestos menos tóxicos (Garzón *et al.*, 2017; Rodríguez y Rodríguez, 2019). La fitorremediación es una alternativa viable de limpieza de los suelos contaminados (Guevara Espinosa *et al.*, 2018) mediante plantas y microorganismos asociados, para extraer, acumular, remover, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Arias-Trinidad *et al.*, 2017).

Este potencial de la microbiota vinculada con la flora se aprovecha para degradar contaminantes orgánicos (Stamatiu-Sánchez *et al.*, 2015), por su alta diversidad y capacidad de adaptación metabólica, que les confiere distintos mecanismos de acción sobre los contaminantes. Individualmente o en consorcios, los microorganismos pueden degradar sustratos y metabolitos que pueden generarse a partir de su aplicación. Por lo tanto, las técnicas como la fitorremediación permiten aprovechar la capacidad de las plantas y de los microorganismos para realizar procesos de descontaminación inducida (Ordoñez Burbano *et al.*, 2018).

La simbiosis de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA; Phylum Glomeromycota) se establece con más del 80 % de las raíces de plantas terrestres (Schübler *et al.*, 2001), donde cada uno de los simbioses adquieren beneficios: los HMA reciben carbono de las plantas y éstas captan más eficientemente nutrientes como fósforo (P) y nitrógeno (N) a través de las hifas fúngicas. Además, las plantas micorrizadas son más tolerantes a organismos patógenos y a la sequía (Pérez-

Moreno y Read, 2004; Di Barbaro *et al.*, 2017), y se estima que estos hongos son pieza fundamental para recuperar y restaurar ecosistemas degradados y/o perturbados (Fall *et al.*, 2022).

Además de mejorar el crecimiento de las plantas, los HMA inducen la síntesis de enzimas oxidativas que favorecen la fitodegradación de hidrocarburos de petróleo en el suelo, indicando que la fitorremediación asistida con HMA, es una biotecnología conveniente para suelos contaminados con compuestos orgánicos (Xun *et al.*, 2014).

Para garantizar el éxito de los tratamientos de fitorremediación se requiere identificar aquellas especies vegetales que toleren y degraden los contaminantes, y que produzcan abundante biomasa, puesto que existen factores físicos y químicos que son cruciales para obtener resultados favorables (García Ávila *et al.*, 2018).

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta ampliamente reconocida como fitorremediadora, ya que son difícilmente afectadas por los contaminantes inorgánicos (Prasad, 2007; Gutiérrez-Espinoza *et al.*, 2011; Adejube *et al.*, 2017; Alaboudi *et al.*, 2018; Zehra *et al.*, 2019); además, tiene potencial para acumular compuestos tóxicos ya que es una especie que produce abundante biomasa y mejora las condiciones del suelo contaminado, y junto con la presencia de microorganismos simbióticos, podrían usarse como una alternativa efectiva, económica y ecológica para acelerar la eliminación de contaminantes orgánicos del suelo (Rani *et al.*, 2019). Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación es evaluar la capacidad de adaptación y fitorremediación de *Helianthus annuus* en un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina), asistida con bacterias tolerantes a hidrocarburos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Hidrocarburos de petróleo

Los hidrocarburos de petróleo (HP), químicamente, son sustancias complejas formadas principalmente de moléculas de carbono (83-87 % C) e hidrógeno (10-14 % H) y, en menores proporciones, lo integran otros elementos como azufre (0.05-6 % S) y nitrógeno (0.1-2 % N), oxígeno (0.1-2 % O), metales y sales (<0.1 %) (Pardo *et al.*, 2004; Dembicki, 2017) (Figura 1). Los HP pueden estar en forma de gas natural o líquido, esto depende de la composición, condición de presión, temperatura, profundidad del reservorio y el tipo de roca (Oyeneyin, 2015).

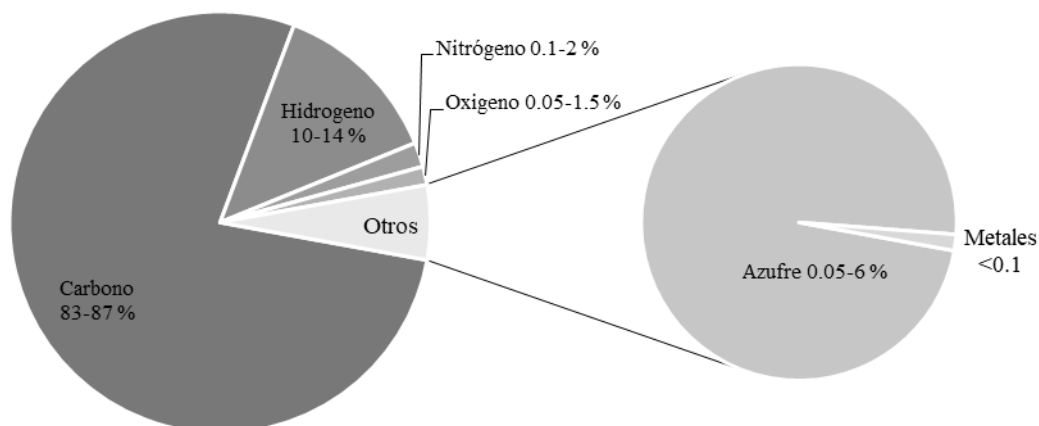


Figura 1. Composición elemental básica del petróleo crudo, que típicamente exhibe poca variación de fuente a fuente (Stauffer *et al.*, 2008).

Los HP están conformados de hidrocarburos de cadena corta como parafinas, compuestos alicíclicos y aromáticos, y compuestos no hidrocarbonados como ácido nafténico, fenol, tiol, metaloporfirina, asfalteno y nitrógeno heterocíclico, y compuestos de azufre (Priyadarshane *et al.*, 2022), y son compuestos tóxicos clasificados como contaminantes prioritarios. Los dos

componentes principales de HP que han sido registrados como recalcitrantes y perjudiciales para la salud son los hidrocarburos alifáticos y los aromáticos. Los hidrocarburos alifáticos no saturados (con estructuras sencillas) son fácilmente degradados por los microorganismos, en cambio los hidrocarburos alifáticos ramificados de grandes cadenas e hidrocarburos aromáticos no se degradan fácilmente al poseer estructuras más complejas (Al-Hawash *et al.*, 2018).

Con el progreso de la humanidad, el consumo de HP incrementa en el mundo, esto va acompañado con la contaminación del ambiente causada por los HP y sus derivados durante el proceso de su refinación, en el proceso de materias primas y en el transporte (Jabbarov *et al.*, 2019). Además, los HP se caracterizan por su estabilidad y persistencia en el ambiente, por lo cual resultan ser muy tóxicos debido a los riesgos potenciales, impactos peligrosos en los hábitats terrestres y acuáticos así como para cualquier otro organismo vivo (Ambaye *et al.*, 2022).

2.2 Gasolina

La gasolina es una mezcla compleja de diversos compuestos orgánicos del grupo de los alcanos de cadena corta (C6-C10), algunos pueden ser susceptibles a permanecer en el subsuelo, con un punto de ebullición bajo (60-170 °C). Los compuestos de bajo peso molecular que integran a la gasolina tienen la particularidad de atravesar las membranas celulares y degradar la integridad de la membrana, deteriorando con ello a la célula vegetal (Daryabeigi Zand y Hoveidi, 2018). La gasolina puede variar en su composición por el origen del petróleo crudo y el proceso de refinación y en contacto con el suelo, algunos de sus compuestos puede evaporarse, disolverse, adherirse a las partículas de suelo o bien, ser movilizadas por el agua por lo que otros sitios son afectados con respecto al sitio donde se presentó el derrame original (Daryabeigi Zand y Hoveidi, 2016).

2.3 Criterios para considerar un suelo contaminado

La FAO (2019) describe como contaminación del suelo a la presencia de un compuesto químico o una sustancia fuera de sitio y/o que esté presente en una concentración más alta de lo normal, que tiene efectos adversos sobre cualquier organismo al que no está destinado. La contaminación del suelo es uno de los problemas ambientales con mayor importancia, que va de la mano con la contaminación del aire y del agua, siendo las actividades antropogénicas las principales que ha generado las emergencias ambientales en nuestro mundo (Azeez *et al.*, 2021).

Para determinar un suelo contaminado por hidrocarburos es necesario realizar una evaluación de riesgos bajo a las políticas de regulación. La norma ISO 16703 indica un método aprobado internacionalmente para estimar las concentraciones de hidrocarburos totales de petróleo (HTP) (C10 a C40), y la evaluación en el suelo se basa en un procedimiento analítico específico para cuantificar la cantidad de HTP en los ecosistemas (Pinedo *et al.*, 2013).

En México, las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) establecen criterios y concentraciones permitidas conforme a las características propias del sitio, y están basadas en la biodisponibilidad de los contaminantes para determinar la concentración objeto a la cual se debe remediar un suelo. Los componentes pueden estar presentes en el suelo de manera natural y en ocasiones en concentraciones tales que puedan representar un riesgo para la salud de la población humana y de los ecosistemas, estas normas permiten establecer criterios para determinar las concentraciones máximas permisibles presentes en el suelo (SEMARNAT, 2007).

La NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 establece los límites máximos permisibles de los hidrocarburos en suelos y los lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. En esta norma se indican los productos asociados a los

derrames de hidrocarburos para los que se establecen los límites máximos permisibles en el suelo según la actividad que se realice en ellos (1. agrícola, forestal, pecuaria y de conservación; 2. residencial y recreativa; y 3. Industrial y comercial) (Arias-Trinidad *et al.*, 2017).

Las leyes mexicanas establecen que, “*en materia de protección industrial, operativa y ambiental, tanto los cesionarios como los contratistas serán responsables de los desechos, derrames de petróleo u otros daños resultantes. De nuevo, quien contamina paga. Además, el desarrollo del país debe promoverse con responsabilidad social y protección ambiental*” (Chan-Quijano *et al.*, 2020).

2.4 Contaminación del suelo por hidrocarburos de petróleo en México

El petróleo sigue siendo una de las principales fuentes de energía para el desarrollo económico y social de un país; sin embargo, sigue siendo también una de las fuentes de contaminantes orgánicos derivada por derrames y fugas accidentales en el almacenamiento y transporte. Además, su presencia en la litosfera causa efectos negativos para planta, animales y la sociedad (Adipah, 2019). Por ejemplo, se estima que a nivel mundial, la fuga de petróleo natural es de 600,000 toneladas métricas anuales (Sui *et al.*, 2021).

México se encuentra con el décimo lugar a nivel mundial en producción de barriles de petróleo con una producción de 1,813 barriles de petróleo diarios. Al ser alta la producción de petróleo se presenta accidentes como derrames de tanques de petróleo, roturas de tuberías, incidentes y robos en el transporte del petróleo. En el 2018 reportaron 1,599.36 hectáreas (ha) contaminadas por hidrocarburos de las cuales solo 61 han pasado por un proceso de remediación (Chan-Quijano *et al.*, 2020). Acerca del robo de combustible, en México durante 2012-2016 aumentó en un 466 %, reportando 1,283.8 ha de suelo contaminado por 213 fugas y derrames, según Petróleos Mexicanos

(Arroyo *et al.*, 2021). Estas actividades ilícitas han generado pérdidas económicas, tan solo entre 2016-2018 el robo de combustible generó un quebranto económico de aproximadamente de 147 mil millones de pesos (Peschard *et al.*, 2021).

Entre los diferentes derrames ocurridos en el territorio mexicano, en particular, en el año 2019, la Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (PROFEPA) reportó los niveles de contaminación del suelo por arriba de los límites permisibles (Cuadro 1) establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, lo anterior derivado del derrame y explosión por una toma ilegal en el poliducto Tuxpan-Tula en la localidad de San Primitivo, municipio de Tlahuelilpan, Hidalgo. Considerando este reporte, esta investigación fundamenta el uso de las concentraciones utilizadas en las subconsecuentes fases experimentales.

Cuadro 1. Cuadro comparativo de los niveles de hidrocarburos permisibles en suelo agrícola establecidos por la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, y resultados de niveles de hidrocarburos en suelo después de un derrame.

Hidrocarburos específicos	Contenido estimado (mg kg ⁻¹)	Límite permisible* (mg kg ⁻¹)
Hidrocarburos totales del petróleo en su fracción ligera	3,218.56	200
BTEX	16.82	6.00
Etilbenceno	118	10
Tolueno	402.06	40.0
Xileno	582.60	40.0

2.5 Efecto de los hidrocarburos de petróleo (HP) en el suelo

Debido a accidentes en las actividades operacionales, en el transporte, la exploración o durante el procesamiento, las fugas y los derrames de HP, se provoca la contaminación en suelos y aguas subterráneas (Lima *et al.*, 2020), generando efectos tóxicos para cualquier organismo vivo (Tian *et al.*, 2018; Ali *et al.*, 2020). El efecto de la contaminación por HP en el suelo es diferente, dependiendo del tipo de hidrocarburo derramado, el tamaño del derrame, las condiciones climáticas del sitio del derrame y el tipo de ecosistema contaminado (Marín Velásquez, 2016).

Aproximadamente, el 80 % de los suelos están contaminados por algún producto derivado de petróleo, por lo cual se alteran las propiedades físicas, químicas y biológicas de manera negativa, disminuye la porosidad y la aireación del suelo (Ali *et al.*, 2020; Ahmad *et al.*, 2020; Ergozhin *et al.*, 2020). Las propiedades hidrofóbicas de los HP reducen la infiltración de agua, incrementan la materia orgánica acidificando el sitio, afectan el pH, la capacidad de intercambio catiónico del suelo (Castro-Mancilla *et al.*, 2019; Koshlaf y Ball, 2017) y el contenido mineral, especialmente de el contenido de carbonatos y sal (Jabbarov *et al.*, 2019).

A su vez, estos compuestos alteran la composición y la dinámica de la comunidad microbiana del suelo y las actividades enzimáticas, alterando con ello, la disponibilidad de nutrientes para las plantas (Ambaye *et al.*, 2022). Además, estos compuestos hidrofóbicos tienen la particularidad de secuestrarse con el tiempo en la matriz del suelo al adherirse a la materia orgánica, o difundirse a través de los poros en el suelo (Tang *et al.*, 2012). A su vez, el suelo está propenso a procesos de meteorización, los cuales son favorables para la intemperización de los HP ante condiciones extremas, por ejemplo, temperaturas mayores a 34.9 °C, con humedad relativa del 58 % y radiaciones solares mayores a 584.7 mW h/cm² (AlKaabi *et al.*, 2020).

Cuando los hidrocarburos están en el suelo, los más pesados (p. ejemplo, aceites), se infiltran verticalmente, y penetran más lentamente hasta la superficie del agua subterránea, mientras que los más ligeros (benceno, tolueno, etilbenceno y xilenos), son volátiles y altamente móviles en el ambiente y en el perfil del suelo dependiendo de su tipo (Adipah, 2019; Chan-Quijano *et al.*, 2020).

Contrario a los contaminantes inorgánicos (p. ej. los metales pesados) que se bioacumulan en las plantas, los contaminantes orgánicos pueden ser biotransformados por la actividad microbiana y pasar a ser parte de la materia orgánica, disminuyendo así su biodisponibilidad (Klimek *et al.*, 2016; Kuppusamy *et al.*, 2020; Bykova *et al.*, 2021). A medida que pasa el tiempo, los HP son estabilizados en el material orgánico, lo que reduce su accesibilidad, biodisponibilidad, toxicidad biológica, incrementando así su biodegradabilidad (Pérez Vargas *et al.*, 2017; Ahmad *et al.*, 2020).

2.6 Impacto ecológico de los hidrocarburos

El resultado de accidentes y/o el mal manejo de la explotación petrolera resulta en la contaminación de suelos, agua y aire (Pérez Robles *et al.*, 2015). La contaminación del suelo por hidrocarburos se tienen daños ambientales entre los que se encuentran la pérdida de hábitats, los cambios del paisaje (Marín Velásquez, 2016), y al mismo tiempo, tienen efectos nocivos en la salud humana y en la vida silvestre, al estar expuestos a compuestos tóxicos, mutagénicos y cancerígenos (Cubillos *et al.*, 2014). El contacto recurrente a estos compuestos puede causar daño hepático, anemia hemolítica, pérdida de peso, deterioro gastrointestinal, deterioro del sistema inmunológico y afectar el sistema nervioso, causando mareos, dolores de cabeza, fatiga (Koshlaf y Ball, 2017).

Por otra parte, cuando los HP entran en contacto con el suelo se crean condiciones deficientes para sostener con vida de cualquier organismo. Los HP en el suelo tienen efectos negativos en las comunidades microbianas que no pueden oxidar los HP, alteración con ello, la fertilidad del suelo. Los microorganismos son afectados por asfixia generada por el bloqueo de la difusión del aire en los poros creando condiciones anaeróbicas. Lo anterior, disminuye la tasa de respiración, la diversidad microbiana y la densidad de bacterias (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016).

Los microorganismos tienen la capacidad de modificar su entorno aun en presencia de los HP, ya que poseen diversos mecanismos para catabolizarlos. Las relaciones microbianas confieren ventajas competitivas en los nichos ecológicos y para sobrevivir ante condiciones adversas. De manera individual, los microorganismos favorecen la oxidación de los HP, mientras en comunidades microbianas colaboran en relaciones simbióticas y sinérgicas para producir metabolitos y moléculas bioactivas primarias (tensoactivos) que favorecen la miscibilidad de los HP (Truskewycz *et al.*, 2019).

Por su naturaleza hidrofóbica, los HP impiden el suministro de agua al sistema radical de las plantas, reduciendo la longitud de la raíz y el área foliar, inhibiendo por ello, la actividad fotosintética y la productividad vegetal, y en consecuencia, provocando la muerte de la planta. Además, el suelo permanece inadecuado para la emergencia de semillas y el crecimiento de las plantas (Rodríguez-Rodríguez *et al.*, 2016; Bykova *et al.*, 2021). La presencia de los HP causa deformaciones en las hojas, acumulación de H₂O₂, estrés oxidativo, incluso la muerte de células vegetales, inhibe el crecimiento de los brotes de raíces, la longitud de las hojas y el retraso en la expansión celular; también provoca que las plantas presenten clorosis, o necrosis, siendo más propensas a plagas y enfermedades (García-López *et al.*, 2006; Ambaye *et al.*, 2022). La muerte de la cubierta vegetal y el secado de los árboles se presenta ante altos niveles de contaminación de

los HP en el suelo (Lifshits *et al.*, 2021), debido a la reducción de la fertilidad del suelo, haciéndolo no apto para la producción agrícola y afectando el aspecto socioeconómico de las personas aledañas (Abdul-Ameer Ali, 2019; Zuzolo *et al.*, 2022).

2.7 Bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos

La microbiota nativa de sitios contaminados con HP generan mecanismos para degradarlos y usarlos como su principal fuente de energía y fuente de carbono (C) para su crecimiento y reproducción (Das y Chandran, 2011). Los microorganismos son fundamentales para degradar los HP al producir enzimas (oxigenasas y dioxigenasas), y secretar agentes bioemulsificantes que facilitan la disolución del contaminante de sustratos no polares e incrementan la afinidad entre las superficies celulares y las interfaces aceite-agua. Otros factores que afectan la degradación de los HP se refiere a su composición química, a la abundancia y diversidad de microorganismos, y a las condiciones ambientales favorables para mantener biodisponibles a los contaminantes para ser transformados por los microorganismos (Udgire *et al.*, 2015; Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021).

Microorganismos como microalgas, hongos, levaduras y bacterias tienen la capacidad de degradar contaminantes orgánicos, al ser microorganismos omnipresentes pueden también ser aplicados en procesos de biorremediación *in situ* o *ex situ*. Algunas poblaciones de bacterias nativas son ideales para mineralizar los contaminantes y con ello, favorecer una biorremediación exitosa a largo plazo. Las bacterias tienen una gran estabilidad y adaptación fisiológica a las condiciones ambientales, lo cual es indispensable para la degradación de HP en comparación con especies bacterianas o consorcios exógenos, debido a que no soportan el estrés abiótico para metabolizar y crecer en el sitio contaminado (Yan *et al.*, 2013; Bekele *et al.*, 2022). Algunos géneros bacterianos capaces de degradar HP son *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*,

Micrococcus, *Pseudomonas* y *Rhodococcus* (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021) (Cuadro 2). La diversidad y abundancia de estas bacterias son necesarias para degradar los HP debido a que difícilmente un grupo bacteriano es capaz de tener la actividad enzimática necesaria para degradarlos (Barrios-San Martín *et al.*, 2012). Un suelo sujeto a alteraciones se puede evaluar mediante la actividad microbiana (biomasa y actividad enzimática), las cuales tan influidas por parámetros y perturbaciones físico-químicas y ambientales (Alrumman *et al.*, 2015).

Los parámetros físicos y químicos del suelo como: presencia de nutrientes (N, P), el contenido de oxígeno (O₂), presión parcial de gases, temperatura, pH, contenido de sales, tamaño (Diámetro), la distribución de partículas, capacidad reguladora del suelo, la solubilidad, concentración, cantidad y biodisponibilidad de los contaminantes, son los responsables de la tasa de degradación por los microorganismos (Arrieta Ramírez *et al.*, 2012).

2.8 Bacterias promotoras de crecimiento vegetal en la fitorremediación

El agua, el aire y el suelo están contaminados por compuestos orgánicos o inorgánicos, por consecuencia del aumento de la población, la industrialización, la urbanización y el abuso de fertilizantes químicos. Algunos compuestos xenobióticos presentes en los ecosistemas pueden bioacumularse en la cadena trófica y ser más tóxicos. Por lo anterior, la importancia de los ecosistemas saludables es un problema ambiental y social que necesita ser atendido con urgencia (Prasad *et al.*, 2021). Para recuperar el suelo contaminado, se han implementado tecnologías físicas, químicas y biológicas. Dentro de las tecnologías biológicas se incluye a la fitorremediación (Bhanse *et al.*, 2022), que consiste en el uso de plantas para concentrar, acumular o degradar los contaminantes del suelo, adicionando la aplicación de bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV) y mejorar la eficiencia de la recuperación de suelos (Glick, 2012).

Cuadro 2. Microorganismos aplicados en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos.

Microorganismos	Plantas	Contaminantes	Referencias
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus subtilis</i>		Diesel	Bekele <i>et al.</i> , 2022
<i>Bacillus cereus</i>		Petróleo	Ehis-Eriakha <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus</i> sp.		Petróleo	Elenga-Wilson <i>et al.</i> , 2021
<i>Achromobacter</i> , <i>Alcaligenes</i> , <i>Arthrobacter</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Cinetobacter</i> , <i>Corynebacterium</i> , <i>Flavobacterium</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Mycobacterium</i> , <i>Nocardia</i> , <i>Pseudomonas</i> , <i>Vibrio</i> , <i>Rhodococcus</i> y <i>Sphingomonas</i>		Total de hidrocarburos de petróleo (TPH)	Salim <i>et al.</i> , 2018.
Cepa N12 (<i>Mycobacterium</i> sp.)	<i>Festuca</i> sp. L. y <i>Echinacea</i> <i>purpurea</i> L.	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP)	Hou <i>et al.</i> , 2019
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Sphingomonas paucimobilis</i> , <i>Pseudomonas luteola</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i>		Petróleo	Ruiz-Marín <i>et al.</i> , 2013
<i>Microbacterium</i>		TPH	Zhang <i>et al.</i> , 2019.
<i>Arthrobacter</i>	pasto Bermuda	Petróleo	Cai <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus megaterium</i> , <i>Pseudomonas pachastrellae</i> , <i>Pseudomonas oleovorans</i> , <i>Pseudoalteromonas</i> sp., <i>Bacillus megaterium</i> y <i>Psychrobacter marincola</i>		HAP	Bhatawadekar <i>et al.</i> , 2021.

Microorganismos	Plantas	Contaminantes	Referencias
<i>Sphingobium</i> sp., <i>Bosea</i> sp., <i>Pseudomonas</i> sp., <i>Rhodococcus</i> sp. y <i>Phenylobacterium</i> sp.		HAP	Rodríguez-Urbe <i>et al.</i> , 2021

Las BPCV se encuentran en la rizosfera y tienen una amplia gama de interacciones con las raíces, las BPCV promueven el crecimiento por tener la capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, producir hormonas vegetales, hacer disponible el fosforo, producir sideróforos de bajo compuesto molecular que al unirse con el hierro (Fe) forman compuestos solubles que son fácilmente absorbidos por la raíz (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016), y producir de ácido indol-3-acético (IAA) (Yahya *et al.*, 2022). Por ello, las BPCV promueven la biorremediación y aumentan la tolerancia de plantas al estrés biótico y abiótico (Reid *et al.*, 2021; Poria *et al.*, 2022). La aplicación de bioinoculantes basados en BPCV se ha enfocado al aumento del crecimiento, desarrollo y rendimiento de los cultivos, y a su vez, para desintoxicar suelos con metales como mercurio (Hg), plomo (Pb), cobre (Cu), cadmio (Cd), cromo (Cr), níquel (Ni), Fe, asimismo, degradar herbicidas, insecticidas y fungicidas (Ahemad y Kibret, 2014) (Cuadro 3). El uso de las BPCV es una estrategia para que las plantas aprovechen los nutrientes del suelo, el agua y produzcan reguladores de crecimiento (auxinas, citoquininas y giberelinas) (Shaikh *et al.*, 2022).

Cuadro 3. Uso de BPCV para la desintoxicación de suelos contaminados.

Microorganismos	Plantas	Contaminantes	Referencias
<i>Bacillus thurigiensis</i> , <i>Bacillus pumilus</i> y <i>Rhodococcus hoagii</i>	<i>Panicum aquaticum</i> Poir.	Petróleo	Viesser <i>et al.</i> , 2020
<i>Bacillus cereus</i> y <i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Sorghum vulgare</i>	Aceite residual automotriz	Balderas-León <i>et al.</i> , 2015
<i>Paenibacillus</i> sp. IITISM08, <i>Bacillus</i> sp. PRB77 y <i>Bacillus</i> sp. PRB101	<i>Helianthus annuus</i>	Endosulfán	Rani <i>et al.</i> , 2019
<i>Serratia marcescens</i> C11S1, <i>Citrobacter freundii</i> C4S3, <i>Serratia marcescens</i> C7S3, <i>Raoultella ornithinolytica</i> C5S3, <i>Stenotrophomonas</i> <i>pavanii</i> C5S3F, <i>Stenotrophomonas</i> <i>maltophilia</i> C10S1	<i>Clitoria ternatea</i>	Petróleo intemperizado	Alarcón <i>et al.</i> , 2019
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> FZB42	<i>Zea mays</i> y <i>Fagopyrum</i> <i>esculentum</i>	Arsénico (As), Pb, cobalto (Co), Cu y germanio (Ge)	Okoroafor <i>et al.</i> , 2022
<i>Rhizobium meliloti</i>	<i>Medicago sativa</i> L.	HAP	Teng <i>et al.</i> , 2011
<i>Microbacterium foliorum</i>	<i>Melastoma</i> <i>malabathricum</i>	As	Alka <i>et al.</i> , 2022
<i>Pseudomonas fluorescens</i> (Ps2-6)	<i>Festuca elata</i>	Fenantreno y pireno	Li <i>et al.</i> , 2021

Por otro lado, hay factores bióticos y abióticos pueden modificar la actividad, eficacia y supervivencia de las BPCV aplicadas en el suelo. Ejemplo de los factores abióticos son: tipo de suelo, disponibilidad de agua, pH, temperatura, productos agroquímicos o fitosanitarios. Efectos de los factores bióticos son: la competencia entre las especies bacterianas nativas y las especies

introducidas, la fase de crecimiento y la variedad vegetal. No obstante, el aplicar BPCV éstas pueden no estar adaptadas a las condiciones del suelo, por consecuencia no pueden competir con microorganismos nativos (Ruiz y Salas Sanjuan, 2022); sin embargo, las BPCV que se encuentran en suelos contaminados y que han sobrevivido, son microorganismos tolerantes que pueden ser eficientes en procesos de descontaminación de suelos (Prathap y Ranjitha Kumari, 2015). Se estima que aproximadamente del 2-5 % de las rizobacterias que se reintroduce en el suelo está integrado por microorganismos competitivos que tienen un efecto benéfico sobre el crecimiento y el desarrollo vegetal (Ogata-Gutiérrez y Zúñiga-Dávila, 2020).

2.9 Bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre

El nitrógeno (N) es uno de los elementos esenciales para las plantas, es base para formar ácidos nucleicos (ADN, ARN), proteínas, lípidos de membrana, adenosín trifosfato (ATP), nicotinamida adenina dinucleótido (NADH), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), pigmentos fotosintéticos, siendo bases fundamentales para las células. La atmósfera es la fuente primordial de N_2 , la que está constituida por 79 % de N en forma de gas, y paradójicamente no está disponible para la mayor parte de los seres vivos, debido a la triple ligadura entre los dos átomos de N en su forma gaseosa. El suelo es otra fuente de N, encontrándose en forma de amonio (NH_4) y en nitrato (NO_3), esta última forma, está disponible después que los microorganismos del suelo realicen un proceso de transformación de compuestos nitrogenados (amonificación y nitrificación), de esta manera, están fácilmente disponibles para los organismos (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016; Wolna-Maruwka y Niewiadomska, 2021).

Ciertos microorganismos son capaces de hacer el N atmosférico disponible para las plantas y a partir de esto, hacerlo accesible para los organismos vivientes. Este proceso de conversión de N_2

a NH_4 es conocido como fijación biológica de N atmosférico, el cual es llevado a cabo por un reducido grupo de procariontes (bacterias, algunas cianobacterias, y actinomicetos). Esta reacción se lleva a cabo mediante un complejo enzimático denominado nitrogenasa y se puede realizar de dos maneras: la primera de forma simbiótica, donde los procariontes realizan simbiosis con plantas (principalmente). La otra forma es sin realizar simbiosis estricta con algún otro organismo, es decir, la fijación de N atmosférico de vida libre (Ferrera-Cerrato *et al.*, 2016).

La fijación biológica de N atmosférico por microorganismos diazotróficos, activan genes *nif* para fijar este elemento, y están relacionados con la biosíntesis de dos metaloproteínas, FeMo-proteína (dinitrogenasa) y Fe-proteína (dinitrogenasa reductasa), además, la donación de electrones y genes reguladores básicos para el funcionamiento de la enzima nitrogenasa. En el proceso de fijación de N atmosférico (Souza *et al.*, 2015; Ahmad *et al.*, 2018; Hakim *et al.*, 2021), se han registrado géneros de microorganismos fijadores de N de vida libre como *Azotobacter*, *Bacillus*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Burkholderia* y *Clostridium* (Lawal *et al.*, 2021).

Como se ha mencionado, el derrame de hidrocarburos en los suelos ocasiona alteraciones en las propiedades físicas, químicas y biológicas del mismo, estas alteraciones afectan directamente a las poblaciones microbianas que son participes claves en los ciclos biogeoquímicos del suelo, el reciclaje de nutrientes y en la fertilidad del mismo, y destacan las bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre (Vázquez-Luna *et al.*, 2011; Baranu y Lawrence, 2022). Por lo anterior, se ha propuesto recuperar suelos contaminados por hidrocarburos mediante la fitorremediación incluyendo poblaciones de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre (Foght, 2017).

La aplicación de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre, pueden usar el petróleo crudo como fuente de carbono y energía (*Paenibacillus lautus*, *Brevibacillus agri*,

Bacillus sp. y *Paenibacillus polymyxa*), registran una degradación de petróleo crudo del 94.1 al 97 %, después de 21 días de incubación. Las bacterias tuvieron la capacidad de tomar *n*-hexadecano, diésel, *n*-dodecano, queroseno y petróleo crudo, pero ninguno de los organismos podía utilizar fenol (Omotayo *et al.*, 2013).

Por otro lado, Pérez Vargas *et al.* (2017) han aislado y seleccionado dos bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre, nativas de sitios contaminados por derrames de petróleo con un contenido de hidrocarburos de 120,000 ppm. Estas bacterias además de ser nativas, degradan hidrocarburos y fijan nitrógeno. También son productoras de biosurfactantes y después de 16 meses de bioaumentación, mostraron 80 % de remoción de hidrocarburos. Estos resultados respaldan la literatura que menciona que la biorremediación de suelos contaminados por bioaumentación es más efectiva cuando se utilizan microorganismos nativos del sitio.

2.10 Hongos micorrízicos arbusculares en la biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos

Los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) son microorganismos importantes de la rizosfera que participan en procesos ecológicos y microbiológicos. Tienen una asociación simbiótica mutualista con el sistema radical de más del 80 % las plantas vasculares terrestres, lo cual incrementa su nutrición (fósforo, nitrógeno), mayor absorción de agua, la resistencia hacia fitopatógenos, resistencia a la sequía, a la salinidad, tolerancia a la contaminación por metales de transición y a elementos radioactivos. La planta proporciona a los HMA, fuentes de carbono para satisfacer sus requerimientos metabólicos y para completar su ciclo de vida (Egerton-Warburton *et al.*, 2005; Garg y Chandel, 2010; Schmidt *et al.*, 2011).

Los micobiontes que forman micorrizas arbusculares pertenecen al Phylum Glomeromycota (Smith y Read, 2008; Begum *et al.*, 2019), forman estructuras llamadas hifas, originarias de esporas que germinan del suelo y entran en contacto con las células epidérmicas de las raíces mediante una estructura aplanada llamada “hifopodio”, que penetran las capas externas de las células radicales cuya colonización resulta en hifas intracelulares ramificadas en las células corticales que se denominan arbusculos (Figura 2). Las hifas intracelulares y los arbusculos están siempre separadas del citoplasma de las células vegetales por una interfaz apoplásica rodeada por una membrana periférica, una extensión especializada de la membrana plasmática de hospedante. La interfase periarbuscular es el sitio principal de intercambio de nutrientes entre ambos simbiontes (Genre *et al.*, 2020).

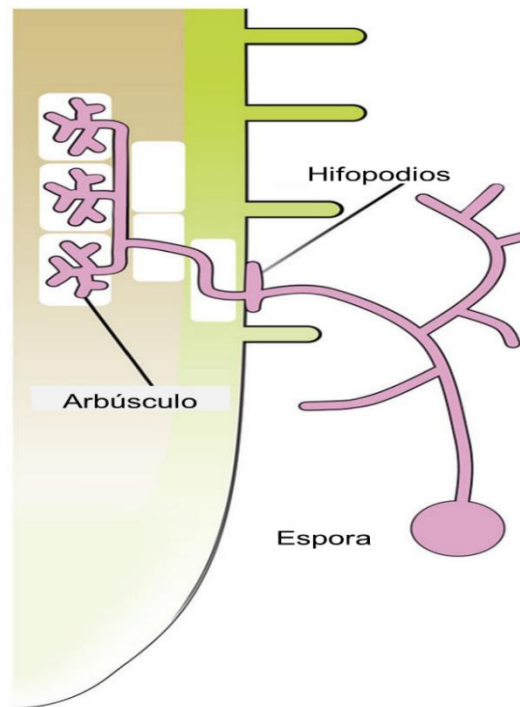


Figura 2. Colonización radical por hongos micorrízicos arbusculares (Pandey *et al.*, 2019).

Los HMA incrementan la nutrición y el crecimiento de las plantas y su tolerancia al estrés (Cheng *et al.*, 2020). Por lo anterior, el uso de HMA puede coadyudar para satisfacer las necesidades de la sociedad en la producción de alimentos, en la calidad ambiental y en los servicios ecosistémicos, en este último aspecto, la participación de los HMA en la salud del suelo, en el mantenimiento de la fertilidad y salud del suelo son fundamentales (Begum *et al.*, 2019; Giovannini *et al.*, 2020; Kuila y Ghosh, 2022). Además, los HMA no solo se relacionan con las raíces de las plantas sino también con los microorganismos del suelo por su actividad sinérgica con diferentes poblaciones de bacterianas (bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre, solubilizadoras de P, productoras de IAA, productoras de sideróforos) que interactúan en la micorrizosfera que están rigurosamente asociados con las esporas y el micelio extraradical (Iffis *et al.*, 2016; Giovannini *et al.*, 2020) (Figura 3). Por ello, cualquier evento que altere la simbiosis micorrízica tendrá un impacto negativo en la vegetación, en su composición, distribución y en los servicios ecosistémicos que genera, además, en la estructura y en la calidad del suelo (Silvia-Flores *et al.*, 2021).

Los beneficios que genera la simbiosis micorrízica en las plantas están claros y reportados, por lo anterior, los HMA también son usados como una herramienta biológica en la fitorremediación de suelos contaminados (Abd_Allah *et al.*, 2015) al incrementar la adaptación, desarrollo, crecimiento de las plantas, mejorar la resistencia al estrés ambiental, la nutrición de la planta y la proliferación de los grupos microbianos en la micorrizosfera que degradan los contaminantes del suelo (Gong y Tian, 2019; Rahayu, 2020). A su vez, su eficiencia está determinada por la especie y origen del HMA, las plantas, el tipo y concentración del contaminante; sin embargo, se necesita comprender los mecanismos de los HMA ante contaminantes orgánicos (Chibuike, 2013).

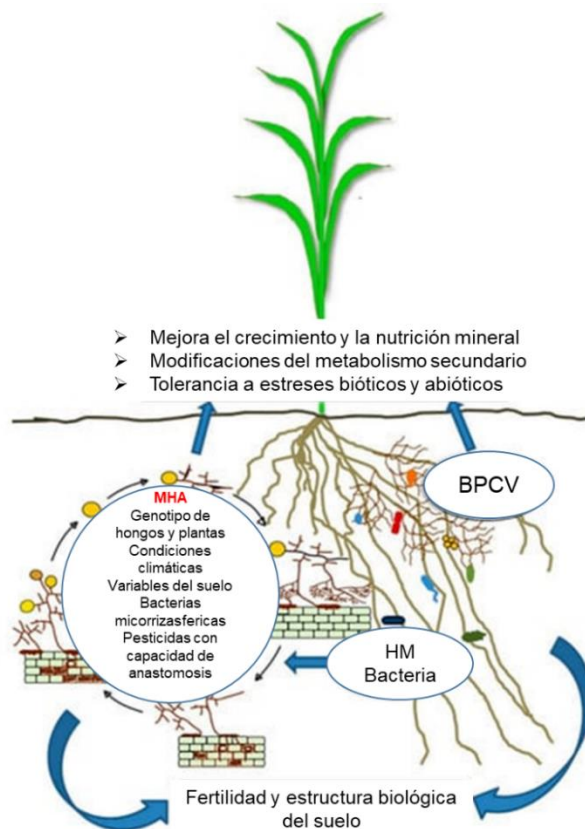


Figura 3. Representación de los impactos de los hongos micorrízicos arbusculares (HMA) y las bacterias beneficiosas sobre el rendimiento de las plantas y la fertilidad del suelo. A la izquierda: una representación visual del ciclo de vida de la HMA y los factores que afectan las diferentes etapas de desarrollo de la HMA; a la derecha: bacterias auxiliares de micorrizas (HM) y bacterias promotoras del crecimiento vegetal (BPCV) que interactúan sinérgicamente con la HMA. (Giovannini *et al.*, 2020).

La actividad metabólica y la degradación por los HMA de los HP durante la fitorremediación de suelos contaminados no está del todo claro, pero se considera que estos hongos pueden estimular la actividad metabólica del suelo al liberar nutrientes en la micorrizosfera (Iffis *et al.*, 2016). Los HMA pueden estabilizar hidrocarburos en sus tejidos fúngicos en el micelio, y así disminuir el paso de los hidrocarburos hacia los tejidos vegetales (Korade y Fulekar, 2009; Li *et al.*, 2021). Los HMA tienen poca capacidad de ser organismos saprofitos por lo que la degradación de los hidrocarburos no es mediante catabolismo, y se asume que esta actividad degradativa se lleva a cabo en el suelo por microorganismos que producen peroxidasas extracelulares que son

estimulados por la micorrizosfera (Gaspar *et al.*, 2002; Mathur *et al.*, 2007; Joner y Leyval, 2009). Gao *et al.* (2011) reportan una degradación de fenantreno y pireno de 98.6% y 88.1 %, respectivamente, en suelos sembrados con alfalfa micorrizada después de 70 días, además, indicaron que las raíces inoculadas con HMA almacenaron más fenantreno que en el brote del alfalfa en comparación con las plantas no micorrizadas.

Por otra parte, en trabajos bajo condiciones *in vitro*, se registró que dos cepas de HMA, *Rhizophagus irregularis* MUCL 41833 y *Gigaspora sp.* MUCL 52331 mostraron respuestas diferenciales en la producción de biomasa miceliar ante concentraciones crecientes de diesel (1, 2, y 5 %), observando que *R. irregularis* MUCL 41833 se vio altamente afectado en comparación con *Gigaspora sp.* En los ecosistemas las redes micorrizicas son esenciales, pues son el resultado de la interconexión de hifas mediante un mecanismo llamado anastomosis, que permite la curación de hifas ante daños físicos (HHM por sus siglas en inglés Hyphal Healing Mechanism), y que permite a los hongos mantener la integridad micelial (Garcés-Ruiz *et al.*, 2021).

2.11 Técnicas de remediación de suelos contaminados

Las metodologías para la recuperación del suelo se pueden clasificar en físicas, químicas y biológicas. Los métodos físicos se basan en la aplicación de tratamientos térmicos, lavados de suelos, solidificación, vitrificación, estabilización, desorción térmica, incineración y extracción de vapor para degradar los contaminantes; por otro lado, en los métodos químicos se aplican agentes oxidantes o reductores, y tratamientos electroquímicos, estos métodos son más rápidos, pero pueden alterar las propiedades del suelo; en contraste, los métodos biológicos consisten en la aplicación de microorganismos presentes en las raíces de las plantas y del suelo para desintoxicarlo. Los métodos biológicos son más lentos y no alteran las propiedades del suelo como

ocurre con los métodos físicos y químicos. Otra manera de clasificar las metodologías de remediación se basan en el sitio donde se lleva a cabo la remediación, *in situ* y *ex situ*. Los métodos *in situ* (lugar original la contaminación) no alteran el ambiente, y en los métodos *ex situ* (fuera del lugar de la contaminación) el suelo contaminado se escarba y se lleva al lugar de tratamiento para su desintoxicación (Tang y Law, 2019; Sophia y Shetty Kodialbail, 2020; Pande *et al.*, 2020; Ambaye *et al.*, 2022).

Los métodos físicos y químicos generan la dispersión del contaminante, siendo incapaces de removerlos de manera efectiva, y son alternativas de costo excesivo, lo que puede causar daños al ambiente e impedir la recuperación de ciertos hábitats. Por lo cual, se realizan esfuerzos enfocados hacia el uso de biotecnologías aplicando organismos con capacidades metabólicas para degradar contaminantes, y que sean amigables con el ambiente y económicos como es el uso de la biorremediación (Mendoza-Avalos y Guerrero-Padilla, 2015).

2.11.1. Biorremediación

La biorremediación (biodegradación) es una biotecnología que se basa en el uso de microorganismos (bacterias, hongos o algas) que utilizan y degradan contaminantes para satisfacer sus requerimientos nutricionales y energéticos, hasta llegar a concentraciones mínimas de riesgo establecidas por normas ambientales. Esta técnica es sencilla de implementar, amigable con el ambiente, adaptable en grandes áreas, además de ser rentable y que conduce a la eliminación completa de diferentes contaminantes (Gouma *et al.*, 2014; Pérez *et al.*, 2015; Koshlaf y Ball, 2017; Torri *et al.*, 2018). La base de la biorremediación es la habilidad de los organismos vivos (microorganismos o plantas) para desintoxicar en forma natural ciertos contaminantes (Garzón *et al.*, 2017). La biorremediación de los contaminantes del suelo se basa en reacciones químicas cuya

degradación total resulta en la producción de dióxido de carbono o metano, agua y biomasa, pero si se trata de una degradación parcial, estos compuestos pueden ser metabolizados usualmente, en compuestos menos tóxicos (Ajona y Vasanthi, 2021; Dong *et al.*, 2021). Para tener un proceso de biodegradación óptimo se requiere de diferentes factores indispensables que se describen en el Cuadro 4 (Speight, 2017).

Cuadro 4. Parámetros esenciales para que se lleve a cabo la biorremediación (Speight, 2017).

Factor	Condiciones óptimas
Población microbiana	Tipos de organismos adecuados que pueden biodegradar todos los contaminantes.
Oxígeno	Suficiente para soportar la biodegradación aeróbica (aproximadamente 2% de oxígeno en la fase gaseosa o 0.4 mg/L en el agua del suelo).
Agua	La humedad del suelo debe ser del 50% al 70% de la capacidad de retención de agua del suelo.
Nutrientes	Nitrógeno, fósforo, azufre y otros nutrientes para apoyar el buen crecimiento microbiano.
Temperatura	Temperaturas apropiadas para el crecimiento microbiano (10- 35 °C)
pH	Rango óptimo: 6.5 a 7.5.

2.11.2. Fitorremediación

La palabra fitorremediación se compone del término griego *phyto* (planta) y del término latino *remedium* (cura del mal) (Raskin *et al.*, 1994). La fitorremediación usa especies vegetales para

recuperar suelo y agua, además, las plantas pueden acumular en sus órganos, los contaminantes y los eliminan de su entorno (Surriya *et al.*, 2015).

La fitorremediación es un proceso lento, se requiere de plantas con un sistema radical abundante, con rápido crecimiento y que toleren los contaminantes. La raíz es un órgano principal para la estabilización, adaptación, salud y nutrición de las plantas debido a características fenotípicas. La microbiota de la rizosfera puede incrementar el éxito de la fitorremediación, en particular bacterias y HMA que son componentes claves que contribuyen a la recuperación de hábitats degradados (Steliga y Kluk, 2020).

La fitorremediación es una técnica económica y respetuosa con el ambiente para remediar los contaminantes orgánicos e inorgánicos del suelo, cuyos mecanismos e interacciones microbianas con las plantas mejoran las condiciones del suelo. Para eliminar contaminantes se tienen presentes diferentes características biológicamente activas. La principal desventaja de esta técnica es, la baja sobrevivencia de las plantas ante los contaminantes, las plantas que son tolerantes a los contaminantes, generalmente producen menor biomasa sin favorece la remediación (Hernández Valencia *et al.*, 2017; Rani *et al.*, 2019; Daryabeigi Zand y Hoveidi, 2018).

Los suelos agrícolas contaminados no son adecuados para la producción, por lo que se necesita implementar técnicas que recuperen estos suelos; así, la fitorremediación ha sido aceptada en muchos países para rehabilitar suelos y generar beneficios indirectos (mejora de la calidad del sustrato, paisaje estéticamente agradable y secuestro de carbono); esta técnica incluye diversos contaminantes inorgánicos (metales pesados, metaloides), orgánicos (agroquímicos, compuestos orgánicos persistentes) y elementos radioactivos. Se ha propuesto que a partir de la recuperación de suelos contaminados se genere cultivos energéticos, por los cuales se obtiene una producción de

bioenergía que a la par, se puede obtener sostenibilidad económica, social y ambiental (Pandey *et al.*, 2016). La fitorremediación utiliza las plantas y su microbiota rizosférica para remover, retener, reducir, transformar, mineralizar, degradar, volatilizar o estabilizar contaminantes presentes en el ecosistema, a base de diversos mecanismos como fitoextracción, fitoestabilización, fitovolatilización, fitodegradación y rizodegradación (Figura 4) (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Hassan *et al.*, 2018).

2.11.3. Fitoextracción

El proceso de eliminación y extracción de elementos tóxicos (metales pesados) y contaminantes orgánicos presentes en el suelo es favorecido por las plantas cuyas raíces los absorben o los acumulan en partes cosechables, a lo cual se le llama fitoextracción (Chan-Quijano *et al.*, 2015; Sabir *et al.*, 2015; Zouboulis *et al.*, 2018). La parte aérea de la planta puede ser cosechada o recolectada y ser procesada de manera segura para eliminar y reciclar metales; al respecto, existen plantas hiperacumuladoras capaces de tolerar concentraciones elevadas de contaminantes de hasta 100 mg kg⁻¹ de Cd, 1,000 mg kg⁻¹ de As, cobalto (Co), Cu, Pb o Ni o > 10,000 mg kg⁻¹ de manganeso (Mn) y zinc (Zn) (Ibrahim *et al.*, 2015; Sabir *et al.*, 2015).

2.11.4. Fitoestabilización

Las plantas tienen la capacidad de estabilizar y reducir el riesgo al restringir la movilidad de los contaminantes y su biodisponibilidad en el suelo a través de la erosión, lixiviación del agua y el viento (Sabir *et al.*, 2015; Surriya *et al.*, 2015; Ossai *et al.*, 2019). La estabilización se realiza mediante la absorción de contaminantes por un denso sistema de raíz, ejerciendo un control hidráulico en el área contaminada que succiona la humedad de los suelos, debido a las altas tasas de evapotranspiración (Núñez López *et al.*, 2004; Rostami y Azhdarpoor, 2019). Esta técnica no

elimina los contaminantes, solo los estabilizan y no los deja disponibles para el ambiente, la vida silvestre, el ganado y la salud humana (Jan *et al.*, 2015).

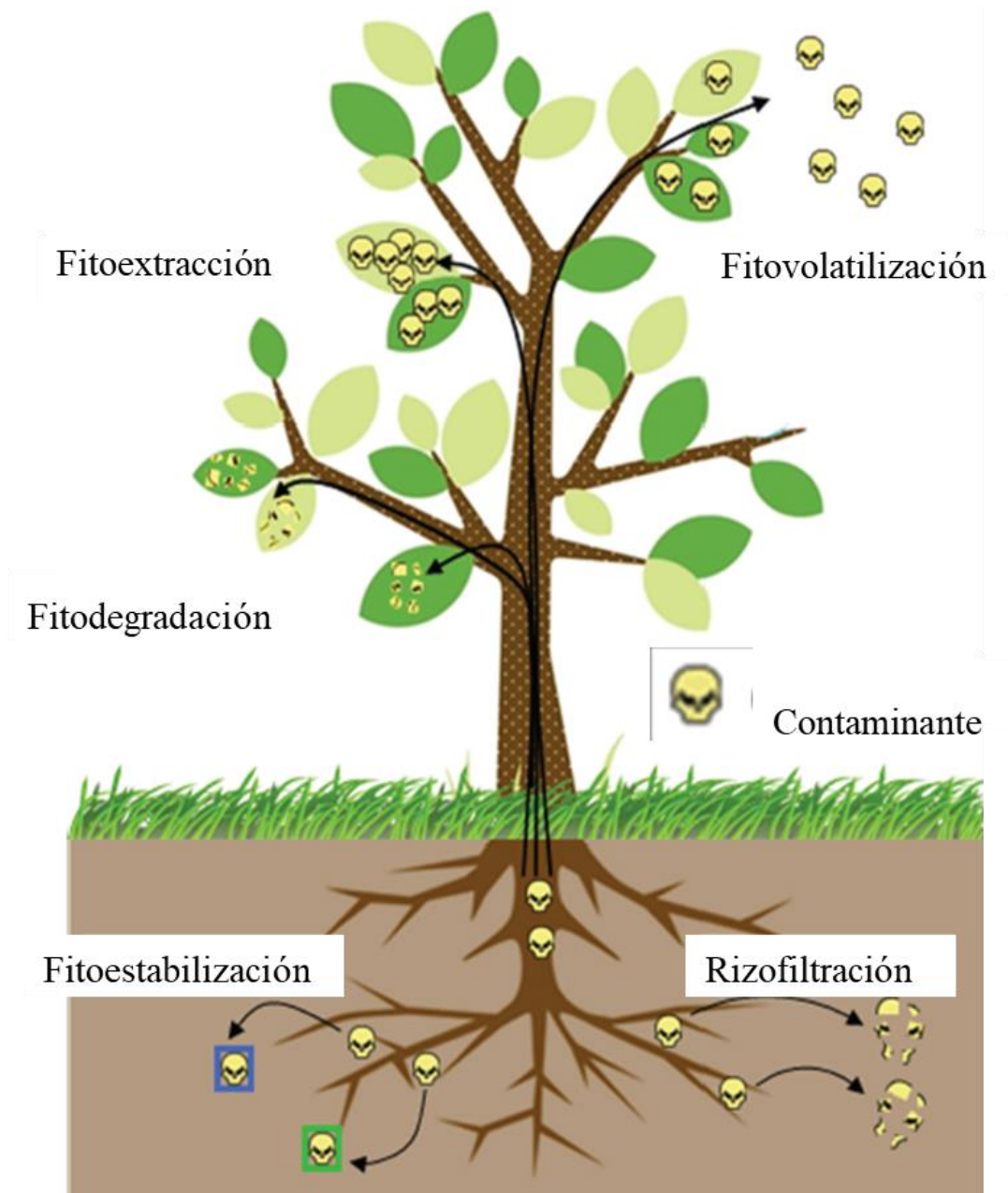


Figura 4. Los principales procesos naturales subyacentes a la fitorremediación (Mahjoub, 2013).

2.11.5. Fitovolatilización

La fitovolatilización es un mecanismo que utilizan las plantas para absorber contaminantes orgánicos y algunos metales pesados del suelo a través de sus raíces modificándolos a compuestos volátiles menos tóxicos; en este caso; los compuestos se transportan a las hojas y finalmente, por el proceso de transpiración de las plantas por medio de las hojas son liberados a la atmósfera. El proceso de transpiración involucra la evaporación de los vapores de agua de la superficie de las hojas a través de los, estomas hacia la atmósfera. La principal desventaja de esta técnica es la de eliminar los contaminantes del suelo, y los libera a la atmósfera y estos compuestos volátiles pueden contaminar el aire y llegar al suelo por precipitación. Por lo anterior, se requiere evaluar los riesgos, por lo que esta técnica se caracteriza como controvertida (Muthusaravanan *et al.*, 2019; Yan *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021).

2.11.6. Fitodegradación

Es este proceso las plantas son capaces de absorber, metabolizar y degradar los contaminantes directamente por contacto de las raíces del suelo, sedimento o agua, adquiriendo los contaminantes orgánicos en sus tejidos y transformándolos o mineralizándolos al generar enzimas como dehalogenasa, reductasa, oxigenasa, nitroreductasa, peroxidasa, lacasa y nitrilasa. Los contaminantes son degradados a moléculas más simples (CO₂ y H₂O), menos tóxicos y más estables, que pueden ser tomados por la planta para su nutrición, o en caso distinto, éstos pueden ser biotransformados (López-Martínez *et al.*, 2005; Chauhan *et al.*, 2015; Lenoir *et al.*, 2016; Mokea-Niaty *et al.*, 2018; Zouboulis *et al.*, 2018). La degradación completa de los contaminantes orgánicos en las células vegetales ocasionalmente se realiza para la síntesis de aminoácidos e incorporarlos en compuestos vegetales (Spaczyński *et al.*, 2012).

2.11.7. Rizofiltración

Es una técnica que usan las raíces de las plantas (acuáticas y terrestres) para absorber, concentrar y precipitar contaminantes del agua superficial, subterránea y residuales (Nanda *et al.*, 2022). Las plantas absorben, concentran y precipitan los contaminantes por sus raíces y los brotes que actúan como un filtro (Jan *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2020). Esta técnica se implementa en sitios con concentraciones bajas de contaminantes, pero en gran superficie de agua (Ossai *et al.*, 2019). Las plantas usadas para este método son aquellas que producen biomasa radical extensa para abarcar mayor área del sitio alterado (Kazemalilou *et al.*, 2020).

Es una técnica para la descontaminación de agua subterránea que se encuentra contaminada por metales pesados, y las plantas como *Eichhornia crassipes*, *Lemna minor*, *Nicotiana tabacum*, *Helianthus annuus*, *Spinacia oleracea* y *Brassica juncea*, se han aplicado en esta técnica (Srivastava *et al.*, 2021).

2.12 *Helianthus annuus* L.

El girasol (*Helianthus annuus*) es una planta que pertenece a la familia Asteraceae; en griego *Helios* significa sol y *annus* significa flor, recibiendo este nombre debido a que estas flores siguen la posición del sol durante el día; este género *Helianthus* lo conforman 67 especies (Khan *et al.*, 2016). El girasol es una planta que se caracteriza por tener una gran inflorescencia de hasta 30 cm de diámetro con grandes semillas y puede alcanzar hasta 3 m de altura (Alaboudi *et al.*, 2018). El girasol presenta un tallo áspero, peludo, ancho, toscamente dentado, hojas ásperas y en su mayoría alternas. El girasol tiene flores compuestas con un anillo de flores radiales estériles exteriores con lígulas de colores brillantes adheridas y percibidas como "pétalos". La inflorescencia del girasol lo conforman muchas flores individuales que maduran en semillas sobre un receptáculo, pueden

llegar a ser hasta tres mil pequeñas de disco tubular fértil, los ovarios en la base de las flores del disco se convierten en fruto llamadas cypsela antes llamados aquenio y con un pericarpio adherido denominado cáscara que se denomina semillas, mientras que la semilla descascarada se conoce coloquialmente como grano (Carter y Heiser, 1978; Fernández-Luqueño *et al.*, 2014; Marek, 2019).

Helianthus annuus es originaria del continente americano, tiene un amplio rango geográfico, se distribuye desde el norte y el sur de Canadá, y se extiende por el Cinturón Volcánico Transmexicano en el centro de México (Lentz *et al.*, 2008; Hübner *et al.*, 2022). Crece desde el nivel del mar hasta los 2,500 m y se encuentra en áreas con lluvias bajas y moderadas (Carter y Heiser, 1978). El girasol fue domesticado hace aproximadamente 4,000 años por los nativos americanos en el centro de Estados Unidos (Mandel *et al.*, 2011), y fue cultivado desde el este de América del Norte hasta el sur de México, no fue un cultivo básico para su dieta, como lo fue el maíz, la calabaza (*Cucurbita maxima* Duchesne) y el frijol (*Phaseolus acutifolius* A. Gray) (Seiler *et al.*, 2017). Además, *H. annuus* tiene características agronómicas favorables, ya que crece en diferentes tipos de suelo y clima, tolera altas y bajas temperaturas, y genera abundante biomasa (AL-Jobori y Kadhim, 2019).

La semilla de girasol se posiciona entre las primeras cinco semillas más importantes de especies oleaginosas en el mundo después del maíz (Ahmed *et al.*, 2022). En México la producción de este cultivo para el 2018 fue de 9,263 t con una superficie cosechada de 6,629 t ha⁻¹ y con rendimiento promedio de 1.39 t ha⁻¹, los estados con mayor producción fueron Sonora, Zacatecas, Guanajuato, Jalisco y el Estado de México (Arenas-Julio *et al.*, 2020). La semilla es una fuente de aceite vegetal, con grasas monoinsaturadas (ácido oleico) y poli-insaturadas (ácido linoleico) y vitaminas esenciales (A, B y E). El girasol también es fuente de harina por su abundante biomasa, y rico en

aminoácidos esenciales como leucina, valina e isoleucina, entre otros, que fomentan el crecimiento y desarrollo muscular, y es incorporada en dietas de ganado bovino y en aves de corral (Zehra *et al.*, 2019). Además, se usa como ingrediente para elaborar jabón, cera, barniz y lubricantes (Soares *et al.*, 2021).

El girasol genera gran biomasa al tener un crecimiento acelerado, cuenta con un gran sistema radical y es una planta apta para acumular una extensa variedad de contaminantes por lo que es considerada como un cultivo ambiental por su potencial en el ámbito de fitorremediación (Martins *et al.*, 2014; Hassan *et al.*, 2018; AL-Jobori y Kadhim, 2019). Además, el girasol es una planta ornamental al proveer un panorama agradable en sitios que están en proceso de remediación de suelos contaminados, y evita el movimiento del contaminante o sus metabolitos hacia la cadena trófica; por lo anterior, la selección de las especies vegetales para la remediación de suelos contaminados tiene gran valor (Cai *et al.*, 2010).

El girasol es una planta conocida como hiperacumuladora por absorber, estabilizar, acumular y tolerar diferentes concentraciones de metales como Pb, Cd, Zn, Cu, Fe, Ni, As y cromo trivalente [Cr(III)] y hexavalente [Cr(VI)] (Chauhan *et al.*, 2020; Soares *et al.*, 2021); así, por su alta capacidad radical, puede extraer del suelo del 10 al 25% de los metales (García Ávila *et al.*, 2018). Además, se ha utilizado en la recuperación de suelos con contaminantes orgánicos volátiles (BTX) como benceno, tolueno, xileno, así como con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) (de Almeida *et al.*, 2018).

III.OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1.Objetivo general

- Evaluar la capacidad fitorremediadora de *Helianthus annuus* de un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina), asistida con bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal.

3.2.Objetivos particulares

- Evaluar la germinación y emergencia de plántulas de *H. annuus* en suelo contaminado con diferentes concentraciones de gasolina.
- Determinar la capacidad de la fitorremediación de *Helianthus annuus*, asistida con microorganismos benéficos, crecidos en un suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos de petróleo (gasolina).

3.3.Hipótesis general

- *Helianthus annuus* tiene la capacidad fitorremediar un suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina), asistida con bacterias y hongos promotores del crecimiento vegetal (PCV).

3.4.Hipótesis particulares

- La germinación y el crecimiento de *Helianthus annuus* serán limitados ante un suelo contaminado por hidrocarburos de petróleo (gasolina).

- *Helianthus annuus* será una especie fitorremediadora asistida con microorganismos benéficos, establecidos en un suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos de petróleo (gasolina).

IV.MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Fase 1. Germinación y crecimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.) en suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina) en diferentes concentraciones

El suelo se recolectó de la comunidad de Palmarito Tochapán, Puebla, México (18°53'00"N, 97°39'11"W), a 30 cm de profundidad. Esta comunidad se encuentra en la zona conocida como el "triángulo rojo", zona del trayecto del gasoducto México-Minatitlán, donde se ha reportado robo de combustible, por lo que este sitio se encuentra vulnerable a la contaminación del suelo por gasolina debido al "huachicoleo" (Peschard Mariscal *et al.*, 2021).

El suelo se secó al aire libre a temperatura ambiente y se tamizó con malla de 2 mm para eliminar grava (Daryabeigi Zand *et al.*, 2018). Posteriormente, se le realizó un análisis físico y químico, en el Laboratorio de Génesis de Suelos del Colegio de Postgraduados Campus Montecillo, y se determinó el pH de 7.4, la densidad aparente de 1.62 g cm³, el contenido de materia orgánica (1.80 %), la textura fue Franca (42.6 % limo, 39.9 % arena y 17.5 % arcilla). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue de 13.7 Cmol(+)kg⁻¹, P disponible de 79.8 mg kg⁻¹ (método de Bray), y N total de 0.042 %. De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, es un suelo ligeramente alcalino, no volcánico, muy rico en P, CIC baja, muy bajo en K, y muy alto en Mg 4.61 Cmol(+)kg⁻¹ y Ca 1.12 Cmol(+)kg⁻¹, con alto contenido en carbonato de calcio (CaCO₃, 15.7 %); y se clasifica como un suelo salino con conductividad eléctrica de 5.12 dSm⁻¹.

Para los experimentos de invernadero, se utilizaron semillas de girasol variedad Victoria (donadas por el Dr. José Alberto Salvador Escalante-Estrada, profesor investigador del Colegio de

Postgraduados), la cual presenta una madurez fisiológica de 121 días, y un rendimiento de grano de 1.49 t ha⁻¹ (Escalante-Estrada *et al.*, 2015).

Establecimiento del bioensayo

En 5 kg de suelo se aplicó el hidrocarburo (gasolina Magna comercial) en las concentraciones de 200, 400, 800, 1,600, 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹, y un tratamiento control. La gasolina se incorporó disuelta en 150 mL de hexano (pureza de 98.5 %, Karal®, 0.001 % de residuo después de la evaporación) para facilitar su homogenización en el suelo (Alarcón *et al.*, 2008). De acuerdo con las concentraciones respectivas, el hidrocarburo se mezcló de manera manual durante 5 min con una pala de acero (Truper®) para homogenizar el contaminante con el suelo. Por cada tratamiento se tuvieron 5 unidades experimentales (UE), cada UE consistió de un contenedor de vidrio de 960 mL de capacidad.

En cada UE se sembraron 10 semillas de girasol y al emerger las plántulas, se raleó a 8 plantas por cada UE. Las plantas se regaron con agua potable de acuerdo con los requerimientos necesarios, y se mantuvieron por 20 días en condiciones de invernadero.

Evaluación de variables de crecimiento

El porcentaje de germinación (PG) se calculó con la fórmula: $PG = [(Número\ de\ semillas\ germinadas) / (Número\ de\ semillas\ sembradas)] \times 100$ (Caroca *et al.*, 2016). El bioensayo tuvo una duración de 20 días, transcurridos los 20 días, se realizó la cosecha de las 5 UE que contenían 8 plantas de los 7 tratamientos, de cada planta se midió la altura (cm) y la longitud radical (cm) con una regla midiendo desde la base del tallo hasta la raíz más larga de cada planta. La biomasa seca total se determinó secando las plantas completas en una bolsa de papel debidamente

etiquetadas, a 70 °C durante 72 h, posteriormente se pesaron en balanza analítica registrando su peso en gramos (g).

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento consistió de 7 tratamientos con 5 repeticiones cada uno, distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico de los datos obtenidos de cada una de las variables (altura, longitud radical y biomasa seca total), se realizó mediante análisis de varianza, y prueba de comparación medias (LSD, $\alpha = 0.05$), con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.0).

4.2. Fase 2. Caracterización e identificación de bacterias nativas aisladas de un suelo contaminado con gasolina con potencial para la promoción del crecimiento vegetal

Aislamiento de bacterias nativas

A partir de la fase experimental anterior, se pesaron 10 g de suelo de las concentraciones 200, 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹ y del suelo control. En seguida, se colocaron individualmente en 90 mL de agua destilada estéril siendo la dilución 10⁻¹, y se agitaron vigorosamente por 10 min. Posteriormente, de cada suspensión preparada, con una pipeta estéril se transfirió 1 mL de esta dilución a tubos de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril (dilución 10⁻²), los tubos de ensayo se agitaron vigorosamente. A partir de esta dilución se continuaron realizando diluciones decimales 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵ y 10⁻⁶, para cuantificar las unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre crecidas en medio Rennie (1981).

En el centro de cada una de las placas de Petri, se agregó una alícuota de 0.1 mL de sus respectivas diluciones obtenidas, y se dispersó con varilla de vidrio en forma de “L” por toda la

superficie del agar; en seguida, las placas fueron invertidas e incubadas a 28 °C (SL SHEL LAB, 100-120 VAC) durante 72 h hasta observar y cuantificar las UFC.

Análisis estadístico

Los datos obtenidos de las UFC se analizaron mediante análisis de varianza, y prueba de comparación medias (LSD, $\alpha = 0.05$), con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.0).

Caracterización fenotípica de las colonias seleccionadas

La caracterización macroscópica se realizó describiendo las características de cada cepa como forma, superficie, color, textura y bordes. Además, las caracterizaciones microscópicas se realizaron empleando tinción de Gram, y con observaciones en microscopio óptico, siguiendo la descripción de Ramírez-Gama *et al.* (2021).

Pruebas bioquímicas de las cepas aisladas

Cada una de las pruebas se realizó de manera cualitativa para cada una de las cepas seleccionadas, como a continuación se describe. La producción de ácido indolacético (AIA) (indoles totales) se realizó con el método modificado por Brick *et al.* (1991). Las cepas fueron sembradas en medio Luria-Bertani, a 28°C por 72 h. Después se añadió 1 mL de la solución Salkowski (2 % p/v con FeCl₃ 0.5 M disuelto en ácido perclórico al 35 %). Las cepas fueron incubadas en oscuridad durante 30 min a temperatura ambiente. El cambio de color amarillo a rosado denotó la actividad positiva en la producción de AIA por cada cepa bacteriana.

El potencial de fijación biológica de nitrógeno atmosférico (FBN) se realizó mediante el medio semisólido de malato libre de nitrógeno (NFb) en tubos de ensayo, en el que se sembró una asada

correspondiente a cada cepa bacteriana, incubados a 28 °C por 168 h. El cambio de color verde esmeralda a azul, se consideró como actividad positiva a la FBN para cada colonia bacteriana (Almaraz-Suarez *et al.*, 2020).

Para la prueba de producción de sideróforos, se colocó una carga bacteriana, de cada cepa, en placas de Petri con medio específico medio cromo-azurol S (CAS) agar (Schwyn y Neilands, 1987). Las placas se incubaron a 28 °C por 72 h, y se evaluó la producción de sideróforos al detectar halos de color naranja alrededor del crecimiento bacteriano (Louden *et al.*, 2011).

La solubilización de fosfatos se realizó en el medio Pikovskaya (Pikovskaya, 1948) con fosfato tricálcico ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) como fuente de fosfato insoluble, en el cual se sembró la cepa correspondiente y se incubó a 28 °C, la actividad positiva de solubilización de fosfatos se evaluó a partir de la observación de halos claros alrededor del crecimiento bacteriano.

Identificación molecular de las cepas

Extracción de ADN. Con las bacterias purificadas, se procedió a la extracción de ADN de acuerdo al método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) al 2 % (Tris-HCl 100 mM pH 8.0; EDTA 2H₂O mM; CTAB 2 %; NaCl 1.4 M) (Doyle *et al.*, 1990) con ligeras modificaciones. Los productos de ADN se verificaron por espectrofotometría, en un NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermo Scientific, EE.UU.), y solamente se emplearon muestras con valores de las relaciones A260/A280 y A260/A230 de 1.8 a 2.0 ó ligeramente superiores a 2, para asegurar la integridad y calidad de ADN. La amplificación se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) correspondiente a la subunidad pequeña 16S ADNr. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador C1000 Touch (BIO-RAD, EE.UU). Los productos de la PCR se limpiaron con

la enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, EE.UU) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La secuenciación se llevó a cabo en la empresa Psomagen (© Psomagen).

Identificación por medio de Basic Local Alignment Search Tools (BLAST, por sus siglas en inglés). Las secuencias de ambas hebras se ensamblaron y editaron con el software Geneious Prime Alignment Editor v7.2.6 (Geneious, 2023). El ensamble de las secuencias se realizó utilizando ambos fragmentos de cada muestra considerando aquellos que presenten una calidad aceptable en sus electroferogramas, para asegurar que la identificación resultante en su posterior BLAST en la base de datos del GenBank fue más precisa. Se creó una secuencia consenso para cada una de las cepas, que se compararon con secuencias depositadas en la base de datos del BLAST del “National Center for Biotechnology Information” (NCBI) con la opción BLAST_ nucleotide 2.2.29 en https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome.

Análisis filogenético con inferencia bayesiana

Para el análisis filogenético fue necesario descargar las “secuencias tipo” de la base de datos del “List of Prokaryotic names” del “Leibniz Institute DSMZ”, que contiene las secuencias del gen ARN ribosomal 16S de todas las especies de cada género reconocidas oficialmente por la comunidad europea. El alineamiento de cada muestra, se realizó con las demás especies “tipo” de su género para corroborar o corregir a nivel especie su identificación del BLAST, y se analizaron con más detalle aquellas zonas en las que se tienen picos no bien definidos en su electroferograma y se decidió con el alineamiento más apropiado. Posteriormente, se volvió a realizar el alineamiento e identificación. Una vez realizada la edición de las secuencias y su correcta

identificación a nivel especie, las secuencias se prepararon para su depósito al GenBank y obtener un número de acceso.

Las secuencias consenso se compilaron en un formato fasta. El alineamiento múltiple de secuencias “tipo” con la secuencia problema se efectuó con la opción MAFFT v7.475.

La reconstrucción filogenética se elaboró mediante estadística bayesiana con las muestras utilizando el programa Mr. Bayes (Huelsenbeck y Ronquist, 2001), que utiliza inferencia bayesiana en filogenias, puede emplear distintos modelos de sustitución nucleotídica y genera un archivo consenso del árbol bayesiano con las mejores probabilidades, con una desviación estándar <0.01. Derivado de lo anterior, se generó un archivo de árboles para su visualización en formato de imagen.

4.3. Fase 3. Fitorremediación de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina utilizando *Heliantus annuus* y bacterias tolerantes a hidrocarburos (gasolina)

Esta fase de investigación se llevó a cabo en el laboratorio e invernadero del Área de Microbiología de Suelos del posgrado de Edafología del Colegio de Postgraduados campus Montecillo.

Recolecta del suelo

El suelo utilizado para este experimento fue recolectado en Palmarito, Puebla (18°53'00"N 97°39'11"W), de manera manual con una pala, y considerando los primeros 30 cm de profundidad. Se realizó análisis físico y químico, y se determinó el pH (8.3), el contenido de materia orgánica (1.93 %), la textura del suelo fue Franca Limosa (55.0 % limo, 37.2 % arena y 7.9 % arcilla). La capacidad de intercambio catiónico (CIC) fue de 14.44 Cmol(+)kg⁻¹, P disponible 61.4 mg kg⁻¹

(método de Olsen), y N total de 0.077 %. De acuerdo con la NOM-021-RECNAT-2000, el suelo es medianamente alcalino, no volcánico de clase medio en MO, alto en P, CIC alta, alto K de 1.16 $\text{Cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$, bajo en Mg de 0.9 $\text{Cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$, media en Ca de 6.24 $\text{Cmol}_{(+)}\text{kg}^{-1}$, con clase mediano en carbonato de calcio (CaCO_3 , 4.13 %), y se clasifica como un suelo ligeramente salino con conductividad eléctrica de 1.1 dSm^{-1} .

México posee una importante industria petrolera donde el transporte se realiza por oleoductos a lo largo del país (Arroyo *et al.*, 2021), cuyo mal estado físico, genera problemas en las operaciones de mantenimiento y por tomas de productos petrolíferos refinados (p. ej. gasolina). Por esta última actividad, ocurre más del 80 % de los derrames de petróleo cerca de los oleoductos causando efectos adversos a los ecosistemas y la salud humana (Iturbe *et al.*, 2007). Palmarito Tochapán está situada en el municipio de Quecholac (Puebla), que conforma el llamado triángulo rojo, junto con los municipios de Tepeaca, Palmar de Bravo, Acatzingo y Tecamachalco, lo que hace que esta zona sea susceptible a derrames accidentales del combustible (Badillo, 2017).

Establecimiento del experimento en invernadero

El suelo seco se tamizó en malla de 2 mm de apertura, y se contaminó artificialmente con gasolina. En 10 kg de suelo se aplicó gasolina (Magna), en concentraciones de 0, 1,600 y 3,200 mg kg^{-1} , para obtener una mezcla homogénea, la gasolina fue disuelta en 375 mL de hexano (BAKER®, pureza de 98.5 %, 0.001 % de residuo después de la evaporación) (Alarcón *et al.*, 2008). El suelo no se esterilizó con el objetivo de beneficiar el desarrollo de los microorganismos presentes en el suelo. Después de contaminar el suelo, se dejó en reposo por 48 h en el invernadero.

Las unidades experimentales consistieron en contenedores de plástico con 1,150 mL de capacidad usados como mesocosmos, en cada mesocosmos se colocaron 1,000 g de suelo según el tratamiento correspondiente.

La desinfección superficial de las semillas de girasol se realizó con hipoclorito de sodio al 1 % (Clorox®) durante 10 min, en seguida, se realizó un enjuague con agua destilada estéril. Posteriormente, las semillas fueron sumergidas en alcohol al 70 % por un minuto, y se enjuagaron 8 veces con agua destilada estéril (Usha *et al.*, 2011; Gutiérrez-Espinoza *et al.*, 2011). Pasadas las 48 h de reposo del suelo, 10 semillas de girasol se sembraron en cada mesocosmo. Las semillas presentaron germinación mayor al 85 % y después de la emergencia en cada mesocosmos, se raleó dejando 5 plántulas por cada mesocosmo.

Preparación del inóculo bacteriano e inoculación

Las cepas bacterianas aplicadas pertenecientes a seis géneros; *Bacillus* sp., *Priestia* sp., *Massilia* sp., *Streptomyces* sp., *Pseudomonas* sp., *Sphingobium* sp., fueron aisladas de suelo contaminado con gasolina, y seleccionadas por su capacidad de producir fitohormonas, fijar nitrógeno atmosférico, producción de sideróforos y capacidad de solubilizar fosfatos (ver Fase 2).

Cada cepa bacteriana fue propagada en frascos de vidrio con 180 mL de medio Luria-Bertani, a 28 °C por 72 h en agitación a 180 rpm en Incubadora orbital digital (SHKE4000, Modelo 4328). Después, las soluciones bacterianas fueron centrifugadas (Damon/IEC Division HN-SII) a 3,500 rpm durante 30 min para separar el pélet bacteriano del medio de cultivo, se realizaron tres lavados con agua destilada estéril.

El consorcio bacteriano se preparó con el volumen inicial del cultivo para cada cepa y para obtener un volumen final de 1800 mL con agua destilada estéril. Se realizó un conteo de las

unidades formadoras de colonias (UFC) a partir de 1 mL del consorcio bacteriano del cual se hicieron diluciones decimales de 10^{-1} a 10^{-6} , y se tomó 0.1 mL de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , y se colocó en cajas de Petri con agar nutritivo con cinco repeticiones por dilución. Las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C y cuantificadas las UFC a las 24, 48 y 72 h. La carga bacteriana del consorcio fue de 4.0×10^8 UFC mL⁻¹. La inoculación del consorcio se realizó a los 17 días después de la siembra, y cada mesocosmo fue inoculado con 30 mL de suspensión bacteriana de acuerdo con su respectivo tratamiento.

Evaluación de variables de crecimiento

Después de 60 días de la siembra, se midió la altura de las plantas con una cinta métrica y se cuantificó el número de hojas. Las plantas se cosecharon para estimar la longitud radical con una regla; las hojas se separaron de los tallos para calcular el área foliar mediante un medidor de área foliar marca LICOR (LI 3000, Inc. Lincoln, NE, EUA). La biomasa seca de hojas, tallo, raíz y total, se determinó secando cada órgano en horno (SL, SHEL LAB) a 70 °C por 72 h hasta obtener un peso constante y se pesaron en balanza analítica. La relación raíz:parte aérea se obtuvo a partir del peso de la biomasa de las raíces entre la biomasa de la parte aérea, los valores mayores a la unidad indican que las plántulas asignan más biomasa a la raíz que a la parte aérea (García Castro *et al.*, 2018).

Cuantificación de la población de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre

La evaluación de las UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre se realizó en medio de cultivo carbón combinado (Rennie, 1981). De acuerdo con las diluciones en serie (Clark, 1965; Parkinson 1982), se pesaron individualmente, 10 g de suelo seco, correspondiente a cada tratamiento, cada una se vertió en agua destilada estéril y se agitó vigorosamente. De cada

suspensión, se tomó individualmente 1 mL de la dilución y se pasó a un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril y se agitó individualmente vigorosamente; este proceso se repitió consecutivamente hasta obtener la dilución 10^{-7} . A partir de las diluciones 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-6} , por triplicado, se colocó en el centro de cada placa de Petri 0.1 mL y se esparció con una varilla de vidrio en forma de “L”. Las cajas de Petri fueron incubadas a 28 °C y se cuantificaron las colonias a las 72 h después de la incubación. Los resultados se expresaron en unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco (UFC g^{-1}).

Colonización micorrízica

La evaluación de la colonización micorrízica en raíces de *Helianthus annuus* se realizó mediante la técnica de clareo y tinción (Phillips y Hayman, 1970). Se cortaron fragmentos de raíz y se colocaron en KOH al 10 % durante 24 h (clareo). Posteriormente, el KOH fue retirado y las raíces fueron enjuagadas con agua destilada. Después se agregó H_2O_2 al 10 % hasta cubrir las raíces durante 3 min (blanqueo), para después realizar otro enjuague con agua destilada. A las raíces se añadió HCl al 10 % por 3 minutos (acidificación), enseguida se eliminó el HCl, después y sin enjuagar, se añadió azul tripano al 0.05 % en lactoglicerol por 24 h (tinción). Por último, el exceso de colorante fue eliminado de las raíces con lactoglicerol limpio (decoloración).

En un portaobjetos se colocaron 20 fragmentos de raíces de aproximadamente de 1 cm, paralelamente unos a otros. Las raíces se observaron en el microscopio óptico de campo claro con el objetivo de 40X, y se llevó a cabo la observación de 3 pasajes equidistantes por cada portaobjetos, y se registró de cada la presencia de hifas, vesículas y/o arbusculos. El porcentaje de colonización micorrízica se determinó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de colonización total} = \frac{\text{Número de segmentos colonizados}}{\text{Número de segmentos totales}} \times 100$$

Análisis por cromatografía de gases

Por triplicado, las muestras de suelo se secaron a temperatura ambiente, y se tomaron 10 g de suelo, que se colocaron en bolsas de papel filtro. Para la extracción del derivado de petróleo del suelo, se utilizó un soxhlet de 6 parrillas. En los matraces de bola de fondo plano se agregaron 200 mL de disolvente hexano y en el sifón la muestra de suelo. Durante un mínimo de 8 h a una temperatura mínima de 69 °C, para permitir el flujo del hexano y obtener muestras en el disolvente (Rani *et al.*, 2019).

Luego, la muestra se concentró en el evaporador rotatorio (Modelo, RE200) y con un baño María (BM100) a 70 °C conectado con una bomba de vacío hasta obtener muestras secas. Tras la evaporación del disolvente, se añadió hexano para obtener un volumen total de 3 mL (Hou *et al.*, 2019), y la solución se transfirió a viales, se dejó volatilizar a temperatura ambiente hasta secar, finalmente, los viales se almacenaron a temperatura ambiente para su posterior análisis.

Para el análisis las muestras fueron resuspendidas en 20 µL de hexano; del cual se inyectó 2 µL de cada muestra por cada tratamiento correspondiente, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Agilent Technologies, modelo 6890N (Net Work GC system), equipado con una columna DB-5, 5 %-fenil-metilpolisiloxano (Agilent Technologies) de 60 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 µm de espesor de película. La temperatura de inicio fue 50 °C, la cual se mantuvo durante 5 min, posteriormente la temperatura se elevó hasta 280 °C usando una rampa de calentamiento de 20 °C/min, durante 20 min. Se usó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL/min, la temperatura del inyector fue 250 °C, inyección split, con una relación de split de 5:1.

Diseño experimental y análisis estadístico

El experimento consistió de un diseño factorial 3x2, con 3 niveles de contaminación (0, 1,600 y 3,200 mg kg⁻¹), y 2 niveles de bioaumentación (sin y con inoculación bacteriana). En total se obtuvieron 6 tratamientos con 9 repeticiones cada uno (Cuadro 5), distribuidos en un diseño experimental completamente al azar. Los datos obtenidos para cada variable fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de comparación de medias (LSD, $\alpha \leq 0.05$) y la estimación del error estándar para cada media de cada tratamiento con el programa estadístico SAS (Statistical Analysis System 9.0).

Cuadro 5. Tratamientos establecidos en el experimento.

Tratamiento	Concentración (mg kg⁻¹)	Bioaumentación	Repeticiones	Número de plantas por mesocosmos
1	0	Sin inoculación	9	5
2	0	Con inoculación	9	5
3	1,600	Sin inoculación	9	5
4	1,600	Con inoculación	9	5
5	3,200	Sin inoculación	9	5
6	3,200	Con inoculación	9	5

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Fase 1. Germinación y crecimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.) en suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina) en diferentes concentraciones

La germinación de las semillas de girasol no fue afectada por ninguna concentración de gasolina, ya que en todos los tratamientos se observó la germinación de sus respectivas semillas (Figura 5). Al respecto, la germinación de semillas ha sido base para evaluar la toxicidad de los HP o de los contaminantes inorgánicos (Pernía *et al.*, 2018).

El efecto toxicológico del petróleo se ha registrado en semillas de girasol, las cuales no emergieron en el suelo contaminado de petróleo, pero posteriormente, al realizar el trasplante en el suelo contaminado se registraron daños en el meristemo (Hassan, 2018). La germinación de semillas es un proceso que ocurre por varios procesos fisiológicos y es sensible ante diferentes factores como la toxicidad de los contaminantes orgánicos e inorgánicos (Rodríguez Romero *et al.*, 2014).

En suelos contaminados con hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) como fenantreno, naftaleno y pireno, la germinación de lechuga (*Lactuca sativa* L.) fue afectada ante altas concentraciones, mostrando un efecto inhibitorio del 12 % ante naftaleno a 500 mg L⁻¹, y del 100 % ante 1,000 mg L⁻¹ (Pernía *et al.*, 2018). Por otro lado, después de 14 días de la siembra, no se registró emergencia en plántulas de cebada (*Hordeum vulgare* L.) en un suelo contaminado con hidrocarburos de petróleo (Ambaye *et al.*, 2022). Daryabeigi Zand y Hoveidi (2018), evaluaron la germinación y la biomasa de Burningbush (*Kochia scoparia* L.) y maíz (*Zea mays* L.) en suelos contaminados con gasolina; en ambas plantas, la germinación no se inhibió aun en altas

concentraciones del hidrocarburo (1,000, 3,000, 6,000 y 10,000 mg kg⁻¹), obteniéndose alta tasa de germinación de semillas.

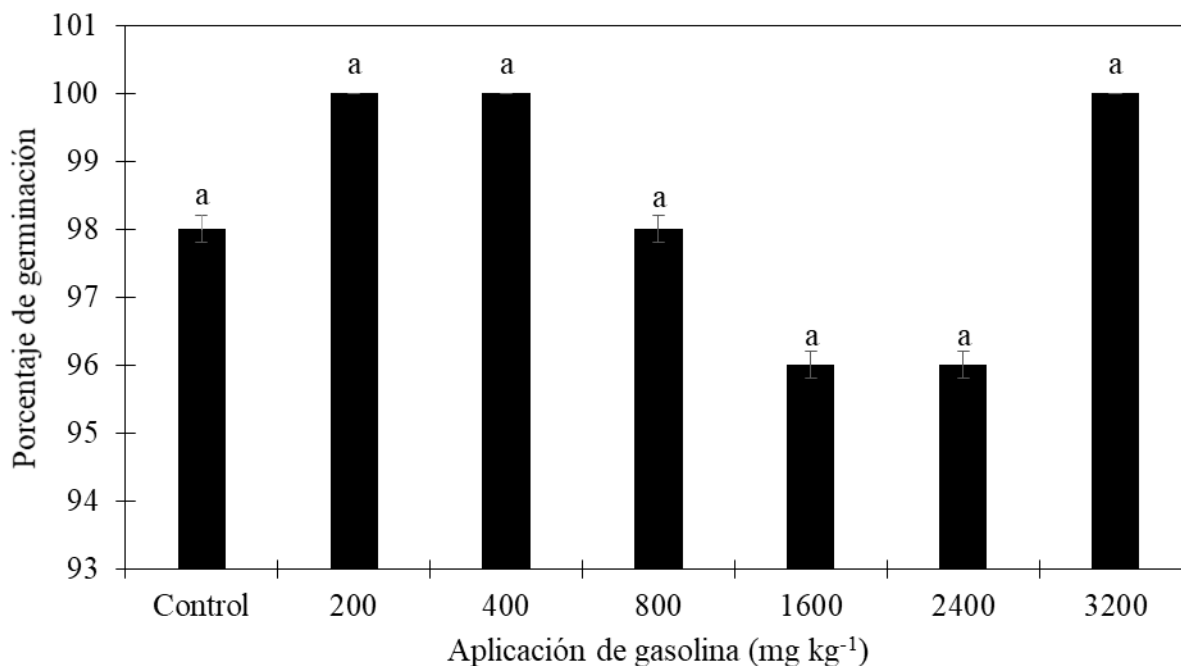


Figura 5. Porcentaje de germinación de semillas de girasol (*Helianthus annuus*), establecidas en suelo agrícola contaminado con gasolina en condiciones de invernadero. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LDS, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar, n = 5.

La aplicación de 200 y 400 mg kg⁻¹ no mostró diferencias significativas en la altura de las plantas con respecto a plantas control (Figura 6A); en contraste, las concentraciones de 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹ redujeron significativamente la altura (Figura 6A), por otro lado las concentraciones 800 y 1,600 mg kg⁻¹ presentaron mayor altura con respecto al control. El tratamiento control presentó mayor longitud radical, mostrando diferencias significativas con respecto al tratamiento con 3,200 mg kg⁻¹ (Figura 6B). La biomasa seca total mostró diferencias significativas entre el control y el resto de los tratamientos; mientras que las plantas con menor biomasa correspondieron a los tratamientos con 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹ (Figura 6C).

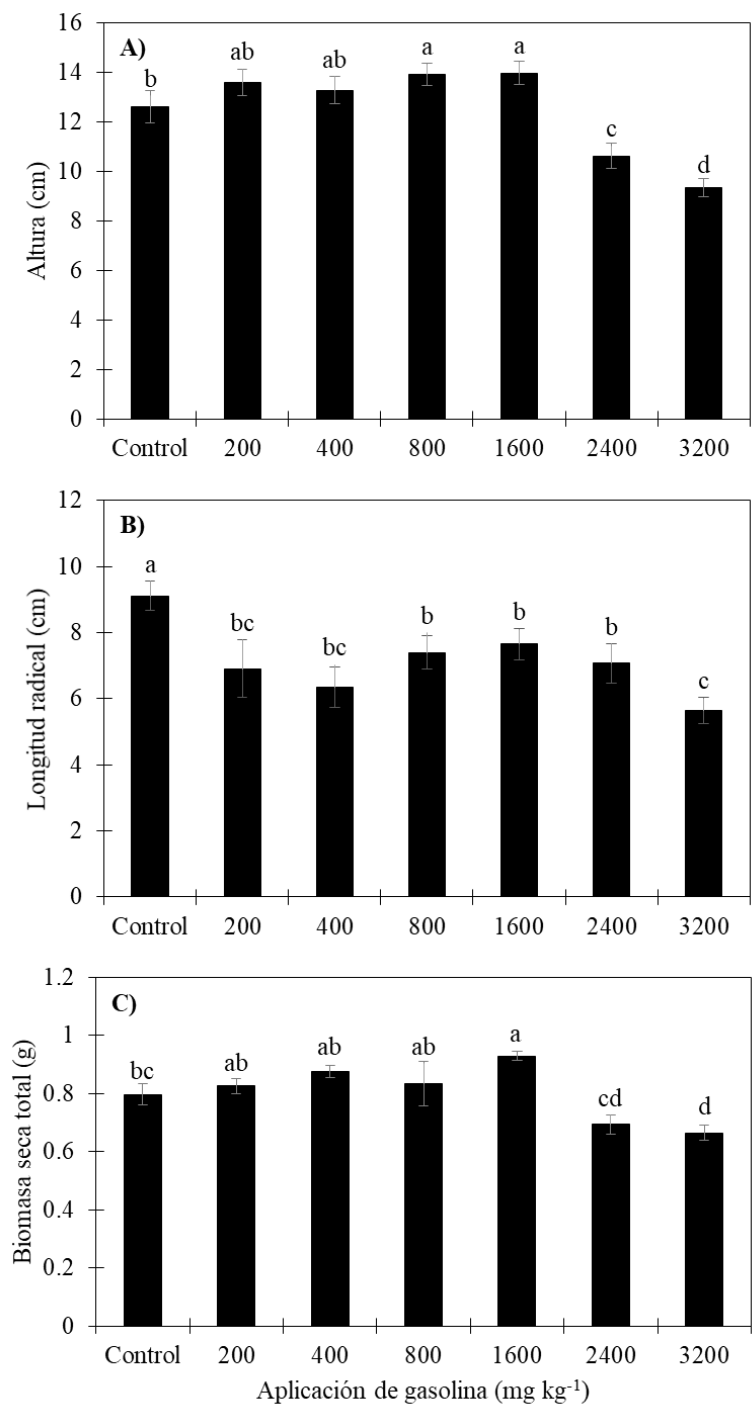


Figura 6. Comportamiento del girasol (*Helianthus annuus*), establecidas en suelo agrícola contaminado con gasolina, después de 20 días de crecimiento en condiciones de invernadero. Altura de la planta (A), longitud radical (B), y biomasa seca total (C). Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar, n = 5.

Daryabeigi Zand y Hoveidi (2016) evaluaron la germinación, la altura y la biomasa del girasol en suelos contaminados con gasolina, registrando que el contaminante no inhibió la germinación, ni la altura y ni la biomasa vegetal ante concentraciones de 500, 1,000 y 2,500 mg kg⁻¹, aunque se observaron reducciones de estos parámetros ante 5,000 mg kg⁻¹. De igual manera, las plantas de zarza ardiente (*Kochia scoparia* (L.) Schard) y de maíz (*Zea mays* L.), toleran la contaminación por gasolina hasta 10,000 mg kg⁻¹; pero la germinación, la biomasa y el crecimiento fueron afectados significativamente por la aplicación de concentraciones mayores a 10,000 mg kg⁻¹ (Daryabeigi Zand y Hoveidi, 2018).

Resultados similares se presentaron en el presente bioensayo con girasol a diferentes concentraciones, donde la germinación no fue afectada en las concentraciones de 200, 400, 800 y 1,600 mg kg⁻¹ pero ante concentraciones mayores (2,400 a 3,200 mg kg⁻¹) la altura y la biomasa seca total de las plantas fueron significativamente afectadas.

Merkl *et al.* (2005) mencionan que la producción de brotes y la materia seca de *Eleusine indica* no son afectadas por la contaminación con petróleo crudo; en contraste, este hidrocarburo afectó el crecimiento de *Calopogonium mucunoides*, *Centrosema brasilianum*, *Stylosanthes capitata*, *Brachiaria brizantha* y *Cyperus aggregatus*. Cai *et al.* (2010) evaluaron el potencial de la especie ornamental *Impatiens balsamina* L., para utilizarla en la fitorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos de petróleo, observando que la altura, la longitud radical, el peso seco no fueron afectados ante concentraciones de 5,000 y 10,000 mg kg⁻¹; en contraste, ante concentraciones de 20,000 y 40,000 mg kg⁻¹, la longitud radical fue significativamente menor. En el presente trabajo se observó que las diferentes concentraciones de gasolina redujeron la longitud radical, ya que la raíz esta expuesta directamente con el contaminante; así, la concentración 3,200 mg kg⁻¹ produjo la mayor inhibición de la longitud radical de las plantas del girasol.

En contraste con otros contaminantes que inhiben la germinación y el crecimiento del girasol (Gutiérrez-Espinosa *et al.*, 2011; Rani *et al.*, 2019), y con base en los resultados obtenidos en la presente investigación, esta planta es tolerante a las concentraciones evaluadas, observándose que su crecimiento fue afectado ante altas concentraciones de gasolina (2,400 y 3,200 mg kg⁻¹). Además, las plantas de girasol no presentaron síntomas de deficiencias o enfermedades visuales durante el tiempo que duró el presente bioensayo.

5.2.Fase 2. Caracterización e identificación de bacterias nativas aisladas de un suelo contaminado con gasolina con potencial de promotoras de crecimiento vegetal

Se caracterizaron 10 cepas bacterianas a partir de tinción de Gram y pruebas bioquímicas (Cuadro 6). Según la tinción de Gram, ocho cepas fueron Gram-negativas, la mayoría con la forma de bacilo; una cepa bacteriana fue gram-positiva y una cepa correspondió a una actinobacteria.

Las pruebas bioquímicas para determinar potenciales bacterias promotoras de crecimiento vegetal (BPCV), basadas en la producción de índoles totales, ocho cepas reaccionaron positivamente. En la prueba fijación de nitrógeno (NFb), tres cepas no mostraron cambio en el color verde esmeralda, el resto cambió a color azul correspondiendo a una reacción positiva. En la prueba de producción de sideróforos, únicamente tres cepas tuvieron la presencia de halo, dando como positivo a dicha producción. Para la solubilización de fosfatos, solo tres cepas tuvieron la presencia de halo, resultando positivas a esta prueba.

Los microorganismos y las plantas están asociadas de manera endófitas, filosféricas o rizosféricas, la microbiota promueve el crecimiento de las plantas, regula la síntesis de fitohormonas, y genera tolerancia al estrés biótico y abiótico, además reduce los niveles de toxicidad del sitio y permiten su establecimiento la fitorremediación de sitios contaminados (Gkorezis *et al.*, 2016).

Cuadro 6. Caracterización macro y microscópica de 10 cepas bacterianas aisladas de suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina.

Clave	Caracterización macroscópica						Caracterización microscópica		Pruebas bioquímicas			
	Forma	Elevación	Color	Textura	Borde	Halo	Morfología	TG	AIA	S	Nfb	SP
SC1	Circular	Plana	Transparente	Viscosa	Ondulado	+	Bacilo	-	+	-	+	-
SC2	Circular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	+	-
SC3	Circular	Plana	Amarillo	Viscosa	Entero	-	Coco	-	-	-	+	-
SC4	Circular	Plana	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	-	-
SC6	Circular	Algodonosa	Blanco	Algodonosa	Entero	-	Filamentosa	-	+	-	-	+
SC7	Irregular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Ondulado	-	Bacilo	-	-	+	+	+
SC8	Circular	Plana	Rojo	Viscosa	Ondulado	-	Coco	+	+	+	+	+
SC11	Circular	Cóncava	Blanco	Viscosa	Entero	-	Bacilo	-	+	-	+	-
SC12	Circular	Plana	Blanco	Viscosa	Entero	+	Bacilo	-	+	-	-	-
SC15	Circular	Cóncavo	Blanco	Cremosa	Entero	-	Bacilo	-	+	+	+	-

(+) = actividad positiva, (-) = actividad negativa. TG = Tinción de Gram, S = Sideroforos, SP = Solubilizadores de P.

Poblaciones bacterianas

El mayor número de UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre (BFNVL), correspondió al suelo control con 7.5×10^6 UFC gramo de suelo seco (UFC g^{-1}), seguido del suelo con $3,200 \text{ mg kg}^{-1}$ con 6.2×10^6 UFC g^{-1} , y de al suelo con $2,400 \text{ mg kg}^{-1}$, y por último, al suelo con 200 mg kg^{-1} , teniendo 5×10^6 UFC g^{-1} y 3.9×10^6 UFC g^{-1} , respectivamente (Figura 7). De acuerdo al análisis de varianza, los suelos no mostraron diferencias significativas. La disminución de las BFNVL en los suelos contaminados fue de 47.6 %, 33.9 % y 17.2 % (200, 2,400 y 3,200 mg kg^{-1} , respectivamente) con respecto al suelo control.

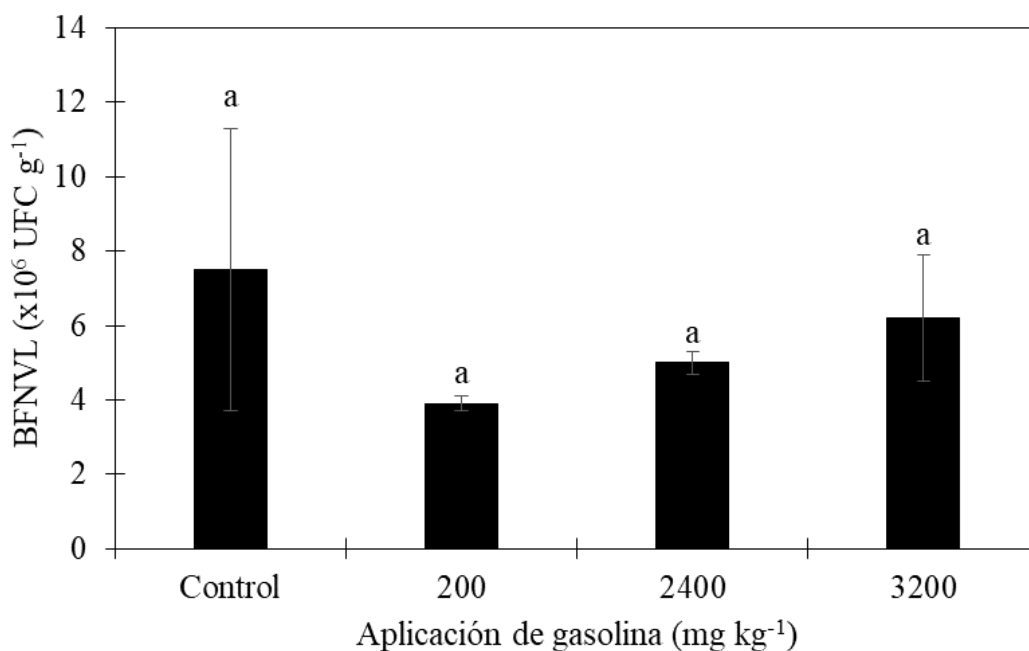


Figura 7. Comportamiento de la población de BFNVL aisladas de un suelo contaminado artificialmente con tres concentraciones de gasolina, después de 20 días. UFC g^{-1} = Unidades Formadoras de Colonias por gramo de suelo seco. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Medias \pm error estándar, $n = 3$.

Dentro de los efectos ocasionados por los hidrocarburos en el suelo se presenta la reducción de la diversidad de microorganismos debido a la toxicidad provocada por los contaminantes, no

obstante, al suscitarse estas alteraciones en las comunidades, también se da paso a los mecanismos de adaptación, principalmente mediante cambios en la fisiología en aquellos microorganismos tolerantes a los contaminantes. Estos grupos de microorganismos que se adaptan a la presencia de los contaminantes pueden biotransformar a compuestos menos tóxicos al utilizarlos como fuente de carbono, otros microorganismos favorecen la estabilización de los contaminantes en la materia orgánica y con ello reduce su biodisponibilidad (Klimek *et al.*, 2016).

En un suelo contaminado con queroseno (2,500 mg kg⁻¹), se obtuvo mayor población de BFNVL tanto en el rizoplasma como en la rizosfera de frijol Michoacán 12-A3 (Hernández *et al.*, 2003). Similarmente, la rizosfera de *Chamaecrista nictitans* registró mayor población de BFNVL (208 x10⁵ UFC g⁻¹) en suelo contaminado con hidrocarburos (4,600 mg kg⁻¹) (Hernández-Acosta *et al.*, 2006).

En el presente estudio aun cuando no se observaron diferencias significativas, el suelo contaminado con 3,200 mg kg⁻¹ mostró mayor crecimiento de UFC. Estos resultados son similares al obtenido en un suelo contaminado con aceite residual automotriz (60,000 ppm) con una población bacteriana de 268 x10⁶ UFC g⁻¹, en contraste, en el suelo sin contaminar se obtuvieron 40 x10⁶ UFC g⁻¹ (Saucedo-Martínez *et al.*, 2017). Por su parte, ante la contaminación con petróleo (10,389 mg kg⁻¹), el rizoplasma, la rizosfera y el suelo no rizosférico de plantas de mangle (*Laguncularia racemosa* L.) mostraron mayor población de BFNVL (10,389 mg kg⁻¹), 84, 71 y 27 x10³ UFC g⁻¹, respectivamente (López-Jiménez *et al.*, 2019).

Identificación de cepas

Las 10 cepas bacterianas fueron identificadas como (SC1) *Bacillus* sp., (SC2) *Priestia megaterium*, (SC3) *Massilia timonae*, (SC4) *Bacillus* sp., (SC6) *Streptomyces flavotricini*, (SC7)

Pseudomonas palleroniana, (SC8) *Streptomyces flavotricini*, (SC11) *Sphingobium yanoikuyae*, (SC12) *Bacillus* sp. y (SC15) *Pseudomonas palleroniana* (Cuadro 7).

Cuadro 7. Identificación molecular de las cepas aisladas de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina.

Clave de las cepas bacterianas	Concentración de gasolina (mg kg ⁻¹)	Especies y géneros	Número de acceso GenBank	Porcentaje de similitud (%)
SC1	2,400	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559532	99.74
SC2	200	<i>Priestia megaterium</i>	OQ559533	100
SC3	200	<i>Massilia timonae</i>	OQ559534	99.90
SC4	3,200	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559535	99.87
SC6	200	<i>Streptomyces flavotricini</i>	OQ569160	100
SC7	0	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	OQ559536	99.93
SC8	0	<i>Streptomyces flavotricini</i>		100
SC11	3,200	<i>Sphingobium yanoikuyae</i>	OQ559476	99.933
SC12	2,400	<i>Bacillus</i> sp.	OQ559537	99.8
SC15	3,200	<i>Pseudomonas palleroniana</i>	OQ559538	99.93

Con respecto a la identificación de la cepa SC8, solo se amplificó el primer 518F, por lo que este tipo de secuencia no se consideró para generar el árbol filogenético. Los géneros identificados en el presente trabajo, han sido reportados en la aplicación de la biorremediación de suelos

contaminados por petróleo o por alguno de sus derivados (Gu *et al.*, 2016; Alegbeleye *et al.*, 2017; Baoune *et al.*, 2019; Kuri *et al.*, 2019; Mitra *et al.*, 2020; Romano-Armada *et al.*, 2020; Cruz-Hernández *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022). En cuanto a la cepa *Bacillus* sp., se han reportado especies que tienen la capacidad de degradar hidrocarburos y de crecer en medios con concentraciones de glifosato (herbicida) y utilizarlo como fuente de energía (Elarabi *et al.*, 2020). Además, otras especies de *Bacillus* pueden promover el crecimiento vegetal, biosintetizar AIA, participar en el metabolismo del nitrógeno, y mejorar la respuesta al estrés y la resistencia hacia antibióticos (Deng *et al.*, 2022). Dahmani *et al.* (2020) reportaron beneficios de *Bacillus megaterium* en la promoción del crecimiento de *Arabidopsis thaliana* en condiciones controladas.

Las bacterias del género *Pseudomonas* han sido aisladas de sitios contaminados con hidrocarburos y tienen potencial de uso en biorremediación al producir biosurfactantes y enzimas que degradan compuestos alifáticos y aromáticos (Castillo Rogel *et al.*, 2020). Chandra y Sharma (2021) indicaron que *Pseudomonas palleroniana* solubiliza fosfatos, produce sideróforos, AIA, amoníaco y fija N atmosférico.

Por otra parte, *Priestia megaterium* tiene características de promover el crecimiento vegetal, fijar nitrógeno atmosférico, solubilizadoras de fosfatos y potasio, productora de ácido indolacético y 1-aminociclopropano-1-carboxilato desaminasa (ACC) (Li *et al.*, 2022)

Fasusi *et al.* (2021), reportan a la bacteria *Massilia* sp. (Oxalobacteriaceae), como promotora del crecimiento vegetal al dar positivo a la producción de AIA, sideróforos, catalasa y amoníaco. El género *Massilia* incluye también especies de bacterias hidrocarbonoclasticas (Ali *et al.*, 2016).

Por su parte, *Streptomyces* sp. puede ser aplicado como bioinoculante agrícola por su rápido crecimiento, por producir sideróforos, AIA, amoníaco, por solubilizar fosfatos inorgánicos, y por

inducir resistencia hacia fitopatógenos (Romano-Armada *et al.*, 2020; Nonthakaew *et al.*, 2022). Además, Alotabia *et al.* (2022) reportado a la bacteria *Sphingobium yanoikuyae* como productora de AIA, amoníaco, ACC y fijadora de N. Alotabia *et al.* (2022) han reportado a la bacteria *Sphingobium yanoikuyae* como productora de AIA, amoníaco, ACC y fijadora de N.

En general, el aislamiento y la selección de microorganismos nativos adaptados a los hidrocarburos son fundamentales para la biorremediación (Lima *et al.*, 2020). La estructura de las comunidades microbianas, el contenido de biomasa y el número de microorganismos se han utilizado para estudiar la dinámica de sucesiones poblacionales, la identificación de poblaciones predominantes y su eficiencia en procesos de biorremediación (Ortíz-Maya *et al.*, 2017).

5.3. Fase 3. Fitorremediación de un suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina utilizando *Heliantus annuus* y bacterias tolerantes a hidrocarburos (gasolina).

Crecimiento y producción de biomasa de *Heliaunthus annuus*

La inhibición la germinación de semillas, reducción la altura de las plantas, la densidad del tallo, la tasa fotosintética y la biomasa, o la mortalidad de las plantas son los parámetros más utilizados para determinar los efectos fitotóxicos de contaminantes como los hidrocarburos (Lin *et al.*, 2002). Al finalizar el bioensayo del presente trabajo se evaluaron parámetros de crecimiento en las plantas expuestas a las concentraciones de gasolina (Figura 8). En general, se registró menor longitud radical (Figura 8A) y menor altura (Figura 8B) en las plantas de los tratamientos con gasolina, comparado con el tratamiento 0 + inoculación, donde se observaron los mayores valores.

Trujillo-Tapia *et al.* (2018) obtuvieron resultados similares al observar efectos negativos en las raíces de las plantas de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) expuestas a 895 ppm petróleo crudo

ligero, sin embargo, a bajas concentraciones (223 y 447 ppm) la altura de las plantas no se modificó significativamente. Lo anterior podría deberse al efecto de homeostasis en las plantas expuestas a bajas concentraciones de los contaminantes (Malkowski *et al.*, 2020). La hormesis se describe como un fenómeno de respuesta a estimulación por dosis bajas de sustancias tóxicas (Malkowski *et al.*, 2020). Así, en la presente investigación, la homeostasis se pudo haber presentado en las plantas de girasol ante bajas concentraciones de gasolina ($1,600 \text{ mg kg}^{-1}$); en contraste, en los tratamientos con concentraciones altas de gasolina, la inhibición del crecimiento de las plantas fue mayor con respecto a las plantas sin contaminante.

Por otro lado, la aplicación de petróleo crudo ligero inhibió el crecimiento (altura y longitud radical) de *Leucaena leucocephala* Lam. ante $10,000$ y $80,000 \text{ mg kg}^{-1}$ y *Crotalaria incana* L. ante $1,700$ y $32,000 \text{ mg kg}^{-1}$ (Vázquez-Luna *et al.*, 2011). Por otra parte, la aplicación de petróleo crudo resultó en la disminución de la altura en 10.6% de plantas de *Triticum activnm* L. con respecto a las plantas control (Shen *et al.*, 2016). Por su parte, Sivaram *et al.* (2019), observaron mayor sensibilidad en la longitud de la raíz con respecto a la longitud de los brotes de plantas de *Pisum sativum* cultivadas en suelos contaminados con 95.4 mg kg^{-1} de HAP. Lo anterior podría deberse a que el contacto directo de la raíz con los contaminantes podría tener efectos tóxicos en el proceso de división celular y en la elongación de la zona apical (Trujillo-Tapia *et al.*, 2018), afectando con ello, la absorción de nutrientes y agua, y el crecimiento y desarrollo vegetal (Sivaram *et al.*, 2019). Además, la exposición al petróleo y sus derivados puede retrasar la germinación de semillas disminuir la altura y la biomasa vegetal (Hawrot-Paw y Bąkowska, 2014).

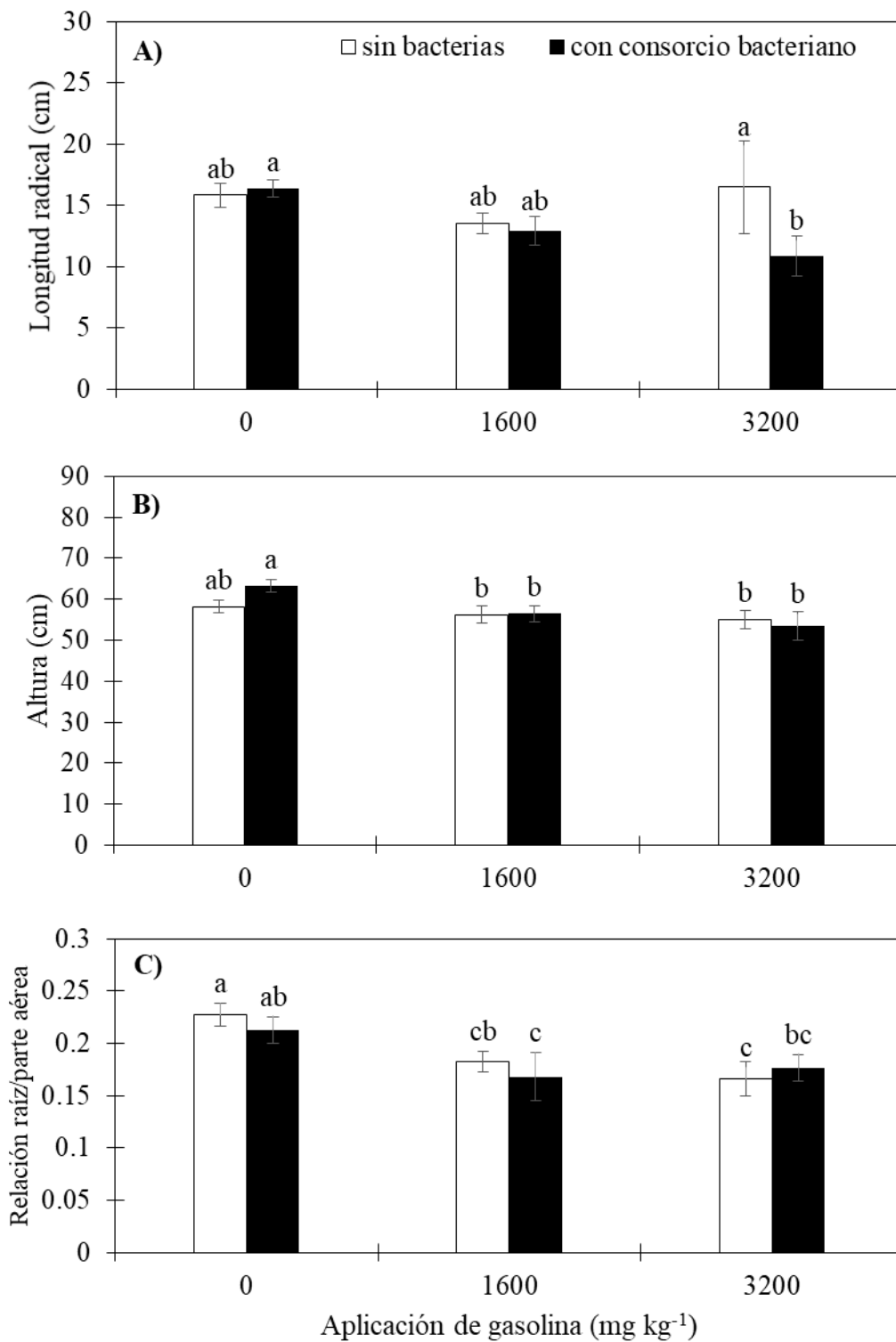


Figura 8. Longitud radical (A), Altura (B) y relación raíz/parte aérea (C) de *Helianthus annuus* crecida en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

La relación raíz/vástago hace referencia al cociente entre el peso seco de los órganos que conforman la raíz entre la parte aérea de la planta, un cambio en el peso de cualquiera de los factores tiene como consecuencia un desbalance en dicha relación (Casierra-Posada y Cárdenas-Hernández, 2009). En el presente estudio se obtuvo la relación vástago/raíz de las plantas de girasol en cada uno de los tratamientos (Figura 8C). Se puede observar que la presencia del contaminante tuvo efectos significativos sobre la relación raíz/vástago, con respecto a los tratamientos control. La inoculación del consorcio bacteriano modificó significativamente la relación raíz/vástago, mientras que en el tratamiento 0 + sin inoculación se observó el mayor valor en la relación raíz/vástago y en el tratamiento 3,200 + sin inoculación se observó el menor valor (Figura 8C).

A pesar de los cambios observados en la relación raíz/vástago, en el presente trabajo no se obtuvieron valores iguales o mayores a 1.0 por lo que no se podría considerar que la biomasa del vástago se modificó en mayor medida a la biomasa de la raíz, y por lo tanto, no hubo un desbalance en el sistema (Senilliani *et al.*, 2022). Al respecto, las plantas de *Mauritia flexuosa* expuestas a petróleo crudo en el suelo (4, 8, 16 y 32 % en el suelo) modificaron significativamente la relación raíz/vástago (Hernández-Valencia *et al.*, 2020). Cuando se obtienen valores que induzcan desbalances en la planta, éstos podrían deberse a un cambio en la redistribución de la biomasa a la parte de la planta donde se requiere, por efecto de algún agente de estrés abiótico o biótico (Camargo Rodríguez y Rodríguez López, 2006).

El crecimiento, desarrollo y rendimiento de las plantas, depende de los órganos que son fuente de energía (hojas), por lo tanto, el número de hojas es importante para la planta al generar asimilados y translocarlos a los órganos donde se requieran (Barrientos Llanos *et al.*, 2015). En el presente trabajo se observó que el tratamiento 0 + inoculación presentó mayor número de hojas, mientras que el tratamiento 3,200 + inoculación presentó el menor número (Figura 9).

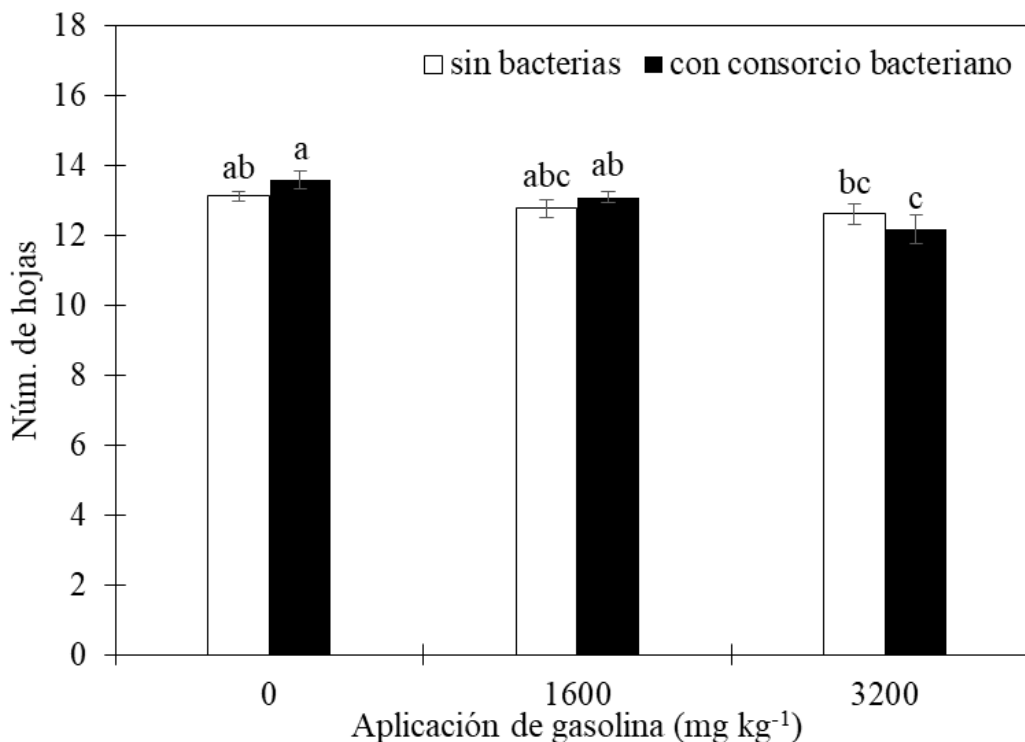


Figura 9. Número de hojas de *Helianthus annuus* en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

Al respecto, Abdul-Ameer Ali (2019) registró menor número de hojas en plantas de cebada, además se observaron hojas de color rojizo, floración tardía, reducción de altura y disminución en el rendimiento de grano, después de exponer las plantas a hidrocarburos del petróleo. Por otro lado, también se reporta la disminución del número de hojas de *Avicennia marina* por su exposición a concentraciones de petróleo crudo (0, 2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 % p/p) (Moradi *et al.*, 2021).

Contrario a nuestros resultados, Martins *et al.* (2014), reportaron que las plantas de girasol expuestas a suelos multicontaminados con V, Ni, Cu, Pb, benzo(a)pireno e hidrocarburos totales de petróleo (TPH) procedentes de una refinería de petróleo, no se observaron diferencias en el número de hojas y flores, ni en altura de las plantas.

La diferencia entre los resultados de Martins *et al.* (2014) y los reportados en el presente trabajo podrían deberse a que los efectos tóxicos de los compuestos orgánicos (hidrocarburos) o inorgánicos (metales pesados y metaloides) depende de la especie vegetal y de las concentraciones utilizadas, además de la presencia o ausencia de microorganismos que pudieran tener un efecto sinérgico con las plantas para tolerar los contaminantes sin que muestren algún cambio fenológico (Guarino *et al.*, 2017; Petrová *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2019).

El efecto fitotóxico del petróleo crudo se refleja por clorosis, decoloración, manchado de hojas, necrosis, malformaciones en células epidérmicas y capas del mesofilos, reducción del rendimiento y disminución de la fecundidad, incluso el estrés radicular contribuye a la disminución del crecimiento de hojas y la conductancia estomática (Olusola y Anslem, 2010).

En el presente trabajo, no se registraron efectos negativos anatómicos visibles en las plantas de girasol por la gasolina, sin embargo, se cuantificó el área foliar de las plantas de girasol (Figura 10A), observándose diferencias significativas ($P \leq 0.05$) en el área foliar por efecto del contaminante. La mayor área foliar fue registrada en el tratamiento 0 + inoculación y la menor área foliar se obtuvo en el tratamiento 3,200 + inoculación (Figura 10A).

Además, el área foliar fue utilizada para obtener el área foliar específica; en este caso el tratamiento 0 + inoculación presento mayor área foliar específica, a diferencia del tratamiento 3,200 + inoculación el cual presentó el menor valor (Figura 10B). Los resultados son similares a los reportados por Mallhi *et al.* (2020) al registrar valores bajos de área foliar en plantas de girasol expuestas a concentración de aguas residuales de curtiduría (25, 50, 75 y 100 %). De igual forma, el queroseno (2,000 mg kg⁻¹) disminuyó el área foliar de *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Chloris*

gayana y *Triticum aestivum* (García *et al.* 2013). Devi y Kumar (2020), obtuvieron reducciones del área foliar de plantas de *Zea mays* L. expuestas a cromo (100 ppm).

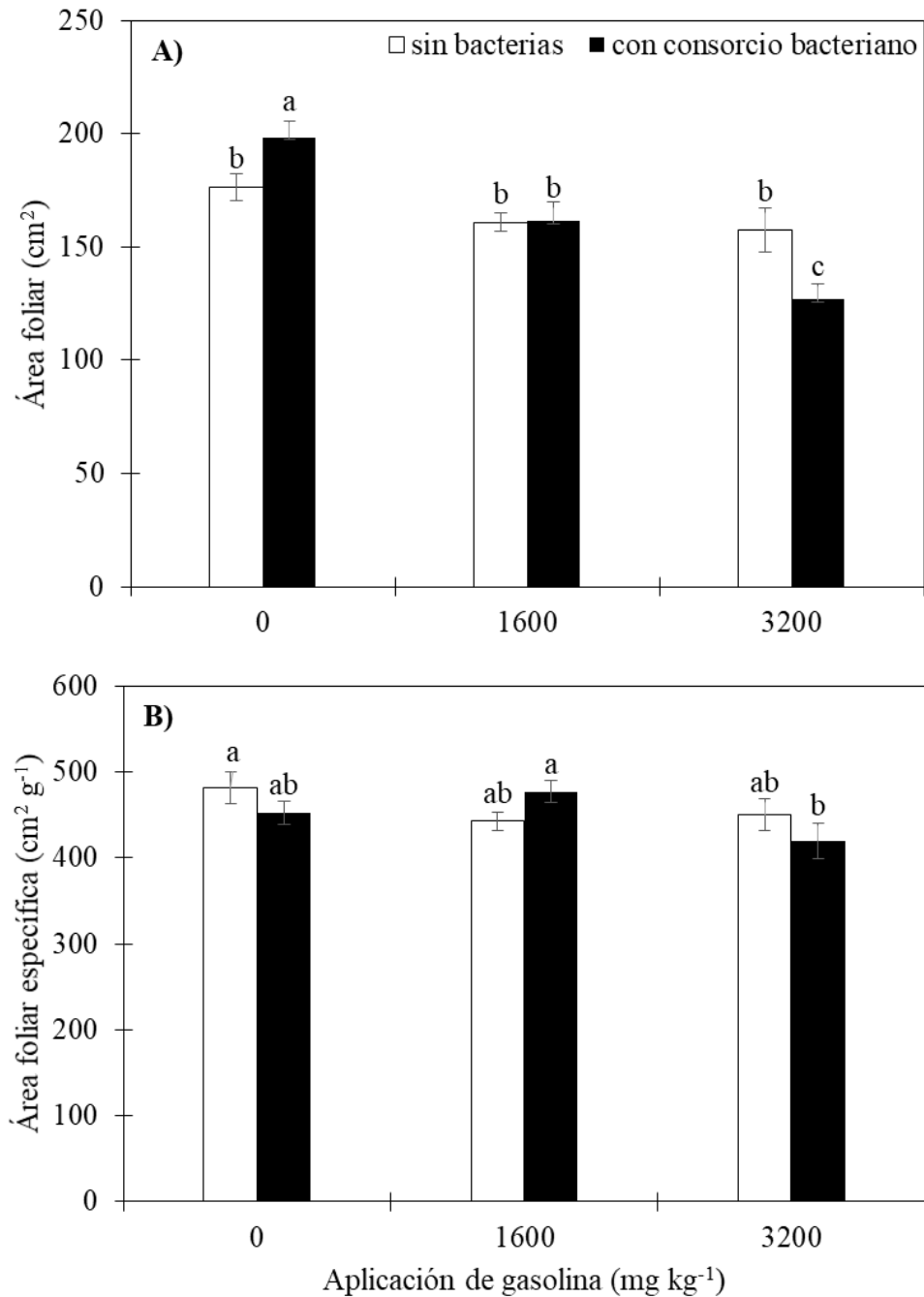


Figura 10. Área foliar (A) y área foliar específica (B) de *Helianthus annuus* crecidas en suelos contaminados artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

Las hojas son los órganos fotosintéticos y son esenciales para la producción de biomasa vegetal. El área foliar está relacionada con la producción vegetal, en procesos fisiológicos como la captación de luz, la eficiencia fotosintética, la respiración, la transpiración y a la fertilización y determina el crecimiento y rendimiento de los cultivos (Casierra-Posada *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2021). La expansión del área foliar depende de las condiciones ambientales, como el déficit de agua, la densidad del flujo de fotones, temperatura y demanda por evaporación (Tardieu *et al.*, 1999). Debido a que las plantas están en contacto directo con los contaminantes a través del sistema radical, pudiendo translocados incluso a la parte aérea, provocando la disminución del área foliar y afectando el crecimiento y desarrollo vegetal (Petrová *et al.*, 2017).

El área foliar puede ser indicador del crecimiento y rendimiento en los cultivos, de igual manera, la biomasa es un indicador de la tolerancia y el efecto de remediación de las plantas en suelos contaminados por petróleo (Casierra-Posada *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2021; Wei *et al.*, 2019). En el presente trabajo se cuantificó la biomasa seca aérea y la de raíz de las plantas de girasol. En la Figura 11 se muestra que los tratamientos 0 + inoculación y 0 + sin inoculación fueron los tratamientos donde se obtuvieron mayores valores de biomasa seca. Las plantas expuestas a gasolina, mostraron significativamente menor biomasa con respecto a los tratamientos control. Esto muestra claramente el efecto negativo que la gasolina tiene sobre las plantas, sin importar la concentración del hidrocarburo, ya que entre las dosis aplicadas de gasolina no presentaron diferencias significativas en este parámetro. Resultados similares se reportaron en *Panicum máximum* y *Brachiaria brizantha* en un suelo contaminado con petróleo (3 %) con respecto al control (Hernández-Valencia y Mafer 2003). Jagtap *et al.* (2014) observaron que la biomasa de *Populus tomentiglandulosa* y *Pinus densiflora* disminuyó ante el diésel (6,000 mg kg⁻¹), en contraste, la biomasa de *Thuja orientalis* no mostró efectos negativos por este contaminante.

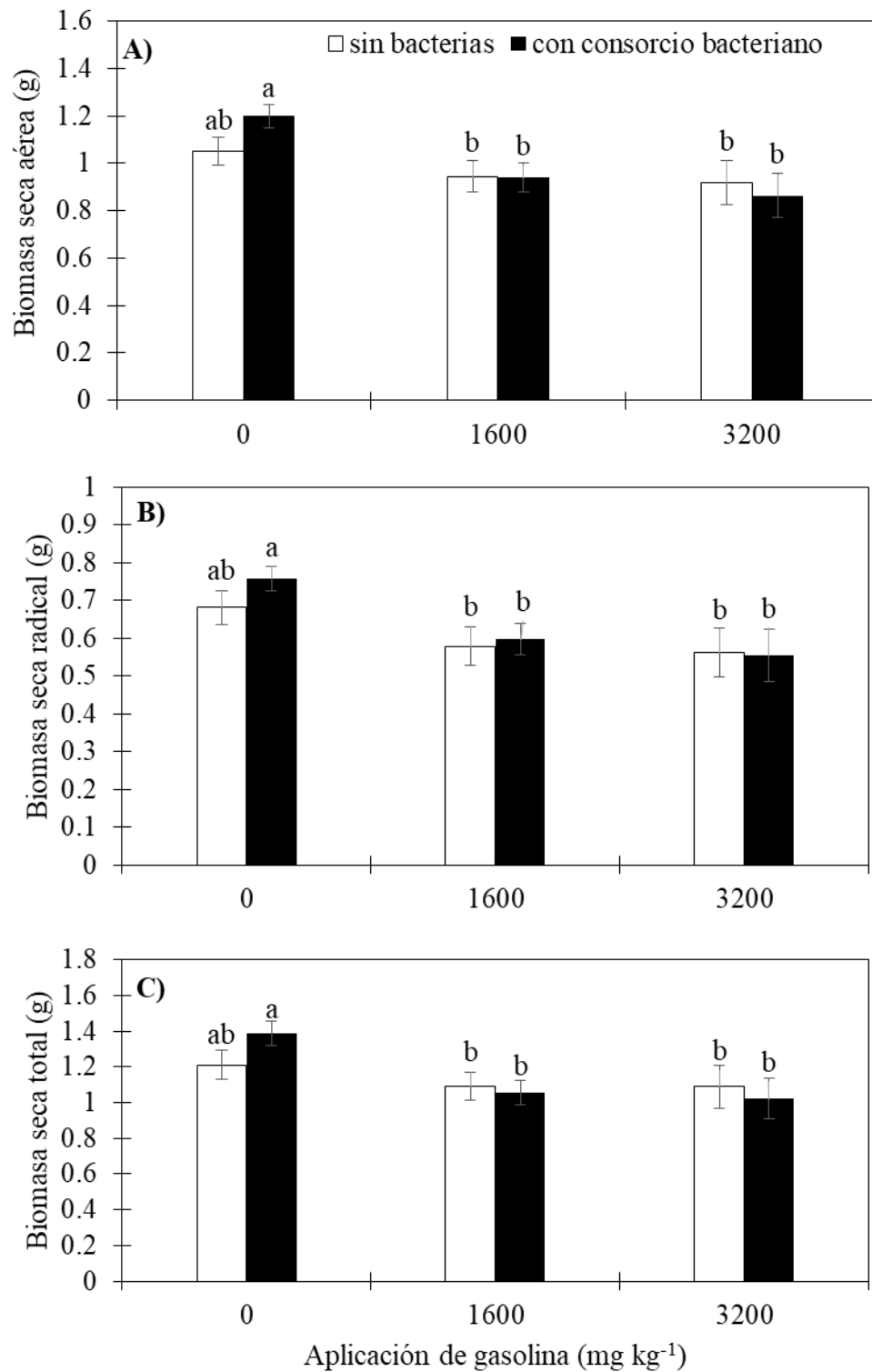


Figura 11. Biomasa seca aérea (A), biomasa seca raíz (B) y biomasa seca total (C) de *Helianthus annuus* en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg⁻¹), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

La capacidad de *Helianthus annuus* para crecer, absorber y acumular metales pesados (plomo) e hidrocarburos totales de petróleo (8,508 mg kg⁻¹), se ha evaluado en suelo contaminado y adicionado con humus de lombriz, aserrín de bolaina blanca y perlita blanca. Los resultados mostraron que el suelo contaminado adicionado con humus y perlita, incrementaron la altura y el peso (raíz, tallo y hojas), y acumularon metales e hidrocarburos de petróleo (Buendía Ríos *et al.*, 2014).

Lo anterior pudiera ser un reflejo de los cambios fisiológicos (captación de luz, eficiencia fotosintética, respiración transpiración, respuesta al riego y fertilización, por ejemplo) en las plantas por efecto de los contaminantes (Casierra-Posada *et al.*, 2008; Nasution *et al.*, 2021).

Cuantificación de la población de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre

Los hidrocarburos de petróleo reducen significativamente la abundancia y diversidad de especies que integran a las comunidades microbianas del suelo (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021), por ello, el presente estudio se cuantificó las UFC de BFNVL (Figura 12A). El mayor número de UFC se obtuvo en el tratamiento 0 + inoculación (1.30 x10⁶ UFC g⁻¹) comparado con el tratamiento 1,600 + sin inóculo con (0.4 x10⁵ UFC g⁻¹), denotando que en los tratamientos con inóculo (bioaumentación), la población bacteriana disminuyó en presencia de la gasolina (Figura 12A). En contraste, los tratamientos sin bioaumentación, la población bacteriana incrementó ligeramente en presencia de gasolina (Figura 12A).

García *et al.* (2013), observaron la disminución significativa en las UFC en el rizoplaneo de avena, cebada, pasto y trigo (6.2 ± 0.09, 8.3 ± 0.06, 7.8 ± 0.1 y 5.6 ± 0.05 x10⁵ UFC, respectivamente) al crecer ante 2,000 mg kg⁻¹ queroseno. Estas poblaciones bacterianas se ajustan

a rangos recomendables (10^4 a 10^7 UFC) descritos para procesos de biorremediación (Bekele *et al.*, 2022).

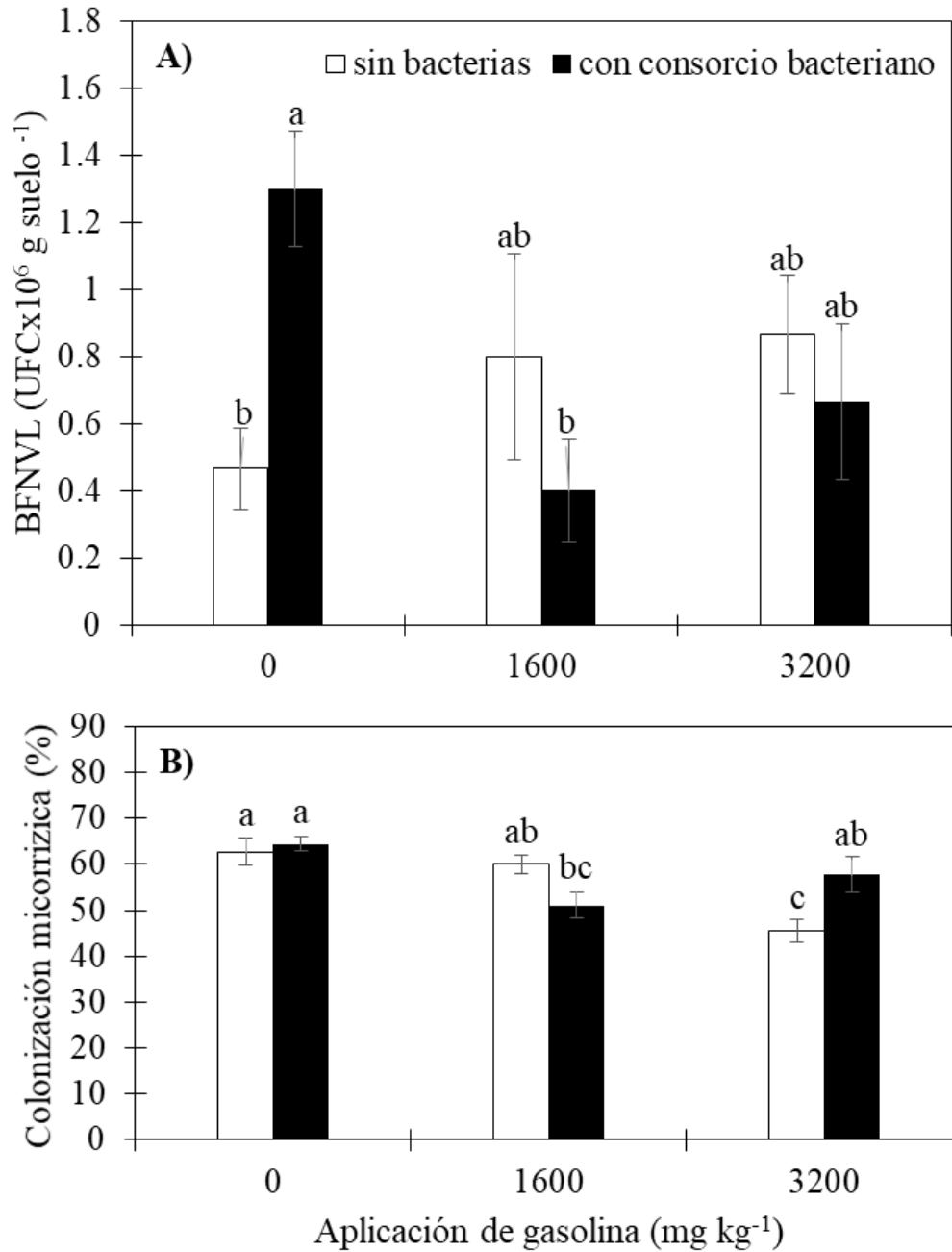


Figura 12. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) (A) y Colonización micorrizica (B) de *Helianthus annuus* crecida en suelo contaminado artificialmente con gasolina (mg kg^{-1}), después de 60 días. Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 9.

En el presente trabajo se obtuvieron valores de la población de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre que se encuentran en el rango previamente mencionado para considerarse en procesos de fitorremediación.

El crecimiento y proliferación de microorganismos en suelos contaminados por hidrocarburos esta influenciado por la disponibilidad de nutrientes y por sus propiedades hidrocarbonoclastas (Latha y Kalaivani, 2012). Contrario a los resultados obtenidos en este trabajo, Castro-Mancilla *et al.* (2013) registraron un recuento de UFC g^{-1} de 12×10^3 en presencia de lubricantes automotrices, y 45×10^3 UFC g^{-1} en medio de cultivo con diesel. Por su parte, Girigiri *et al.* (2019) cuantificaron 7.4×10^4 UFC de bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre en un suelo contaminado con petróleo crudo.

Por otra parte, Pérez Vargas *et al.* (2017) registraron aumentos de 13×10^4 a 2×10^9 UFC después de 16 meses de la bioaumentación en un suelo con derrames de petróleo (120,000 ppm), resaltando el potencial de la bioaumentación en la biorremediación de sitios contaminados por petróleo. Ante la alteración edáfica, los microorganismos del suelo son sencibles, y su estudio ayuda a determinar el impacto de los contaminantes sobre la microbiota del suelo, y determinar la posibilidad de usarlos en la biorremediación (Torri *et al.*, 2018). Otros factores se refieren a procesos de competencia (interespecifica e intraespecifica) y cooperación (con efecto sinérgico o antagónico) bacteriana que definen la supervivencia y estabilidad de las comunidades bacterianas durante la biorremediación (Kebede *et al.*, 2021). Algunos compuestos que conforman a los hidrocarburos, como en este caso de la gasolina, la componen compuestos volátiles que no se quedan en el suelo por largo tiempo, por lo que se pensaría que no tuvieran efectos tóxicos para semillas, plantas y microorganismos (Gürtler *et al.*, 2022); sin embargo, el presente trabajo muestra que la gasolina afecta el crecimiento vegetal y la proliferación de bacterias utilizadas en la bioaumentación.

Colonización micorrízica

Los HMA en los ecosistemas terrestres son omnipresentes, pero en suelos perturbados su presencia es limitada, ya que se reduce en su funcionamiento, el número de esporas y la colonización radical. En suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes, se tiene información limitada sobre la biodiversidad y tolerancia de los HMA (Lenoir *et al.*, 2016). Por esta razón, el presente estudio evaluó la colonización de HMA (Figura 12B). Se obtuvieron porcentajes de colonización micorrízica mayores de 45.5 %, correspondiendo al tratamiento 3,200 + sin inoculación, en tanto que en el tratamiento 0 + inoculación se obtuvo el porcentaje máximo (64.4 %). En general, los tratamientos expuestos al contaminante fueron estadísticamente diferentes a su respectivo control.

En contraste con los resultados obtenidos, se ha registrado el 76 % de colonización de HMA en *Laguncularia racemosa* y *Avicennia germinans* expuestas a 48,462 mg kg⁻¹ de hidrocarburos de petróleo intemperizado (Martínez-Hernández *et al.*, 2021). Trejo *et al.* (2013) registraron mayor colonización (más del 60 %) con un consorcio fúngico de HMA (*Acaulospora morrowiae*, *A. spinosa*, *A. scrobiculata*, *Funneliformis mosseae*, *F. geosporum*, *Gigaspora rosea*, *Gi. decipiens*, *Glomus macrocarpum*, *Gl. aggregatum*, *Rhizophagus intraradices*, *Scutellospora pellucida* y *Claroideogloium etunicatum*) en *Brachiaria decumbens* expuestas a biodiesel. Hernández-Ortega *et al.* (2021) registraron 41.8 % de colonización por un consorcio de HMA (*Glomus claroideum*, *G. diaphanum* y *G. albidum*) en *Melilotus albus* crecidas en presencia de diésel (7,500 mg kg⁻¹). Mientras que Ren *et al.* (2017) no hubo diferencias significativas en la colonización por *G. mosseae* en *Sesbania cannabina* crecida en suelo contaminado con fenantreno (200 mg kg⁻¹) y pireno (200 mg kg⁻¹). Gao *et al.* (2011) reportaron porcentajes de colonización por *Glomus mosseae* (60.5 %)

y con *G. etunicatum* (76.5 %), en alfalfa crecida ante fenantreno (103 mg kg⁻¹) y pireno (74 mg kg⁻¹).

La variación en los porcentajes de colonización micorrízica puede deberse a la capacidad de las especies de HMA para tolerar ciertas concentraciones de hidrocarburos y sus efectos tóxicos, por su compatibilidad con la planta hospedera y su microbiota rizosférica, y por condiciones ambientales y por la integración fisiológica entre simbioses (Rajtor y Piotrowska-Seget, 2016).

Los HMA modifican la exudación de la raíz e inducen la liberación de enzimas oxidorreductasas que están directamente relacionadas con la degradación oxidativa de los hidrocarburos, además ayudan a la atenuación del estrés oxidativo en las plantas, y pueden aumentar el volumen del sistema radical para favorecer mayor la absorción de agua y nutrientes, y contribuir en la estabilización de hidrocarburos en su micelio (Begum *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2020; Kuila y Ghosh, 2022; Patel *et al.*, 2022; Qian *et al.*, 2022). Por lo anterior, los HMA tienen efectos positivos en la estabilización de la planta en ambientes contaminadas, y mayor posibilidad de desintoxicar suelos contaminados con hidrocarburos (Shukla *et al.*, 2019).

Disminución de la gasolina

Las plantas desempeñan un factor importante en la biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos, y las raíces contribuyen en la disipación de contaminantes orgánicos para reducir su biodisponibilidad mediante la estimulación de la actividad microbiana en la rizosfera, además de mejorar las condiciones físicas y químicas del suelo (Liu *et al.*, 2004).

En la Figura 13A se muestra el porcentaje de gasolina que se encuentra en el suelo de acuerdo al nivel de contaminación, en los tratamientos inoculados se encontró menor porcentaje de gasolina. En general, el porcentaje de gasolina estimada en el suelo de las plantas inoculadas fue

estadísticamente diferente al suelo contaminado sin la inoculación bacteriana. La planta de girasol fue esencial para llevar a cabo la remoción de la gasolina en el suelo, pero de acuerdo con el análisis estadístico, la inoculación bacteriana aumentó la remoción de la gasolina en el suelo, de acuerdo con su nivel de contaminación (Figura 13B).

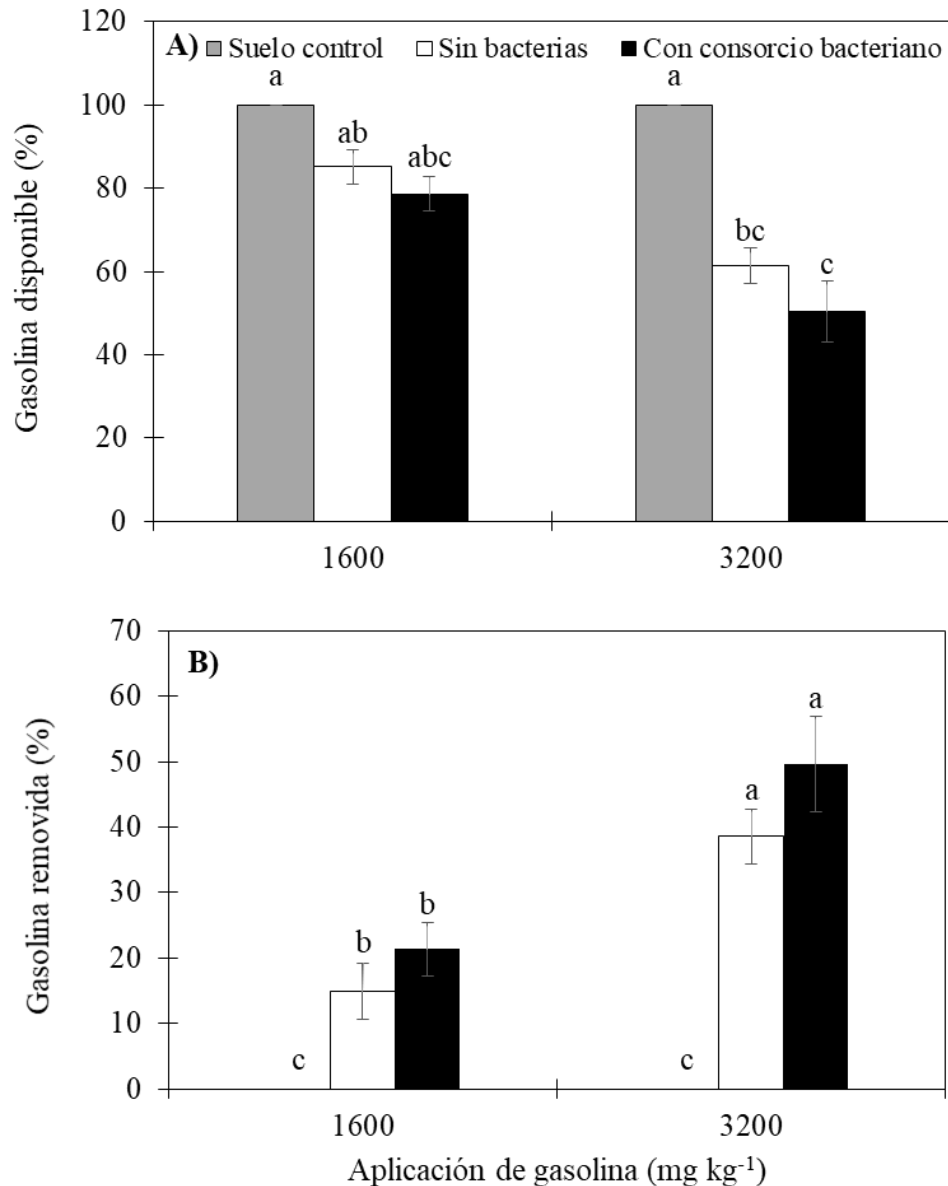


Figura 13. Efecto de *Helianthus annuus* sobre un suelo contaminado artificialmente con gasolina, Contenido de gasolina disponible (A) y Porcentaje de gasolina removida con base a un suelo control sin ningún tratamiento de biorremediación (B). Barras con letras idénticas en la misma gráfica no son estadísticamente diferentes (LSD, $\alpha \leq 0.05$). Media \pm error estándar, n = 3.

Estos resultados fueron similares con los reportados por Wei *et al.* (2019), donde las plantas *Lolium perenne*, *Festuca ovina*, *Agropyron cristatum*, *Medicago sativa*, *Astragalus adsurgens* y *Caragana korshinskii*, promovieron la degradación de hidrocarburos de petróleo en el suelo en comparación con el suelo sin planta. Nero (2020) evaluó la capacidad de *Jatropha curcas* para fitorremediar suelos contaminados con hidrocarburos, obteniendo disminuciones del 46.7 % y del 46.4 % en grasa total y de hidrocarburos totales de petróleo, respectivamente.

Fatima *et al.* (2018) registraron que la concentración de petróleo crudo disminuyó hasta 85 % por la presencia de *Leptochloa fusca* y *Brachiaria mutica*, inoculadas con microorganismos endófitos. A su vez, Shen *et al.* (2016) reportaron que la eficiencia de eliminación de petróleo crudo por *Raphanus sativus* y *Triticum acstivnm* aumentó hasta 64 % por la inoculación de microorganismos.

La relación íntima que se establece entre planta-microorganismo mejora la degradación de los hidrocarburos en el suelo, aumenta la tolerancia de las plantas hacia los contaminantes, induce la liberación de enzimas y metabolitos que permiten la degradación de los contaminantes, y que al mismo tiempo estimulan el crecimiento de la microbiota rizosférica con capacidad degradadora de contaminantes orgánicos (Petrová *et al.*, 2017; Hou *et al.*, 2019). Los microorganismos nativos autóctonos cumplen un papel importante en la degradación de los contaminantes orgánicos, y son la base biológica para eliminar los hidrocarburos de petróleo del suelo (Guarino *et al.*, 2017).

VI. CONCLUSIONES

El girasol mostró tolerancia y adaptación a la presencia de bajas concentraciones (200–1,600 mg kg⁻¹) de gasolina en el suelo. Sin embargo, las variables de crecimiento del girasol, fueron afectadas cuando las concentraciones de gasolina en el suelo fueron de 2,400 y 3,200 mg kg⁻¹.

La cuantificación de unidades formadoras de colonias permitió observar el efecto de la exposición del contaminante sobre las poblaciones bacterianas del suelo. La mayor población de bacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico de vida libre se cuantificó en el suelo control, seguida del suelo con mayor contaminación con gasolina (3,200 mg kg⁻¹).

Las bacterias nativas seleccionadas mostraron capacidad promotora del crecimiento vegetal, y sus antecedentes bibliográficos denotan potencial en la aplicación en sistemas de biorremediación. De acuerdo con las secuencias del gen 16S rRNA, las 10 cepas bacterianas seleccionadas a partir del suelo contaminado artificialmente, mostraron de 99-100 % de similitud con secuencias registradas en la base de datos del GenBank. Las 10 cepas promotoras de crecimiento vegetal pertenecieron a seis especies: *Bacillus* sp., *Priestia megaterium*, *Massilia timonae*, *Streptomyces flavotricini*, *Pseudomonas palleroniana* y *Sphingobium yanoikuyae*.

Por último, el girasol tuvo un papel esencial para disminuir la presencia del derivado de hidrocarburo de petróleo (gasolina). La bioaumentación no fue relevante en la producción de biomasa en las plantas del girasol; sin embargo, la inoculación bacteriana tuvo un efecto notable para disipar la gasolina en el proceso de fitorremediación. El girasol inoculado con bacterias nativas puede ser una alternativa efectiva para reducir la gasolina en el suelo contaminado.

VII. LITERATURA CITADA

- Abd_Allah, E. F., Hashem, A., Alqarawi, A. A., y Alwathnani Hend, A. (2015). Alleviation of adverse impact of cadmium stress in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by arbuscular mycorrhizal fungi. *Pak. J. Bot.*, 47(2), 785-95.
- Abdul-Ameer Ali, W. (2019). Biodegradation and phytotoxicity of crude oil hydrocarbons in an agricultural soil. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 79(2). 266-277. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-58392019000200266>
- Adejube, A. A. H., Anteyi, A., Garba, F. H., Oyekunle, O. A., y Kudaisi, F. O. (2017). Bioremediating activity of sunflower (*Helianthus annuus* L.) on contaminated soil from challawa industrial area, Kano-State Nigeria. *International Journal of Agriculture and Earth Science*, 3(5), 1-11.
- Adipah, S. (2019). Introduction of petroleum hydrocarbons contaminants and its human effects. *Journal of Environmental Science and Public Health*, 3(1), 1-9. doi: 10.26502/jesph.96120043
- Ahemad, M., y Kibret, M. (2014). Mechanisms and applications of plant growth promoting rhizobacteria: current perspective. *Journal of King Saud University – Science*, 26(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2013.05.001>
- Ahmad, M., Pataczek, L., Hilger, T. H., Zahir, Z. A., Hussain, A., Rasche, F., Schafleitner, R., y Solberg, S. Ø. (2018). Perspectives of microbial inoculation for sustainable development and environmental management. *Frontiers in Microbiology*: 9. 2992. doi: 10.3389/fmicb.2018.02992
- Ahmad, A. A., Muhammad, I., Shah, T., Kalwar, Q., Zhang, J., Liang, Z., Mei, D., Juanshan, Z., Yan, P., Zhi, D. X., y Rui-Jun, L. (2020). Remediation methods of crude oil contaminated soil. *World Journal of Agriculture and Soil Science*, 4(3), 8. DOI: 10.33552/WJASS.2020.04.000595
- Ahmed, H. G. M.-D., Rizwan M.; Naeem, M., Khan, M. A., Baloch, F. S., Sun, S., y Chung, G. (2022). Molecular characterization and validation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) hybrids through SSR markers. *Plos One*, 17(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0267383>
- Ajona, M., y Vasanthi, P. (2021). Bio-remediation of crude oil contaminated soil using recombinant native microbial strain. *Environmental technology and Innovation*, 23, 101635. doi:10.1016/j.eti.2021.101635
- Alarcón, A., Davies, F. T., Autenrieth, R. L., y Zuberer, D. A. (2008). Arbuscular mycorrhiza and petroleum-degrading microorganisms enhance phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *International Journal of Phytoremediation*, 10(4), 251–263. doi:10.1080/15226510802096002

- Al-Hawash, A. B., Dragh, M. A., Li, S., Alhujaily, A., Abbood, H. A., Zhang, X. y Ma, F. (2018). Principles of microbial degradation of petroleum hydrocarbons in the environment. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44(2), 71–76. <https://doi.org/10.1016/j.ejar.2018.06.001>
- Alarcón, A., García-Díaz, M., Hernández-Cuevas, L. V., Esquivel-Cote, R., Ferrera-Cerrato, R., Almaraz-Suarez, J. J., Ferrera- Rodríguez, O. (2019). Impact of crude oil on functional groups of culturable bacteria and colonization of symbiotic microorganisms in the *Clitoria-Brachiaria* rhizosphere grown in mesocosms. *Acta Biológica Colombiana*, 24(2). 343-353. <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v24n2.64771>
- Alaboudi, K. A., Ahmed, B., y Brodie, G. (2018). Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2018.05.007>
- Alegbeleye, O. O., Opeolu, B. O., y Jackson, V. (2017). Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) compounds: (acenaphthene and fluorene) in water using indigenous bacterial species isolated from the Diep and Plankenburg rivers, Western Cape, South Africa. *Brazilian Journal of Microbiology*, 48(2), 314-325. [doi:10.1016/j.bjm.2016.07.027](https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.07.027)
- Ali, N., Dashti, N., Salamah, S., Al-Awadhi, H., Sorkhoh N., y Radwan, S. (2016). Autochthonous bioaugmentation with environmental samples rich in hydrocarbonoclastic bacteria for bench-scale bioremediation of oily seawater and desert soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 23. 8686–8698. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6057-y>
- Alrumman, S. A., Standing, D. B., y Paton, G. I. (2015). Effects of hydrocarbon contamination on soil microbial community and enzyme activity. *Journal of King Saud University-science*, 27(1), 31-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jksus.2014.10.001>
- Alaboudi, K. A., Ahmed, B., y Brodie, G. (2018). Phytoremediation of Pb and Cd contaminated soils by using sunflower (*Helianthus annuus*) plant. *Annals of Agricultural Sciences*, 63(1), 123-127. <https://doi.org/10.1016/j.aosas.2018.05.007>
- Al-Jobori, K. M., y Kadhim, A. K. (2019). Evaluation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) for phytoremediation of lead contaminated soil. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 11(3), 847-854.
- Ali, N., Dashti, N., Khanafer, M., Al-Awadhi, H., y Radwan, S. (2020). Bioremediation of soils saturated with spilled crude oil. *Scientific Reports*, 10(1116). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57224-x>
- Ali, W. A., Farid, W. A., y Al-Salman, A. N. K. (2020). Bioremediation of agricultural soil contaminated by a crude oil spill. *Applied Ecology and Environmental Research*, 18(1), 237-252. http://dx.doi.org/10.15666/aeer/1801_237252
- AlKaabi, N., Mohammad, A., Al-Ghouthi, S.J., y Zouari, N. (2020). Potential for native hydrocarbon-degrading bacteria to remediate highly weathered oil-polluted soils in Qatar

- through self-purification and bioaugmentation in biopiles. *Biotechnology Reports*, 28:e00543. doi.org/10.1016/j.btre.2020.e00543
- Almaraz-Suarez, J. J., Pineda-Mendoza, D. Y., y Heredia-Acuña, C. (2020). Métodos prácticos para el estudio de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. En: *Microbiología Aplicada a la Agricultura y Agroecosistemas Principios y técnicas para su investigación*. (Eds. Ferrera Cerrato, R., J., Delgadillo, M. J., Alarcón, A., Pérez Moreno, J., y Almaraz Suarez, J. J.) (pp. 227-240). Primera edición. Editorial del Colegio de Postgraduados.
- Alka, S., Shahir, S., Ibrahim, N., Vo, D. V. N., y Abd Manan, F. (2022). Assessment of plant growth promotion properties and impact of *Microbacterium foliorum* for arsenic removal in *Melastoma malabathricum*. *Bioremediation Journal*, 1-12. <https://doi.org/10.1080/10889868.2022.2048629>
- Alotaibi, F., St-Arnaud, M., y Hijri, M. (2022). In-depth characterization of plant growth promotion potentials of selected alkanes-degrading plant growth-promoting bacterial isolates. *Frontiers in Microbiology*, 13:863702. doi: 10.3389/fmicb.2022.863702
- Ambaye, T. G., Chebbi, A., Formicola, F., Prasad, S., Gomez, F. H., Franzetti, A., y Vaccari, M. (2022). Remediation of soil polluted with petroleum hydrocarbons and its reuse for agriculture: Recent progress, challenges, and perspectives. *Chemosphere*, 293. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.133572>
- Aniefiok, E. I., y Udo, J. I. (2019). Role of plants and microbes in bioremediation of petroleum hydrocarbons contaminated soils. *International Journal of Environmental Bioremediation and Biodegradation*, 7(1), 1-19. DOI:10.12691/ijebb-7-1-1
- Arrieta Ramírez, O. M., Rivera Rivera, A. P., Arias Marin, L., Rojano, B. A., Ruiz, O., y Cardona Gallo, S. A. (2012). Biorremediación de un suelo con diesel mediante el uso de microorganismos autóctonos. *Gestión y Ambiente*, 15(1), 27-39.
- Arias-Trinidad, A., Rivera-Cruz, M. A., Roldán-Garrigós, A., Aceves-Navarro, L. A., Quintero-Lizaola, R., y Hernández-Guzmán, J. (2017). Uso de *Leersia hexandra* (Poaceae) en la fitorremediación de suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *Biología Tropical*, 65(1), 21-30.
- Arias-Trinidad, A., Rivera-Cruz, M. del 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>
- Arroyo, S., Rosano-Ortega, G., Martínez-Gallegos, S., Perez-Armendariz, B., y Vega-Lebrún, C. A. (2021). Reduction of hydrocarbons in contaminated soil through paired sorption and advanced oxidation processes. *Soil Security*, 4: 100013. <https://doi.org/10.1016/j.soisec.2021.100013>
- Arenas-Julio, Y. R., Escalante-Estrada, J. A. S., Ortiz-Solorio, C. A., Volke-Haller, V. H., Rodríguez-González, M. T., y Aguilar-Carpio, C. (2021). Producción de girasol en función

- del tipo de suelo, nitrógeno y densidad de población. *Acta Agrícola y Pecuaria*, 7, 1-11. <https://doi.org/10.30973/aap/2021.7.0071008>
- Azeez, N. A., Dash, S. S., Gummadi, S. N., y Deepa, V. S. (2021). Nano-remediation of toxic heavy metal contamination: Hexavalent chromium [Cr(VI)]. *Chemosphere*, 266. doi:10.1016/j.chemosphere.2020.129204
- Barrios-San Martín, Y., Acosta, S., Sánchez, A., Toledo, A., González, F., y García, R. M. (2012). Study and isolation of aerobic hydrocarbon-degrading bacteria from Cuban shorelines. *Bioteología Aplicada*, 29(2), 80-86.
- Balderas-León, I., Dasgupta-Schubert, N., y Sánchez-Yáñez, J. M. (2015). Phytoremediation of soil contaminated with 35,000 ppm of waste motor oil. *Ingeniería Agrícola y Biosistemas*, 7(2), 75-87. doi: 10.5154/r.inagbi.2015.10.007
- Barrientos Llanos, H., del Castillo Gutiérrez, C. R., y García Cárdenas, M. (2015). Análisis de crecimiento funcional, acumulación de biomasa y translocación de materia seca de ocho hortalizas cultivadas en invernadero. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos naturales*, 2(1), 76-86.
- Baoune, H., Aparicio, J. D., Pucci, G., Ould El Hadj-Khelil, A., y Polti, M. A. (2019). Bioremediation of petroleum-contaminated soils using *Streptomyces* sp. Hlh1. *Journal of Soils and Sediments*, 9, 2222–2230. doi:10.1007/s11368-019-02259-w
- Baranu, B. S., y Lawrence, E. (2022). Nitrogen bacteria associated with bioremediation soil and their ability to degrade hydrocarbon. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 11(2), 306-314. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2022.1102.035>
- Badillo, J. (05 de mayo de 2017). *El Triángulo Rojo, mina de 'oro negro' de huachicoleros*. MILENIO. <https://www.milenio.com/estados/triangulo-rojo-mina-oro-negro-huachicoleros>
- Begum, N., Qin, C., Ahanger, M. A., Raza, S., Khan, M. I., Ashraf, M., Ahmed, N., y Zhang, L. (2019). Role of arbuscular mycorrhizal fungi in plant growth regulation: implications in abiotic stress tolerance. *Frontiers in Plant Science*, 10:1068. doi: 10.3389/fpls.2019.01068
- Bekele, G. K., Gebrie, S. A., Mekonen, E., Fida, T. T., Woldesemayat, A. A., Abda, E. M., Abda, E. M., Tafesse, M., y Assefa, F. (2022). Isolation and characterization of diesel-degrading bacteria from hydrocarbon-contaminated sites, flower farms, and soda lakes. *International Journal of Microbiology*, 2022, 12. <https://doi.org/10.1155/2022/5655767>
- Bhatawadekar, V. C., Samir R. Damare, S. R., y Garg, A. (2021). Biodegradation of mixed polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* sp. isolated from estuarine sediment. *Bioremediation Journal*, 1-10. <https://doi.org/10.1080/10889868.2021.1993779>
- Bhanse, P., Kumara, M., Singh, L., Awasthi, M. K., y Qureshiab, A. (2022). Role of plant growth-promoting rhizobacteria in boosting the phytoremediation of stressed soils: opportunities, challenges, and prospects. *Chemosphere*, 303. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.134954>

- Brick, J. M., Bostock, R. M., y Silverstone, S. E. (1991). Rapid in situ assay for indoleacetic acid production by bacteria immobilized on a nitrocellulose membrane. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(2), 535-538. <https://doi.org/10.1128/aem.57.2.535-538.1991>
- Buendía Ríos, H., Cruz Reyes, F., Meza Arquiniño, C., y Arévalo Zumaeta, J. (2014). Fitorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos de petróleo. *Ciencias Sociales*, 1(1), 113-121.
- Bykova, M. V., Alekseenko, A. V., Pashkevich, M. A., y Drebenstedt, C. (2021). Thermal desorption treatment of petroleum hydrocarbon-contaminated soils of tundra, taiga, and forest steppe landscapes. *Environ Geochem Health*, 43(6), 2331-2346. <https://doi.org/10.1007/s10653-020-00802-0>
- Cai, Z., Zhou, Q., Peng, S., y Li, K. (2010). Promoted biodegradation and microbiological effects of petroleum hydrocarbons by *Impatiens balsamina* L. with strong endurance. *Journal of Hazardous Materials*, 183(1-3), 731-737. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.07.087
- Cai, P., Ning, Z., Liu, Y., He, Z., Shi, J., y Niu, M. (2020). Diagnosing bioremediation of crude oil-contaminated soil and related geochemical processes at the field scale through microbial community and functional genes. *Annals of Microbiology*, 70(36), 1-15. doi:10.1186/s13213-020-01580-x
- Camargo Rodriguez, I. D., y Rodríguez López, N. (2006). Nuevas perspectivas para el estudio de la asignación de biomasa y su relación con el funcionamiento de plantas en ecosistemas neotropicales. *Acta biológica Colombiana*, 11, 75-87.
- Carter, J. F., y Heiser, C. B. (1978). Taxonomy of *Helianthus* and origin of domesticated sunflower. *Sunflower Science and Technology*, 19, 31-53. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr19.c2>
- Casierra-Posada, F., Peña Z., G. R., y Peña-Olmos, J. E. (2008). Estimación indirecta del área foliar en *Fragaria vesca* L., *Physalis peruviana* L., *Acca sellowiana* (Berg.) Burret, *Rubus glaucus* L., *Passiflora mollissima* (Kunth) L. H. Bailey y *Ficus carica* L. *Revista U.D.C.A Actualidad and Divulgación Científica*, 11(1), 95-102.
- Casierra-Posada, F. y Cárdenas-Hernández, J. (2009). Crecimiento de plántulas de maíz (*Zea mays* L. var. Porva) en solución nutritiva con baja relación (Ca+Mg+K)/Al. *Revista U.D.C.A Actualidad and Divulgación Científica*, 12(2), 91-100.
- Castro-Mancilla, Y. V., Castro-Meza, B. I., de la Garza-Requena, F. R., Rivera-Ortiz, P., Heyer-Rodríguez, L., y Ortiz-Carrizales, Y. P. (2013). Variación de las poblaciones microbianas del suelo por la adición de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 31(3), 221-230.
- Caroca, R., Zapata, N., y Vargas, M. (2016). Efecto de la temperatura sobre la germinación de cuatro genotipos de maní (*Arachis hypogaea* L.). *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences* 32(2), 94-101. <https://dx.doi.org/10.4067/S0719-38902016000200002>

- Castro-Mancilla, Y. V., de la Rosa-Manzano, E., Castro Nava, S., y Martínez-Avalos, J. G. (2019). Physiological responses of *Quercusoleoides* (Schltdl & Cham) to soils contaminated by diesel. *Plant Production Science*, 22(4), 519-529. DOI:10.1080/1343943X.2019.1605833
- Castillo Rogel, R. T., More Calero, F. J., Cornejo La Torre, M, Fernández Ponce, J. N., y Mialhe Matonnier, E. L. (2020). Aislamiento de bacterias con potencial biorremediador y análisis de comunidades bacterianas de zona impactada por derrame de petróleo en Condorcanqui - Amazonas - Perú. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 22(3), 215-225. <https://dx.doi.org/10.18271/ria.2020.656>
- Chan-Quijano, J. G., Jarquín-Sánchez, A., Ochoa-Gaona, S., Martínez-Zurimendi, P., López-Jiménez, L. N., y Lázaro-Vázquez, A. (2015). Directrices para la remediación de suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*, (17). 123-144.
- Chauhan, S., Das, M., Nigam, H., Pandey, P., Swati, P., Tiwari, A., y Yadav, M. (2015). Implementation of phytoremediation to remediate heavy metals from tannery waste: a review. *Advances in Applied Science Research*, 6(3), 119-128.
- Chan-Quijano, J. G., Torres-López, K. L., Martínez-Rabelo, F., y González-Conzuelo, M. B. (2020). Soil contamination by petroleum in Tabasco, Mexico, and its environmental repercussions. *Gaia Scientia* 14(3), 75-91. DOI:10.22478/ufpb.1981-1268.2020v14n3.54490
- Chauhan, P., y Mathur, J. (2020). Phytoremediation efficiency of *Helianthus annuus* L. for reclamation of heavy metals-contaminated industrial soil. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 29954-29966. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-09233-x>
- Chandra, D., y Sharma, A. K. (2021). Field evaluation of consortium of bacterial inoculants producing ACC deaminase on growth, nutrients and yield components of rice and wheat. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 24, 293-305. <https://doi.org/10.1007/s12892-020-00077-y>
- Cheng, W. J., Xu, Y. J., Huang, G. M., Rahman, M. M., Xiao, Z. Y., y Wu, Q. S. (2020). Effects of five mycorrhizal fungi on biomass and leaf physiological activities of walnut. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj- napoca*, 48(4), 2021–2031. <https://doi.org/10.15835/nbha48412144>
- Chibuike, G. U. (2013). Use of mycorrhiza in soil remediation: a review. *Scientific Research and Essays*, 8(35), 679–1687. doi:10.5897/sre2013.5605
- Clark, F. E. (1965). Agar-plate method for total microbial count. *Methods of Soil Analysis: part 2 Chemical and Microbiological Properties*, 9, 1460-1466.
- Cocârță, D. M., Stoian, M. A., y Karademir, A. (2017). Crude oil contaminated sites: evaluation by using risk assessment approach. *Sustainability* 9, 1365. doi:10.3390/su9081365
- Cruz-Hernández, M. A., Reyes-Peralta, J., Mendoza-Herrera, A., Rivera, G., y Bocanegra-García, V. (2021). Characterization of a *Microbacterium* sp. strain isolated from soils contaminated

- with hydrocarbons in the burgos basin, Mexico. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 37, 227–235. <https://doi.org/10.20937/RICA.53837>
- Cubillos, J., Pulgarín, P., Gutiérrez, J., y Paredes, D. (2014). Fitorremediación en aguas y suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo. *Ingeniería y Competitividad*, 16 (1), 131–146.
- Das, N., y Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology Research International*, 2011, 1-13. doi:10.4061/2011/941810
- Daryabeigi Zand, A., y Hoveidi, H. (2016). Feasibility of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) plantation in low to moderately contaminated brownfields to achieve remediation objectives. *Journal of Applied Biotechnology Reports*, 3(3), 457-463.
- Daryabeigi Zand, A., y Hoveidi, H. (2018). Evaluation of the potential of Burningbush (*Kochia scoparia* (L.) Schard) and maize (*Zea mays* L.) and the role of soil organic amendment in phytoremediation of gasoline-contaminated soils. *International Journal of Environmental Research*, 12(3), 327–336. doi:10.1007/s41742-018-0083-1
- Dahmani, M. A., Desrut, A., Moumen, B., Verdon, J., Mermouri, L., Kacem, M., Coutos-Thévenot, P., Kaid-Harche, M., Bergès, T., y Vriet, C. (2020). Unearthing the plant growth-promoting traits of *Bacillus megaterium* RmBm31, an endophytic bacterium isolated from root nodules of *Retama monosperma*. *Frontiers in Plant Science*, 11(124). doi: 10.3389/fpls.2020.00124
- de Lorenzo, V. (2019). Biodegradation and Bioremediation: An Introduction. In: Consequences of microbial interactions with hydrocarbons, oils, and lipids: biodegradation and bioremediation. (Ed. Steffan, R. J.), pp. 1-20. Springer Nature.
- Devi, P., y Kumar, P. (2020). Effect of bioremediation on internodal length and leaf area of maize plant cultivated in contaminated soil with chromium metal. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 9(4), 1408-1413.
- Deng, J., Jia, M., Zeng, Y. Q., Li, W., He, J. T., Ren, J., Bai, J., Zhang, L., Li, J. y Yang, S. (2022). Enhanced treatment of organic matter in slaughter wastewater through live *Bacillus velezensis* strain using nano zinc oxide microsphere. *Environmental Pollution*, 292:118306. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118306>
- Delgadillo-López, A. E., González-Ramírez, C. A., Prieto-García, F., Villagómez-Ibarra, J., R., y Acevedo-Sandoval, O. (2011). Fitorremediación: una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 14, 597- 612.
- Dembicki, Jr., H. (2017). Introduction. In: Practical petroleum geochemistry for exploration and production, (Ed. Dembicki, H.), pp. 1–17. Second edition. Elsevier.
- de Almeida, M. V., Rissato, S. R., Galhiane, M. S., Fernandes, J. R., Lodi, P. C. y de Campos, M. C. (2018). In vitro phytoremediation of persistent organic pollutants by *Helianthus annuus* l. plants. *Química Nova*, 41 (3), 251-257. <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170177>

- Dighton, J. (2009). Mycorrhizae. In: Encyclopedia of microbiology, (Ed. Schaechter, M.), pp. 153–162. Third edition. Elsevier.
- Di Barbaro, G., Andrada, H., González Basso, V., Alurralde, A. L., Del Valle, E. y Brandán de Weht, C. (2017). Micorrizas arbusculares y hongos septados oscuros nativos en topinambur (*Helianthus tuberosus* L.) en Catamarca, Argentina. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 34(2), 98-106. <http://dx.doi.org/10.22267/rcia.173402.75>
- Doyle J.J., Doyle J.L., Doyle J.A. y Doyle, J.K. (1990). A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue. *Focus* 12, 13-15.
- Dong, X., Chang, Y., Zheng, R., Wang, X., Yan, X., y Ma, X. F. (2021). Phytoremediation of cadmium contaminated soil: impacts on morphological traits, proline content and stomata parameters of sweet Sorghum seedlings. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 106, 528-535. <https://doi.org/10.1007/s00128-021-03125-7>
- Egerton-Warburton, L. M., Querejeta, J. I., Allen, M. F., y Finkelman, S. L. (2005). Mycorrhizal fungi. *Encyclopedia of Soils in the Environment*, 533-542. doi:10.1016/b0-12-348530-4/00455-0
- Ehis-Eriakha, C. B., Chikere, C. B., y Akaranta, O. (2020). Functional gene diversity of selected indigenous hydrocarbon-degrading bacteria in aged crude oil. *International Journal of Microbiology*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/2141209>
- Elarabi, N. I., Abdelhadi, A. A., Ahmed, R. H., Saleh, I., Arif, I. A., Osman, G., y Ahmed, D. S. (2020). *Bacillus aryabhatai* FACU: A promising bacterial strain capable of manipulate the glyphosate herbicide residues. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 27(9), 2207-2214. doi:10.1016/j.sjbs.2020.06.050
- Elenga-Wilson, P. S., Aimé Kayath, C., Saturnin Mokemiabeka, N., Eckzechel Nzaou, S. A., Nguimbi, E., y Ahombo, G. (2021). Profiling of indigenous biosurfactant-producing *bacillus* isolates in the bioremediation of soil contaminated by petroleum products and olive oil. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1-15. <https://doi.org/10.1155/2021/9565930>
- Escalante-Estrada, J. A. S., Rodríguez-González, M. T., y Escalante-Estrada, Y. I. (2015). Fenología, biomasa y rendimiento de cultivares de girasol en Valles Altos. *Revista mexicana de Ciencias Agrícolas*, 2, 307-311.
- Ergozhin, Y., Dzhusipbekov, U., Teltayev, B., Nurgalieva, G., Shakirova, A., Khudaibergenova, K., Izmailova, G., y Yelshibayev, N. (2020). Crude oil contaminated soil: its neutralization and use. *Sustainability*, 12(8). doi:10.3390/su12083087
- Fatima, K., Imran, A., Amin, I., Khan, Q. M., y Afzal, M. (2018). Successful phytoremediation of crude-oil contaminated soil at an oil exploration and production company by plants-bacterial synergism. *International Journal of Phytoremediation*, 20(7), 675–681. doi:10.1080/15226514.2017.1413331

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), (2019). La contaminación del suelo: una realidad oculta. Roma.
- Fasusi, O. A., Amoo, A. E., y Babalola, O. O. (2021). Characterization of plant growth-promoting rhizobacterial isolates associated with food plants in South Africa. *Antonie van Leeuwenhoek*, 114(10), 1683–1708. <https://doi.org/10.1007/s10482-021-01633-4>
- Fall, A. F., Nakabonge. G., Ssekandi, J., Founoune-Mbou, H., Apori, S. O., Ndiaye, A., Badji, A., y Ngom, K. (2022). Roles of arbuscular mycorrhizal fungi on soil fertility: contribution in the improvement of physical, chemical, and biological properties of the soil. *Frontiers in Fungal Biology*, 3:3. doi: 10.3389/ffunb.2022.723892
- Feng, Z., Liu, X., Zhu, H., y Yao, Q. (2020). Responses of arbuscular mycorrhizal symbiosis to abiotic stress: a lipid-centric perspective. *Frontiers in Plant Science*, 11:578919. doi: 10.3389/fpls.2020.578919
- Fernández-Luqueño, F., López-Valdez, F., Miranda-Arámbula, M., Rosas-Morales, M., Pariona, N., y Espinoza-Zapata, R. (2014). An introduction to the sunflower crop. In: Sunflowers growth and development, environmental influences and pests/diseases, (Ed. Arribas, J. I.), pp. 1-18. NOVA.
- Ferrera-Cerrato, R., Alarcón, A., Delgadillo-Martínez, J., Almaraz-Suárez, J. J., y Pérez-Moreno, J. (2016). Los microorganismos rizosféricos y su impacto en la nutrición vegetal. En: Nutrición de cultivos (Eds. Alcantar González, G., Trejo-Téllez, L., y Gómez-Merino, F. C.), pp. 423- 443. Colegio de Postgraduados.
- Foght, J. M., Gieg, L. M., y Siddique, T. (2017). The microbiology of oil sands tailings: past, present, future. *FEMS Microbiology Ecology*, 93(5), 1-22. doi: 10.1093/femsec/fix034
- Gaspar, M., Cabello, M., Cazau, M., y Pollero, R. (2002). Effect of phenanthrene and *Rhodotorula glutinis* on arbuscular mycorrhizal fungus colonization of maize roots. *Mycorrhiza*, 12(2), 55–59. doi:10.1007/s00572-001-0147-4
- García-López, E., Zavala-Cruz, J., y Palma-López, D. J. (2006). Caracterización de las comunidades vegetales en un área afectada por derrames de hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 24(1). 17-26.
- Garg, N., y Chandel, S. (2010). Arbuscular mycorrhizal networks: process and functions. In: Sustainable agronomy, (Eds. Lichtfouse, E., Hamelin, M., Navarrete, M., Debaeke, P.), pp. 581–599. Springer Dordrecht.
- Gao, Y., Li, Q., Ling, W., y Zhu, X. (2011). Arbuscular mycorrhizal phytoremediation of soils contaminated with phenanthrene and pyrene. *Journal of Hazardous Materials*, 185(2-3), 703-709. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.09.076
- García, E., Ferrera, R., Almaráz, J. J., Rodríguez, R., y García, E. (2013). Biodegradación de queroseno en la rizósfera de gramíneas en condiciones de invernadero. *Agronomía Costarricense*, 37(2), 125-134.

- Garzón, J. M., Rodríguez-Miranda, J. P., y Hernández-Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 19(2), 309-318. <http://dx.doi.org/10.22267/rus.171902.93>
- García Ávila, C., Villada Sierra, L. A., y Gómez, J. R. (2018). Evaluación de la adaptación de *Helianthus annuus* en asocio con hongos micorrizicos en suelos contaminados con plomo. *Cuaderno Activa*, 10(1), 93-111. <https://doi.org/10.53995/20278101.497>
- García Castro, K. D., Romo-Campos, R. de L., Pereira, C. J., y Gómez-Rubio, R. (2018). Tasa relativa de crecimiento en plántulas de dos poblaciones de *Magnolia pugana* (Magnoliaceae) en distintos niveles de luz y fertilidad del suelo. *Revista de Biología Tropical*, 66(2), 622-633. <https://dx.doi.org/10.15517/rbt.v66i2.33394>
- Garcés-Ruiz, M., Calonne-Salmon, M., Bremhorst, V., y Declerck, S. (2021). Diesel fuel differentially affects hyphal healing in *Gigaspora* sp. and *Rhizophagus irregularis*. *Mycorrhiza*, 31, 413–421. <https://doi.org/10.1007/s00572-021-01026-5>
- Genre, A., Lanfranco, L., Perotto, S., y Bonfante, P. (2020). Unique and common traits in mycorrhizal symbioses. *Nature Reviews Microbiology*, 18, 649-660. doi:10.1038/s41579-020-0402-3
- Girigiri, B., Ariole, C. N., y Stanley, H. O. (2019). Bioremediation of crude oil polluted soil using biofertilizer from nitrogen-fixing and phosphatesolubilizing bacteria. *Journal of American Science*, 16(7), 71-88. doi:10.7537/marsjas160720.10.
- Giovannini, L., Palla, M., Agnolucci, M., Avio, L., Sbrana, C., Turrini, A., y Giovannetti, M. (2020). Arbuscular mycorrhizal fungi and associated microbiota as plant biostimulants: research strategies for the selection of the best performing inocula. *Agronomy*, 10(1). doi:10.3390/agronomy10010106
- Gkorezis, P., Daghigho, M., Franzetti, A., Van Hamme, J. D., Sillen, W. y Vangronsveld, J. (2016). The interaction between plants and bacteria in the remediation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Frontiers in Microbiology*, 7:1836. doi:10.3389/fmicb.2016.01836
- Glick, B. R. (2012). Plant Growth-Promoting Bacteria: Mechanisms and Applications. *Scientifica*, 2012, 1–15. <https://doi.org/10.6064/2012/963401>
- Gouma, S., Fragoeiro, S., Bastos, A. C., y Magan, N. (2014). Bacterial and fungal bioremediation strategies. In: *Microbial biodegradation and bioremediation*, (Eds. Das, S.), pp. 301–323. Elsevier.
- Gong, X., y Tian, D. Q. (2019). Study on the effect mechanism of Arbuscular Mycorrhiza on the absorption of heavy metal elements in soil by plants. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 267,(5), 1-8. doi:10.1088/1755-1315/267/5/052064
- Gutiérrez-Espinoza, L. R., Melgoza-Castillo, A., Alarcón-Herrera, M. T., Ortega-Gutiérrez, J. A., Prado-Tarango, D. E. y Cedillo-Alcantar, M. E. (2011). Germinación del girasol silvestre

- (*Helianthus annuus* L.) en presencia de diferentes concentraciones de metales. *Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y algal*, 2(1), 49-56.
- Gu, H., Lou, J., Wang, H., Yang, Y., Wu, L., Wu, J., y Xu, J. (2016). Biodegradation, Biosorption of Phenanthrene and Its Trans-Membrane Transport by *Massilia* sp. WF1 and *Phanerochaete chrysosporium*. *Frontiers in Microbiology*, 7: 38. doi:10.3389/fmicb.2016.00038
- Guarino, C., Spada, V., y Sciarrillo, R. (2017). Assessment of three approaches of bioremediation (Natural Attenuation, Landfarming and Bioaugmentation–Assisted Landfarming) for a petroleum hydrocarbons contaminated soil. *Chemosphere*, 170, 10-16.
- Guevara Espinosa, Ma. D., Cruz Miranda, N., Rivera Morales, Ma. C., y Fuentes Ortiz, A. K. (2018). Phytoremediation of soils contaminated with Mn and Cu from *Ocimum basilicum*. *Revista Latinoamericana el Ambiente y las Ciencias*, 9(22), 76–89.
- Gürtler, S., Souza Filho, C. R., Sanches, I. D., Magalhães, L. A., Alves, M. N., Oliveira, W. J., y Quitério, G. C. M. (2022). Leaf spectra changes of plants grown in soils pre- and post-contaminated with petroleum hydrocarbons. *Remote Sens*, 14(14), 3475. <https://doi.org/10.3390/rs14143475>
- Geneious. (2023). *Geneious, bioinformatics software for sequence data analysis*. <https://www.geneious.com/>
- Hassan, M., Abdelhamid, M., Nassef, O. A., y Abdel Harith, M. (2018). Spectrochemical Analytical Follow up of Phytoremediation of Oil-Contaminated Soil. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal*, 27(6), 485-500. doi:10.1080/15320383.2018.1485631
- Harfoot, M. B. J., Tittensor, D. P., Knight, S., Arnell, A. P., Blyth, S., Brooks, S., Butchart, S. H. M., Hutton, J., Jones, M. I., Kapos, V., Scharlemann, J. P. W., y Burgess, N. D. (2018). Present and future biodiversity risks from fossil fuel exploitation. *Conservation Letters*, 11(4), 1-13. <https://doi.org/10.1111/conl.12448>
- Hazim, R. N., y Al-Ani, M. A. (2019). Effect of petroleum hydrocarbons contamination on soil microorganisms and biodegradation. *Rafidain Journal Science*, 28(1), 13-22.
- Hakim, S., Naqqash, T., Nawaz, M. S., Laraib, I., Siddique, M. J., Zia, R., Mirza, M. S., y Imran, A. (2021). Rhizosphere Engineering With Plant Growth-Promoting Microorganisms for Agriculture and Ecological Sustainability. *Frontiers in Sustainable Food Systems*, 5: 617157. doi: 10.3389/fsufs.2021.617157
- Hawrot-Paw, M., y Bąkowska, T. (2014). Growth and development of selected plant species in the phytoremediation of diesel oil contaminated soil. *Environment Protection Engineering*, 40(4), 5-13. DOI: 10.5277/epe140401
- Hernández A., E., Ferrera-Cerrato, R., y Rodríguez V., R. (2003). Bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno atmosférico en rizósfera de frijol contaminada con queroseno. *Terra Latinoamericana*, 21(1), 81-89.

- Hernández-Valencia, I., y Mager, D. (2003). Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de Petróleo liviano. *Bioagro*, 15(3), 149-156.
- Hernández-Acosta, E., Gutiérrez-Castorena, M. del C., Rubiños-Panta, J. E., y Alvarado-López, J. (2006). Caracterización del suelo y plantas de un sitio contaminado con hidrocarburos. *Terra Latinoamericana*, 24(4), 463-470.
- Hernández Valencia, I., Navas, G., y Infante, G. 2017. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo extra pesado con *Megathyrsus maximus*. *Revista. Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(3) 495-503. DOI: 10.20937/RICA.2017.33.03.12
- Hernández-Valencia, I., Guitián, D., y González, V. (2020). Toxicidad de suelos contaminados con petróleo pesado sobre plántulas de la palma moriche *Mauritia flexuosa* L. f. *Bioagro*, 32(2), 117-122.
- Hernández-Ortega, H. A., Ferrera-Cerrato, R., López-Delgado, H. A., Sánchez-Rangel, J. C., y Alarcón, A. (2021). Nutrient status, hydrogen peroxide content and peroxidase activity of arbuscular mycorrhizal plants of *Melilotus albus* grown in diesel-contaminated substrate. *Scientia Fungorum*, 51:e1298. <https://doi.org/10.33885/sf.2021.51.1298>
- Hou, L., Liu, R., Li, N., Dai, Y., y Yan, J. (2019). Study on the efficiency of phytoremediation of soils heavily polluted with PAHs in petroleum-contaminated sites by microorganism. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 31401-31413. doi:10.1007/s11356-019-05828-1
- Hou, J., Wang, Q., Liu, W., Zhong, D., Ge, Y., Christie, P., y Luo, Y. (2021). Soil microbial community and association network shift induced by several tall fescue cultivars during the phytoremediation of a petroleum hydrocarbon-contaminated soil. *Science of the Total Environment*, 792, 148411. doi:10.1016/j.scitotenv.2021.148411
- Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17(8), 754-755. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/17.8.754>
- Hübner, S., Sisou, D., Mandel, T., Todesco, M., Matzrafi, M., y Eizenberg, H. (2022). Wild sunflower goes viral: Citizen science and comparative genomics allow tracking the origin and establishment of invasive sunflower in the Levant. *Molecular Ecology*, 1(7), 2061-2072. <https://doi.org/10.1111/mec.16380>
- Ibrahim, M., Adrees, M., Rashid, U., Raza, S. H., y Abbas, F. (2015). Phytoremediation of radioactive contaminated soils. *Soil Remediation and Plants*. 599–627. doi:10.1016/b978-0-12-799937-1.00021-8
- Iffis, B., St-Arnaud, M., y Hijri, M. (2016). Petroleum hydrocarbon contamination, plant identity and arbuscular mycorrhizal fungal (AMF) community determine assemblages of the AMF spore-associated microbes. *Environmental Microbiology*, 18(8), 2689–2704. doi:10.1111/1462-2920.13438

- Iturbe, R., Carlos Flores, C. Castro, A., y Torres, L. G. (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 Assessment*, 133, 387–398. <https://doi.org/10.1007/s10661-006-9593-y>
- Jadia, C. D., y Fulekar, M. H. (2008). Phytoremediation: The application of vermicompost to remove zinc, cadmium, copper, nickel and lead by sunflower plant. *Environmental Engineering & Management Journal*, 7(5), 547-558.
- Jagtap, S. S., Woo, S. M., Kim, T.-S., Dhiman, S. S., Kim, D., y Lee, J.-K. (2014). Phytoremediation of diesel-contaminated soil and saccharification of the resulting biomass. *Fuel*, 116, 292–298. doi:10.1016/j.fuel.2013.08.017
- Jan, A. T., Ali, A., y Rizwanul Haq, Q. M. (2015). Phytoremediation: A Promising Strategy on the Crossroads of Remediation. In: *Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges*; (Eds. Hakeem, K., Sabir, M., Ozturk, M., Mermut, A. R.), pp. 63–84. Elsevier.
- Jabbarov, Z., Abdrakhmanov, T., Pulatov, A., Kováčik, P., y Pirmatov, K. (2019). Change in the parameters of soils contaminated by oil and oil products. *Agriculture (Poľnohospodárstvo)*, 65(3), 88-98. DOI:10.2478/agri-2019-0009
- Joner, E. y Leyval, E. (2009). Phytoremediation of organic pollutants using mycorrhizal plants: a new aspect of rhizosphere interactions. In: *Sustainable agriculture*, (Eds. Lichtfouse, E., Navarrete, M., Debaeke, P., Véronique, S., Alberola, C.), pp. 885-894. Springer Dordrecht.
- Kazemalilou, S., Delangiz, N., Lajayer, B. A., y Ghorbanpour, M. (2020). Insight into plant-bacteria-fungi interactions to improve plant performance via remediation of heavy metals: an overview. In: *Molecular aspects of plant beneficial microbes in agriculture*, (Eds. Sharma, V., Salwan, R., Al-Ani, L. K. T.), pp. 123-132. Academic Press.
- Kebede, G., Tafese, T., Abda, E. M., Kamaraj, M., y Assefa, F. (2021). Factors influencing the bacterial bioremediation of hydrocarbon contaminants in the soil: mechanisms and impacts. *Journal of Chemistry*, 2021, 1-17. <https://doi.org/10.1155/2021/9823362>
- Khan, W., M., Khan, M., S., Karim, S., Umar, N., y Ali, S. (2016). Effect of salt stress on some morphological and biochemical characteristics of sunflower (Samsung-600). *Pure and Applied Biology*, 5(3), 653-663. <http://dx.doi.org/10.19045/bspab.2016.50085>
- Klimek, B., Sitarz, A., Choczyński, M., y Niklińska, M. (2016). The effects of heavy metals and total petroleum hydrocarbons on soil bacterial activity and functional diversity in the Upper Silesia industrial region (Poland). *Water, Air, & Soil Pollution*, 227(265), 227-265. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-2966-0>
- Korade, D. L. y Fulekar, M. H. (2009). Development and evaluation of mycorrhiza for rhizosphere bioremediation. *Journal of Applied Biosciences*, 17, 922 – 929.
- Koshlaf, E., y Ball, A. S. (2017). Soil bioremediation approaches for petroleum hydrocarbon polluted environments. *AIMS Microbiology* 3(1), 25-49. DOI: 10.3934/microbiol.2017.1.25

- Kuila, D. y Ghosh, S. (2022). Aspects, problems and utilization of arbuscular mycorrhizal (AM) application as bio-fertilizer in sustainable agricultura. *Current Research in Microbial Sciences*, 3, 100107. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2022.100107>
- Kuri., M. L., y Shikha, R. (2019). Biodegradation of petroleum oil by a novel bacillus megaterium strain isolated from contaminated soil of Neemrana, Alwar, Rajasthan, India. *International Journal of Biotechnology and Bioengineering Research*, 10(1), 17-27.
- Kuppusamy, S., Maddela, N.R., Megharaj, M., y Venkateswarlu, K. (2020). Ecological Impacts of Total Petroleum Hydrocarbons. In: *Total Petroleum Hydrocarbons: Enviromental Fate, Toxicity, and Remediation*, pp. 95-138. Springer, Cham.
- Latha, R., y Kalaivani, R. (2012). Bacterial degradation of crude oil by gravimetric analysis. *Advances in Applied Science Research*, 3(5), 2789-2795.
- Lawal, I., Yusuf, I., Fardami, A.Y., Bashir, A. y Musa, A. (2021). Nitrogen fixing bacteria and their application for heavy metal removal: a mini review. *Journal of Biochemistry, Microbiology and Biotechnology*, 9(2), 43-47. <https://doi.org/10.54987/jobimb.v9i2.617>
- Lentz, D. L., Pohl, M. D., Alvarado, J. L., Tarighat, S., y Bye, R. (2008). Sunflower (*Helianthus annuus* L.) as a pre-Columbian domesticate in Mexico. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(17), 6232–6237. doi:10.1073/pnas.071176010
- Lenoir, I., Lounes-Hadj Sahraoui, A., y Fontaine, J. (2016). Arbuscular mycorrhizal fungal-assisted phytoremediation of soil contaminated with persistent organic pollutants: a review. *European Journal of Soil Science*, 67(5), 624–640. doi:10.1111/ejss.12375
- Lin, Q., Mendelsohn, I. A., Suidan, M. T., Lee, K., y Venosa, A. D. (2002). The dose-response relationship between No. 2 fuel oil and the growth of the salt marsh grass, *Spartina alterniflora*. *Marine Pollution Bulletin*, 44(9), 897-902. doi:10.1016/s0025-326x(02)00118-2
- Lima, S. D., Oliveira, A. F., Golin, R., Lopes, V. C. P., Caixeta, D. S., Lima, Z. M., y Morais, E. B. (2020). Isolation and characterization of hydrocarbon-degrading bacteria from gas station leaking-contaminated groundwater in the Southern Amazon, Brazil. *Brazilian Journal of Biology*, 80(2), 354-361. doi:10.1590/1519-6984.208611.
- Lifshits, S., Glyaznetsova, Y., Erofeevskaya, L., Chalaya, O., y Zueva, I. (2021). Effect of oil pollution on the ecological condition of soils and bottom sediments of the arctic region (Yakutia). *Environmental Pollution*, 288, 117680. doi:10.1016/j.envpol.2021.117680
- Liu, S. L., Luo, Y. M., Cao, Z. H., Wu, L. H., Ding, K. Q., y Christie, P. (2004). Degradation of benzo[a]pyrene in soil with arbuscular mycorrhizal alfalfa. *Environmental Geochemistry and Health*, 26(2), 285-293. doi:10.1023/b:egah.0000039592.804
- Li, W., Li, W., Xing, L., y Guo, S. (2021). Effect of arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) and plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) on microbial community composition of phenanthrene and pyrene contaminated soils using Illumina HiSeq sequencing. 1-15. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-254559/v1>

- Li, Q., Hou, Z., Zhou, D., Jia, M., Lu, S., y Yu, J. (2022). A plant growth-promoting bacteria *Priestia megaterium* JR48 induces plant resistance to the crucifer black rot *via* a salicylic acid-dependent signaling pathway. *Frontiers in Plant Science*, 13, 4616. doi:10.3389/fpls.2022.1046181
- Liu, X., Ji, J., Zhang, X., Chen, Z., He, L. y Wang, C. (2022). Microbial remediation of crude oil in saline conditions by oil-degrading bacterium *priestia megaterium* FDU301. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1-19. <https://doi.org/10.1007/s12010-022-04245-4>
- López-Martínez, S., Gallegos-Martínez, M. E., Pérez Flores, L. J., y Gutiérrez Rojas, M. (2005). Mecanismos de fitorremediación de suelos contaminados con moléculas orgánicas xenobióticas. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 21(2), 91-100.
- López-Jiménez, J. G., Rivera-Cruz, M. del C., Trujillo-Narcía, A., Aceves-Navarro, L. A., Sol-Sánchez A., y Sarracino-Martínez, O. (2019). *Laguncularia racemosa* (Combretaceae) y bacterias terrestres asociadas medio siglo después de la contaminación crónica por hidrocarburos. *Revista de Biología Tropical*, 67(6), 1194-1209.
- Louden, B. C., Haarmann, D., y Lynne, A. M. (2011). Use of blue agar CAS assay for siderophore detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51-53. <https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Mathur, N., Bohra, J. S. S., Quaizi, A., y Vyas, A. (2007). Arbuscular mycorrhizal fungi: a potential tool for phytoremediation. *Journal of Plant Sciences*, 2(2), 127-140. DOI:10.3923/jps.2007.127.140
- Martínez-Hernández, I. A., Rivera-Cruz, M. del C., Carballar-Hernández, S., Trujillo-Narcía, A., Ortíz-García, C. F., Hernández-Galvez, G., y Alarcón, A. (2021). Arbuscular mycorrhizal colonization in a mangrove forest exposed to weathering oil for half a century. *Water, Air, & Soil Pollut*, 232, 1-18. <https://doi.org/10.1007/s11270-021-04986-8>
- Mandel, J. R., Dechaine, J. M., Marek, L. F., y Burke, J. M. (2011). Genetic diversity and population structure in cultivated sunflower and a comparison to its wild progenitor, *Helianthus annuus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 123(5), 693-704. doi:10.1007/s00122-011-1619-3
- Mahjoub, B. (2013). Plants for Soil Remediation. En Biomass for sustainable applications pollution remediation and energy. (Eds. Gaspard, S., Chaker Ncibi, M.), pp. 106-143. The royal society of chemistry.
- Marín Velásquez T. D. (2016). Corn (*Zea mays*) growth in petroleum contaminated soil, remediated with orange (*Citrus sinensis*) peel extract. *Enfoque UTE*, 7(3), 1-13. doi.org/10.29019/enfoqueute.v7n3.101
- Marek, L. F. (2019). Crop wild relatives of sunflower in North America. In American Crop Wild Relatives, 2. (Eds. Greene, S., Williams, K., Khoury, C., Kantar, M., Marek, L.), pp. 453-483. Springer Cham.

- Mallhi, A. I., Chatha, S. A. S., Hussain, A. I., Rizwan, M., Hussain Bujar, S. A., Hussein, A., Mallhi, Z. I., Ali, S., Hashem, A., Abd_Allah, E. F., Alemen, M. N. y Ahmad, P. (2020). Citric acid assisted phytoremediation of chromium through sunflower plants irrigated with tannery wastewater. *Plants*, 9(3), 380. <https://doi.org/10.3390/plants9030380>
- Małkowski, E., Sitko, K., Szopiński, M., Gieroń, Ż., Pogrzeba, M., Kalaji, H. M. y Zieleźnik-Rusinowska, P. (2020). Hormesis in plants: the role of oxidative stress, auxins and photosynthesis in corn treated with Cd or Pb. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(6), 2099. <https://doi.org/10.3390/ijms21062099>
- Malik, B., Pirzadah, T. B., & Hakeem, K. R. (2022). Phytoremediation of persistent organic pollutants (POPs). In: *Phytoremediation* (Eds. Bhat, R. A., Policarpo Tonelli, F. M., Dar, G. H., Hakeem, K.), pp. 415-436. Academic Press.
- Martins, C. D., Liduino, V. S., Oliveira, F. J., y Sėrvulo, E. F. C. (2014). Phytoremediation of soil multi-contaminated with hydrocarbons and heavy metals using sunflowers. *International Journal of Engineering & Technology*, 14(5), 1-6.
- Merkl, N., Schultze-Kraft, R., y Infante, C. (2005). Phytoremediation of petroleum-contaminated soils in the tropics-assessment of tropical grasses and legumes for enhancing oil-degradation. *Water, Air, and Soil Pollution*, 165(1-4), 195–209. doi:10.1007/s11270-005-4979-y
- Mendoza-Avalos, A., y Guerrero-Padilla A. (2015). Biodegradación de petróleo diesel-2 en agua de mar por *Pseudomonas aeruginosa* en un biorreactor aireado y agitado. *Sciendo*, 18(1), 23-37.
- Mitton, F. M., Gonzalez, M., Monserrat, J. M., y Miglioranza, K. S. B. (2016). Potential use of edible crops in the phytoremediation of endosulfan residues in soil. *Chemosphere*, 148, 300-306. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.01.028
- Mitra, M., Nguyen, K. M., Box, T. W., Gilpin, J. S., Hamby, S. R., Berry, T. L. y Duckett, E. H. (2020). Isolation and characterization of a novel *Sphingobium yanoikuyae* strain variant that uses biohazardous saturated hydrocarbons and aromatic compounds as sole carbon sources. *F1000Research*, 9, 767. doi: 10.12688/f1000research.25284.1.
- Mokea-Niaty, A., Medza-Mve, S. D., Lepengue, A. N., Moupela, C., Ognalaga, M., Mboumba, P., Toussaint, A., y M'BATCHI, B. (2018). *Alchornea cordifolia* (Schumach. & Thonn.) Müll. Arg: A potential plant for phytoremediation of manganese polluted soils. *International Journal Advanced Research*, 6(1), 328-337. <http://dx.doi.org/10.21474/IJAR01/6223>
- Moradi, B., Zare Maivan, H., Seyed Hashtroudi, M., Sorahinobar, M., y Rohloff, J. (2021). Physiological responses and phytoremediation capability of *Avicennia marina* to oil contamination. *Acta Physiologiae Plantarum*, 43(18), 1-12. <https://doi.org/10.1007/s11738-020-03177-y>
- Muthusarayanan, S., Sivarajasekar, N., Vivek, J. S., Vasudha Priyadharshini, S., Paramasivan, T., Dhakal, N., y Naushad, M. (2019). Research updates on heavy metal phytoremediation: enhancements, efficient post-harvesting strategies and economic opportunities. In: *Green*

- materials for wastewater treatment. (Eds. Naushad, M., Lichtfouse, E.), pp. 191–222. Springer Cham.
- Nasution, I. S., Satriyo, P., Yolanda, S., y Alma, A. (2021). Non-destructive measurement of leaf area and leaf number of hydroponic pak-choy plants (*Brassica rapa*). In IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, 644(1). 012004. IOP Publishing. doi:10.1088/1755-1315/644/1/012004
- Nanda, R., Sharma, R., y Bhagat, N. (2022). Background level, occurrence, speciation, bioavailability, uptake, detoxification mechanisms and management of Se-polluted soil. In Appraisal of metal (loids) in the ecosystem. (Eds. Kumar, V., Sharma, A., Setia, R.), pp. 255-282. Elsevier.
- Nero, B. F. (2020). Phytoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils with two plant species: *Jatropha curcas* and *Vetiveria zizanioides* at Ghana Manganese Company Ltd. *International Journal of Phytoremediation*, 23(2), 171–180. doi:10.1080/15226514.2020.1803204
- NOM-021-RECNAT-2000 (NORMA Oficial Mexicana). (2000). Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. SEMARNAT.
- Nonthakaew, N., Panbangred, W., Songnuan, W. y Intra, B. (2022). Plant growth-promoting properties of *Streptomyces* spp. isolates and their impact on mung bean plantlets' rhizosphere microbiome. *Frontiers in Microbiology*, 13. doi:10.3389/fmicb.2022.967415
- Núñez López, R. A., Meas Vong, Y., Ortega Borges, R. y Olgún, E. J. (2004). Fitorremediación: fundamentos y aplicaciones. *Ciencia*, 69-82.
- Ordoñez Burbano, D. E., Abella Medina, C. A., Echeverry Tamayo, A., Paz Lasprilla, L. M., y Benítez-Campo, N. (2018). Biodegradación de hidrocarburos alifáticos saturados por microorganismos aislados de suelo contaminado con derivados del petróleo. *Revista de Ciencias*, 22(2), 33-44.
- Ogata-Gutiérrez, K. y Zúñiga-Dávila, D. (2020). Bacteria-plant interactions: an added value of microbial inoculation. *Revista peruana de Biología*, 27(1), 21-25. <https://dx.doi.org/10.15381/rpb.v27i1.17575>
- Okoroafor, P. U., Mann, L., Amin Ngu, K., Zaffar, N., Monei, N. L., Boldt, C., Reitz, T., Heilmeier, H., y Wiche, O. (2022). Impact of soil inoculation with *Bacillus amyloliquefaciens* FZB42 on the phytoaccumulation of germanium, rare earth elements, and potentially toxic elements. *Plants*, 11, 341. <https://doi.org/10.3390/plants11030341>
- Olusola, S. A., y Anslem, E. E. (2010). Bioremediation of a crude oil polluted soil with *Pleurotus pulmonarius* and *Glomus mosseae* using *Amaranthus hybridus* as a test plant. *Journal of Bioremediation & Biodegradation*, 1(3). doi:10.4172/2155-6199.1000113

- Omotayo, A. E., Egbomeade, L. O., Taiwo, O., Oyebamiji, O. O., y Ilori, M. O. (2013). Hydrocarbon degradation by free-living nitrogen-fixing bacteria. *Journal of Scientific Research and Development*, 14, 75-84.
- Ortíz-Maya, J., Escalante-Espinosa, E., Fócil-Monterrubio, R. L., Ramírez-Saad, H. C. y Díaz Ramírez, I. J. (2017). Dinámica de poblaciones bacterianas y actividad deshidrogenasa durante la biorremediación de suelo recién contaminado e intemperizado con hidrocarburos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 33(2), 237-246. doi:10.20937/RICA.2017.33.02.05
- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., y Hamid, F. S. (2019). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: a review. *Environmental Technology & Innovation*, 17. doi:10.1016/j.eti.2019.100526
- Oyeneyin, B. (2015). Introduction to the hydrocarbon composite production system. *Developments in Petroleum Science*, 63. 11–128. doi:10.1016/b978-0-444-62637-0.00002-6
- Parkinson, D. (1982). Filamentous Fungi. *Methods of Soil Analysis*. 949–968. doi:10.2134/agronmonogr9.2.2ed.c44
- Pardo Castro, J. L., Perdomo Rojas, M. C., y Benavides López de Mesa, J. L. (2004). Efecto de la adición de fertilizantes inorgánicos compuestos en la degradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. *Nova*, 2 (2), 40-49.
- Pandey, V. C., Bajpai, O., y Singh, N. (2016). Energy crops in sustainable phytoremediation. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 54, 58-73. doi:10.1016/j.rser.2015.09.078
- Pandey, D., Kehri, H. K., Zoomi, I., Akhtar, O., y Singh, A. K. (2019). Mycorrhizal fungi: biodiversity, ecological significance, and industrial applications. In: *Recent Advancement in white biotechnology through fungi*. (Eds. Yadav, A. N., Mishra, S., Singh, S., Gupta, A.), pp. 181–199. Springer Cham.
- Pande, V., Pandey, S. C., Sati, D., Pande V., y Samant, M. (2020). Bioremediation: an emerging effective approach towards environment restoration. *Environmental Sustainability*, 3, 91-103. <https://doi.org/10.1007/s42398-020-00099-w>
- Patel, S., Sharma, A., y Batra, N. G. (2022). Arbuscular mycorrhizal fungi-assisted bioremediation bioremediations of heavy metals: A revaluation. In: *Innovations in Environmental Biotechnology* (Ed. Arora, S., Kumar, A., Ogita, S., Yau, Y.-Y.), pp. 785-804. Springer Nature Singapore.
- Pérez Moreno, J., y Read, D. J. (2004). Los hongos ectomicorrízicos, lazos vivientes que conectan y nutren a los árboles en la naturaleza. *Interciencia*, 29, (5), 239-247.
- Pérez Vargas, J., Viguera Carmona, S. E., Zamudio Moreno, E., Rivera Casado, N. A. y Calva Calva, G. (2017). Bioremediation of soils from oil spill impacted sites using bioaugmentation with biosurfactants producing, native, free-living nitrogen fixing bacteria.

- Pernía, B., Rojas-Tortolero, D., Sena, L., De Sisto, A., Inojosa Y. y Naranjo, L. (2018). Fitotoxicidad de hap, crudos extra pesados y sus fracciones en *Lactuca sativa*: Una interpretación integral utilizando un índice de toxicidad modificado. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 79-91. DOI: 10.20937/RICA.2018.34.01.07
- Pérez Robles, S. L., Silva Melo, I. C., Peñuela Mesa, G. A. y Cardona Gallo, S. A. (2015). Evaluación de biocombustibles e hidrocarburos del petróleo (gasolina y diesel) en un suelo: proceso de transporte y biorremediación. *Revista EIA*, 12(2), 21-46.
- Peschard Mariscal, J., Salazar Rebolledo, M. G. y Olea Gómez, O. A. (2021). ¿Qué sabemos del robo de combustible en México? Claroscuros de un delito que no cede. *Revista Mexicana de Ciencias Políticas y Sociales*, 66(241), 245-280. <https://doi.org/10.22201/fcpys.2448492xe.2020.241.75273>
- Phillips, J. M., y Hayman, D. S. (1970). Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment of infection. *Transactions of the British Mycological Society*, 55(1), 158-160.
- Pinedo, J., Ibáñez, R., Lijzen, J. P. A., y Irabien, Á. (2013). Assessment of soil pollution based on total petroleum hydrocarbons and individual oil substances. *Journal of Environmental Management*, 130, 72-79. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2013.08.048>
- Pikovskaya, R. (1948). Mobilization of phosphorus in soil in connection with vital activity of some microbial species. *Mikrobiologiya*, 17, 362-370.
- Poria, V., Dębiec-Andrzejewska, K., Fiodor, A., Lyzohub, M., Ajijah, N., Singh, S., y Pranaw, K. (2022). Plant growth-promoting bacteria (PGPB) integrated phytotechnology: A sustainable approach for remediation of marginal lands. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.999866>
- Prathap, M., y Ranjitha Kumari, B. D. (2015). A critical review on plant growth promoting rhizobacteria. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 06(04), pp. 266.
- Procuraduría Federal de Protección al Ambiente (Profepa). (2019). Estudio de suelo realizado por profepa determina altos niveles de contaminación y daños irreversibles en Tlahuelilpan, Hidalgo. <https://www.gob.mx/profepa/prensa/estudio-de-suelo-realizado-por-profepa-determina-altos-niveles-de-contaminacion-y-danos-irreversibles-en-tlahuelilpan-hidalgo>
- Prasad, M. N. V. (2007). Sunflower (*Helianthus annuus* L.)-A potential crop for environmental industry. *Helia*, 30(46), 167-174. DOI: 10.2298/HEL0746167P
- Petrová, Š., Rezek, J., Soudek, P., y Vaněk, T. (2017). Preliminary study of phytoremediation of brownfield soil contaminated by PAHs. *Science of the Total Environment*, 599, 572-580. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.163

- Prasad, M., Saraswat, P., Gupta, A. y Ranjan, R. (2021). Molecular basis of plant-microbe interaction in remediating organic pollutants. In: *Handbook of Bioremediation Physiological, Molecular and Biotechnological Interventions*, (Eds. Hasanuzzaman, M., and Vara Prasad, M. V.), pp. 603-623. Elsevier
- Priyadarshane, M., Mahto, U. y Das, S. (2022). Mechanism of toxicity and adverse health effects of environmental pollutants. In: *Microbial biodegradation and bioremediation. Techniques and case studies for environmental pollution* (Ed. Das, S., Dash, H. R.), pp. 33-53.
- Raskin, I., Kumar, P. N., Dushenkov, S., y Salt, D. E. (1994). Bioconcentration of heavy metals by plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 5(3), 285-290. [https://doi.org/10.1016/0958-1669\(94\)90030-2](https://doi.org/10.1016/0958-1669(94)90030-2)
- Ramírez-Gama, R. M., Urzú Hernández, M. del C., Camacho Cruz, A., Tsuzuki Reyes, M. G., Esquivel-Cote, R. (2021). Cultivo y caracterización de microorganismos. En: *Técnicas básicas de microbiología y su fundamento. Segunda edición. trillas*.
- Rajtor, M., y Piotrowska-Seget, Z. (2016). Prospects for arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) to assist in phytoremediation of soil hydrocarbon contaminants. *Chemosphere*, 162, 105–116. doi:10.1016/j.chemosphere.2016.07.071
- Rani, R., Kumar, V., Usmani, Z., Gupta, P. y Chandra, A. (2019). Influence of plant growth promoting rhizobacterial strains *Paenibacillus* sp. IITISM08, *Bacillus* sp. PRB77 and *Bacillus* sp. PRB101 using *Helianthus annuus* on degradation of endosulfan from contaminated soil. *Chemosphere*, 225, 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.037>
- Rahayu, Y. S. (2020). Bioremediation model of oil-contaminated soil in Lapindo mud using multisymbiotic organism. *Management of Environmental Quality: an International Journal*, 31(3), 586–601. doi:10.1108/meq-05-2019-0102
- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8-14.
- Ren, C. G., Kong, C. C., Bian, B., Liu, W., Li, Y., Luo, Y. M., y Xie, Z. H. (2017). Enhanced phytoremediation of soils contaminated with PAHs by arbuscular mycorrhiza and rhizobium. *International Journal of Phytoremediation*, 19(9), 789-797.
- Reid, T. E., Kavamura, V. N., Abadie, M., Torres-Ballesteros, A., Pawlett, M., Clark, I. M., Harris, J., y Mauchline, T. H. (2021). Inorganic chemical fertilizer application to wheat reduces the abundance of putative plant growth-promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiol*, 458. doi: 10.3389/fmicb.2021.642587
- Rodríguez-Rodríguez, N., Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., Almaráz-Suárez, J. J., y Salgado-García, S. (2016). Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leersia hexandra* in degraded soil. *Water Air and Soil Pollut*, 227, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3030-9>

- Rodríguez V., R. y Rodríguez B., M. (2019). Biorremediación de suelo de la chinampa ubicada en Cuernavaca delegación Xochimilco, D.F contaminado con plaguicidas empleando *Penicillium* sp. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 17(1), 48-58.
- Rostami, S., y Azhdarpoor, A. (2019). The application of plant growth regulators to improve phytoremediation of contaminated soils: a review. *Chemosphere*, 220, 818-827. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.203
- Romano-Armada, N., Yañez-Yazlle, M. F., Irazusta, V. P., Rajal, V. B., y Moraga, N. B. (2020). Potential of bioremediation and PGP traits in *Streptomyces* as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture. *Pathogens*, 9(2), 117. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020117>
- Rodríguez-Uribe, M. L., Peña-Cabriales, J. J., Rivera-Cruz, M. del C., y Délano-Frier, J. P. (2021). Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology and Innovation*, 23, 101781. doi:10.1016/j.eti.2021.101781
- Ruiz-Marín, A., Zavala-Loria, J. C., Canelo-Lopez, Y. y Cordova-Quiroz, A. V. (2013). Tropical bacteria isolated from oil-contaminated mangrove soil: bioremediation by natural attenuation and bioaugmentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12 (3), 553-560.
- Ruiz, J. L., y Salas Sanjuan, M. del C. (2022). The use of plant growth promoting bacteria for biofertilization; effects on concentrations of nutrients in inoculated aqueous vermicompost extract and on the yield and quality of tomatoes. *Biological Agriculture and Horticulture* 38(3), 145-161. <https://doi.org/10.1080/01448765.2021.2010596>
- Rani, R., Kumar, V., Usmani, Z., Gupta, P. y Chandra, A. (2019). Influence of plant growth promoting rhizobacterial strains *Paenibacillus* sp. IITISM08, *Bacillus* sp. PRB77 and *Bacillus* sp. PRB101 using *Helianthus annuus* on degradation of endosulfan from contaminated soil. *Chemosphere*, 225, 479-489. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.03.037>
- Rahayu, Y. S. (2020). Bioremediation model of oil-contaminated soil in Lapindo mud using multisymbiotic organism. *Management of Environmental Quality: An International Journal*, 31(3), 586-601. doi:10.1108/meq-05-2019-0102
- Rennie, R. J. (1981). A single medium for the isolation of acetylene-reducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal of Microbiology*, 27(1), 8-14.
- Ren, C. G., Kong, C. C., Bian, B., Liu, W., Li, Y., Luo, Y. M., y Xie, Z. H. (2017). Enhanced phytoremediation of soils contaminated with PAHs by arbuscular mycorrhiza and rhizobium. *International Journal of Phytoremediation*, 19(9), 789-797. <https://doi.org/10.1080/15226514.2017.1284755>
- Reid, T. E., Kavamura, V. N., Abadie, M., Torres-Ballesteros, A., Pawlett, M., Clark, I. M., Harris, J., y Mauchline, T. H. (2021). Inorganic chemical fertilizer application to wheat reduces

- the abundance of putative plant growth-promoting rhizobacteria. *Frontiers in Microbiol*, 458. doi: 10.3389/fmicb.2021.642587
- Rodríguez Romero, A. J., Robles Salazar, C. A., Ruíz Picos, R. A., López López, E., Sedeño Díaz, J. E., y Rodríguez Dorantes, A. (2014). Índices de germinación y elongación radical de *Lactuca sativa* en el biomonitorio de la calidad del agua del río Chalma. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 30(3), 307-316.
- Rodríguez-Rodríguez, N., Rivera-Cruz, M. C., Trujillo-Narcía, A., Almaráz-Suárez, J. J., y Salgado-García, S. (2016). Spatial distribution of oil and biostimulation through the rhizosphere of *Leersia hexandra* in degraded soil. *Water Air and Soil Pollut*, 227, 1-14. <https://doi.org/10.1007/s11270-016-3030-9>
- Rodríguez V., R. y Rodríguez B., M. (2019). Biorremediación de suelo de la chinampa ubicada en Cuemanco delegación Xochimilco, D.F contaminado con plaguicidas empleando *Penicillium* sp. *Revista de la Facultad de Ciencias Básicas*, 17(1), 48-58. <https://doi.org/10.24054/01204211.v1.n1.2019.270>
- Rostami, S., y Azhdarpoor, A. (2019). The application of plant growth regulators to improve phytoremediation of contaminated soils: a review. *Chemosphere*, 220, 818–827. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.12.203
- Romano-Armada, N., Yañez-Yazlle, M. F., Irazusta, V. P., Rajal, V. B., y Moraga, N. B. (2020). Potential of bioremediation and PGP traits in *Streptomyces* as strategies for bio-reclamation of salt-affected soils for agriculture. *Pathogens*, 9(2), 117. <https://doi.org/10.3390/pathogens9020117>
- Rodríguez-Uribe, M. L., Peña-Cabriales, J. J., Rivera-Cruz, M. del C., y Délano-Frier, J. P. (2021). Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology & Innovation*, 23, 101781. doi:10.1016/j.eti.2021.101781
- Ruiz-Marín, A., Zavala-Loria, J. C., Canelo-Lopez, Y., y Cordova-Quiroz, A. V. (2013). Tropical bacteria isolated from oil-contaminated mangrove soil: bioremediation by natural attenuation and bioaugmentation. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, 12 (3), 553-560.
- Ruiz, J. L., y Salas Sanjuan, M. del C. (2022). The use of plant growth promoting bacteria for biofertilization; effects on concentrations of nutrients in inoculated aqueous vermicompost extract and on the yield and quality of tomatoes. *Biological Agriculture & Horticulture* 38(3), 145-161. <https://doi.org/10.1080/01448765.2021.2010596>
- SAS Institute. 2000. User's Guide: Statistics, version 9.0. Statistical Analysis System, Institute. Cary, Carolina del Norte, EE.UU.
- Sabir, M., Waraich, E. A., Hakeem, K. R., Öztürk, M., Ahmad, H. R., y Shahid, M. (2015). Phytoremediation: Mechanisms and Adaptations. In: *Phytoremediation. Soil Remediation and Plants*, (Ed. Hakeem, K., Sabir, M., Ozturk, M., Mermut, A. R.), pp. 85–105. Elsevier.

- Saucedo-Martínez, B. C., Farías-Rodríguez, R., Santoyo-Pizano, G. y Sánchez-Yáñez, J. M. (2017). Integral biostimulation of soil polluted by 60000 ppm of motor waste oil. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 8(2), 91-103.
- Salim, F., Setiadi, Y., Sopandie, D., y Yani, M. (2018). The Effect of Nutrients, Compost, and Local Bacteria in Bioremediation of Petroleum Contaminated Soil. *Journal of Environment and Earth Science* 8(1), 140-152.
- Schwyn, B., y Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical Biochemistry*, 160(1), 47-56. doi:10.1016/0003-2697(87)90612-9
- Schübler, A., Schwarzott, D., y Walker, C. (2001). A new fungal phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research*, 105(12), 1413-1421. doi:10.1017/S0953756201005196
- Schmidt, B., Gaşpar, S., Camen, D., Ciobanu, I., y Sumălan, R. (2011). Arbuscular mycorrhizal fungi in terms of symbiosis-parasitism continuum. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 76(4), 653-9.
- SEMARNAT. (2007). Que establece los criterios para determinar las concentraciones de remediación de suelos contaminados por arsénico, bario, berilio, cadmio, cromo hexavalente, mercurio, níquel, plata, plomo, selenio, talio y/o vanadio. Norma oficial mexicana NOM-147-SEMARNAT/SSA1-2004.
- SEMARNAT. (2013). Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012.
- Seiler, G. J., Qi, L. L., y Marek, L. F. (2017). Utilization of sunflower crop wild relatives for cultivated sunflower improvement. *Crop Science*, 57(3), 1083-1101. doi:10.2135/cropsci2016.10.0856
- Senilliani, M. G., Guzmán, A., Alvarez, P., y Brassiolo, M. (2022). ¿Una fase de endurecimiento más prolongada mejora la calidad de planta en *Prosopis alba* Griseb?. *Madera y Bosques*, 28(1). <https://doi.org/10.21829/myb.2022.2812409>
- Shen, W., Zhu, N., Cui, J., Wang, H., Dang, Z., Wu, P., Luo, Y. y Shi, C. (2016). Ecotoxicity monitoring and bioindicator screening of oil-contaminated soil during bioremediation. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 124, 120-128. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.10.005
- Sharma, P., Singh, S. P., Pandey, S., Thanki, A., y Singh, N. K. (2020). Role of potential native weeds and grasses for phytoremediation of endocrine-disrupting pollutants discharged from pulp paper industry waste. In: *Bioremediation of pollutants: From Genetic Engineering to Genome Engineering* (Eds. Pandey, V. C., Singh V.), pp. 17-37. Elsevier.

- Shaikh, N. G., Rahman, A., Sadiq, M., Ehteshamul-Haque, S., y Shams, Z. I. (2022). Phytoremediation of lead in sunflower (*Helianthus annuus* L.) by growth-promoting rhizobacterium and neem cake. Research Square. DOI:10.21203/rs.3.rs-1542744/v1.
- Sivaram, A. K., Logeshwaran, P., Lockington, R., Naidu, R., y Megharaj, M. (2019). Phytoremediation efficacy assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons contaminated soils using garden pea (*Pisum sativum*) and earthworms (*Eisenia fetida*). *Chemosphere*, 229, 227-235. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.005>
- Silva-Flores, P., Argüelles-Moyao, A., Aguilar-Paredes, A., Calaça, F. J. S., Duchicela, J., Fernández, N., Furtado, A. N. M., Guerra-Sierra, B., Lovera, M., Marín, C., Nieves, M. A., Pezzani, F., Rinaldi, A. C., Rojas, K., y Vasco-Palacios, A. M. (2021). Mycorrhizal science outreach: scope of action and available resources in the face of global change. *Plants, People, Planet*, 3(5), 506–522. doi:10.1002/ppp3.10213
- Soares, E., Hamid, A., y Mangkoedihardjo, S. (2021). Phytoremediation of zinc polluted soil using sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Journal of Phytology*, 13, 9-12. doi:10.25081/jp.2021.v13.6872
- Sophia, S. y Shetty Kodialbail, V. (2020). Phytoremediation of soil for metal and organic pollutant removal. In: Bioprocess engineering for bioremediation: valorization and management techniques. (Eds. Jerold, M., Arockiasamy, S., Sivasubramanian, V.), pp. 45-66. Springer, Cham.
- Souza, R., Ambrosini, A., y Passaglia, L. M. (2015). Plant growth-promoting bacteria as inoculants in agricultural soils. *Genetics and molecular biology*, 38(4), 401-419. <https://doi.org/10.1590/S1415-475738420150053>
- Spaczyński, M., Seta-Koselska, A., Patrzyłtas, P., Betlej, A., y Skórzyńska-Polit, E. (2012). Phytodegradation and biodegradation in rhizosphere as efficient methods of reclamation of soil contaminated by organic chemicals (a review). *Acta Agrophysica*, 19(1), 155-169.
- Stauffer, E., Dolan, J. A., y Newman, R. (2008). Flammable and Combustible Liquids. In: Fire Debris Analysis. (Ed. Stauffer, E., Dolan, J. A., Newman, R.), pp. 199-233. Academic Press.
- Speight, J. G. (2017). Removal of organic compounds from the environment. In: Environmental organic chemistry for engineers. (Ed. Speight, J. G.), pp. 387–432. Editorial Joe Hayton.
- Srivastava, S., Anand, V., Singh, P., Roy, A., Pallavi, S., Bist, V., Kaur, J., Srivastava, S., Katiyar, R., y Srivastava, R. (2021). Microbial systems as a source of novel genes for enhanced phytoremediation of contaminated soils. *Microbe Mediated Remediation of Environmental Contaminants*, 177-198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-821199-1.00016-X>
- Smith, S. E. y Read, D. (2008). Arbuscular mycorrhizas. In: Mycorrhizal symbiosis. (Ed. Smith, S. E., Read, D.), pp. 11-188. Third Edition. Academic press.
- Stamatiu-Sánchez, K., Alarcón, A., Ferrera-Cerrato, R., Nava-Díaz, C., Sánchez-Escudero, J., Cruz-Sánchez, J. S., y Castillo, M. P. (2015). Tolerancia de hongos filamentosos a

- endosulfán, clorpirifós y clorotalonil en condiciones *in vitro*. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 31 (1), 23-37.
- Steliga, T., y Kluk, D. (2020). Application of *Festuca arundinacea* in phytoremediation of soils contaminated with Pb, Ni, Cd and petroleum hydrocarbons. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 194, 110409. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110409>
- Surriya, O., Sarah Saleem, S., Waqar, K., y Gul Kazi, A. (2015). Phytoremediation of Soils: Prospects and Challenges. En: *Soil Remediation and Plants: Prospects and Challenges*. (Ed. Rehman H., K., Sabir, M., Ozturk, M., Ruhi M., A.), pp. 1-36. Elsevier.
- Shukla, A. K., Singh, A. K., y Sharma, A. (2019). Mycorrhizal assisted phytoremediation of xenobiotics from contaminated soil. En: *Mycorrhizosphere and pedogenesis*. (Ed. Varma, A., Choudhary, D.), pp. 53-59. Springer, Singapore.
- Sui, X., Wang, X., Li, Y., y Ji, H. (2021). Remediation of petroleum-contaminated soils with microbial and microbial combined methods: advances, mechanisms, and challenges. *Sustainability*, 13(16), 9267. <https://doi.org/10.3390/su13169267>
- Tardieu, F., Granier, C., y Muller, B. (1999). Modelling leaf expansion in a fluctuating environment: are changes in specific leaf area a consequence of changes in expansion rate?. *New Phytologist*, 143(1), 33-43. doi:10.1046/j.1469-8137.1999.00433.x
- Tang, J., Lu, X., Sun, Q., y Zhu, W. (2012). Aging effect of petroleum hydrocarbons in soil under different attenuation conditions. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 149(1), 109-117. doi.org/10.1016/j.agee.2011.12.020
- Tang, K. H., y Law, Y. W. (2019). Phytoremediation of soil contaminated with crude oil using *Mucuna bracteata*. *Research in Ecology*, 01(01), 20-30. <https://doi.org/10.30564/re.v1i1.739>
- Teng, Y., Shen, Y., Luo, Y., Sun, X., Sun, M., Fu, D., Li, Z. y Christie, P. (2011). Influence of *Rhizobium meliloti* on phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by alfalfa in an aged contaminated soil. *Journal of Hazardous Materials*, 186(2-3), 1271-1276. doi:10.1016/j.jhazmat.2010.11.126
- Tian, X., Wang, X., Peng, S., Wang, Z., Zhou, R. y Tian, H. (2018). Isolation, screening, and crude oil degradation characteristics of hydrocarbons-degrading bacteria for treatment of oily wastewater. *Water Science & Technology*, 78(12), 2626-2638. doi: 10.2166/wst.2019.025
- Torri, S. I., Cabrera, M. N., y Alberti, C. (2018). Respiración potencial durante la bioestimulación de un suelo contaminado con hidrocarburos aromáticos policíclicos. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 34(1), 127-136. <https://doi.org/10.20937/rica.2018.34.01.11>
- Trejo, D., Moreira, C., Bañuelos, I., Lara, L., Alafita, G., y Reyes, A. (2013). Effect of diesel and biodiesel on the growth of *Brachiaria decumbens* inoculated with arbuscular mycorrhizal fungi. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 16, 391 –398.

- Trujillo-Tapia, Ma. N., García-Santiago, J. L., Martínez-Nava J. G., y Ramírez-Fuentes, E. (2018). Jamaica seeds (*Hibiscus sabdariffa* L.) as bioindicator of toxicity in hydrocarbon contaminated soil. *Asian Journal of Plant and Soil Sciences*, 3(1), 1-8.
- Truskewycz, A., Gundry, T. D., Khudur, L. S., Kolobaric, A., Taha, M., Aburto-Medina, A., Ball, A. S., y Shahsavari, E. (2019). Petroleum hydrocarbon contamination in terrestrial ecosystems-fate and microbial responses. *Molecules*, 24(18), 3400. <https://doi.org/10.3390/molecules24183400>
- Udgire, M., Shah, N., y Jadhav, M. (2015). Enrichment, isolation and identification of hydrocarbon degrading bacteria. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(6), 708-713.
- Usha, R., Vasavi, A., Thishya, K., Rani, S. J., y Supraja, P. (2011). Phytoextraction of lead from industrial effluents by sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Rasayan Journal of Chemistry*, 4(1), 8-12.
- Vázquez-Luna, D., Castelán-Estrada, M., Rivera-Cruz, M. del C., Ortiz-Ceballos, Á. I., y Izquierdo R., F. (2010). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 26(3), 183-191.
- Vázquez-Luna, M., Montiel-Flores, A., Vázquez-Luna, D., y Herrera-Tenorio, M. F. (2011). Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 13, 511 –5235.
- Viesser, J. A., Sugai-Guerios, M. H., Malucelli, L. C., Pincerati, M. R., Karp, S. G., y Maranhão, L. T. (2020). Petroleum-tolerant rhizospheric bacteria: isolation, characterization and bioremediation potential. *Scientific Reports*, 10(1), 11. doi:10.1038/s41598-020-59029-9
- Wang, M., Chen, S., Jia, X., y Chen, L. (2021). Concept and types of bioremediation. *Handbook of Bioremediation*, 3-8. doi:10.1016/b978-0-12-819382-2.00001-6
- Wei, Y., Wang, Y., Duan, M., Han, J., y Li, G. (2019). Growth tolerance and remediation potential of six plants in oil-polluted soil. *Journal of Soils and Sediments*, 19, 3773–3785. <https://doi.org/10.1007/s11368-019-02348-w>
- Wolna-Maruwka, A., y Niewiadomska, A. (2021). The significance of microbial transformation of nitrogen compounds in the light of integrated crop management. *Agronomy* 11(7), 1-27. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071415>
- Xun, F., Xie, B., Liu, S., y Guo, C. (2014). Effect of plant growth-promoting bacteria (PGPR) and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inoculation on oats in saline-alkali soil contaminated by petroleum to enhance phytoremediation. *Environmental Science Pollution Research*, 22, 598–608. DOI:10.1007/s11356-014-3396-4
- Xiang, L., Harindintwali, J. D., Wang, F., Redmile-Gordon, M., Chang, S. X., Fu, Y., He, C., Muhoza, B., Brahushi, F., Bolan, N., Jiang, X., Ok, Y. S., Rinklebe, J., Schaeffer, A., Zhu, Y.-g., Tiedje, y Xing, B. (2022). Integrating biochar, bacteria, and plants for sustainable

- remediation of soils contaminated with organic pollutants. *Environmental Science & Technology*, 56(23), 16546-16566.
- Yan, S., Wang, Q., Qu, L., y Li, C. (2013). Characterization of oil-degrading bacteria from oil-contaminated soil and activity of their enzymes. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 27(4), 3932-3938. DOI:10.5504/BBEQ.2013.0050
- Yan, A., Wang, Y., Tan, S. N., Mohd Yusof, M. L., Ghosh, S., y Chen, Z. (2020). Phytoremediation: a promising approach for revegetation of heavy metal-polluted land. *Frontiers in Plant Science*, 11, 359. doi:10.3389/fpls.2020.00359
- Yahya, M., Rasul, M., Sarwar, Y., Suleman, M., Tariq, M., Hussain, S. Z., Sajid, Z. I., Imran, A., Amin, I., Reitz, T., Tarkka, M. T., y Yasmin, S. (2022). Designing synergistic biostimulants formulation containing autochthonous phosphate-solubilizing bacteria for sustainable wheat production. *Frontiers in Microbiology*, 13, 889073. doi: 10.3389/fmicb.2022.889073
- Zehra, A., Sahito, Z. A., Tong, W., Tang, L., Hamid, Y., Khan, M. B., Ali, Z., Naqvi, B., y Yang, X. (2019). Assessment of sunflower germplasm for phytoremediation of lead-polluted soil and production of seed oil and seed meal for human and animal consumption. *Journal of Environmental Sciences*, 87, 24-38. doi:10.1016/j.jes.2019.05.031
- Zhang, B., Zhang, L., y Zhang, X. (2019). Bioremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soil by petroleum-degrading bacteria immobilized on biochar. *RSC Advances*, 9(60), 35304–35311. doi:10.1039/c9ra06726d
- Zouboulis, A. I., Moussas, P. A., y Psaltou, S. G. (2018). Groundwater and soil pollution: bioremediation. *Reference Module in Earth Systems and Environmental Sciences*, 1037–1044. doi:10.1016/b978-0-12-409548-9.11246-1
- Zuzolo, D., Guarino, C., Postiglione, A., Tartaglia, M., Scarano, P., Prigioniero, A., Terzano, R., Porfido, C., Morra, L., Benotti, D., Gresia, D., Stacul, E. R., y Sciarrillo, R. (2022). Overcome the limits of multi-contaminated industrial soils bioremediation: insights from a multi-disciplinary study. *Journal of Hazardous Materials*, 421, 126762. doi:10.1016/j.jhazmat.2021.126762

APÉNDICE

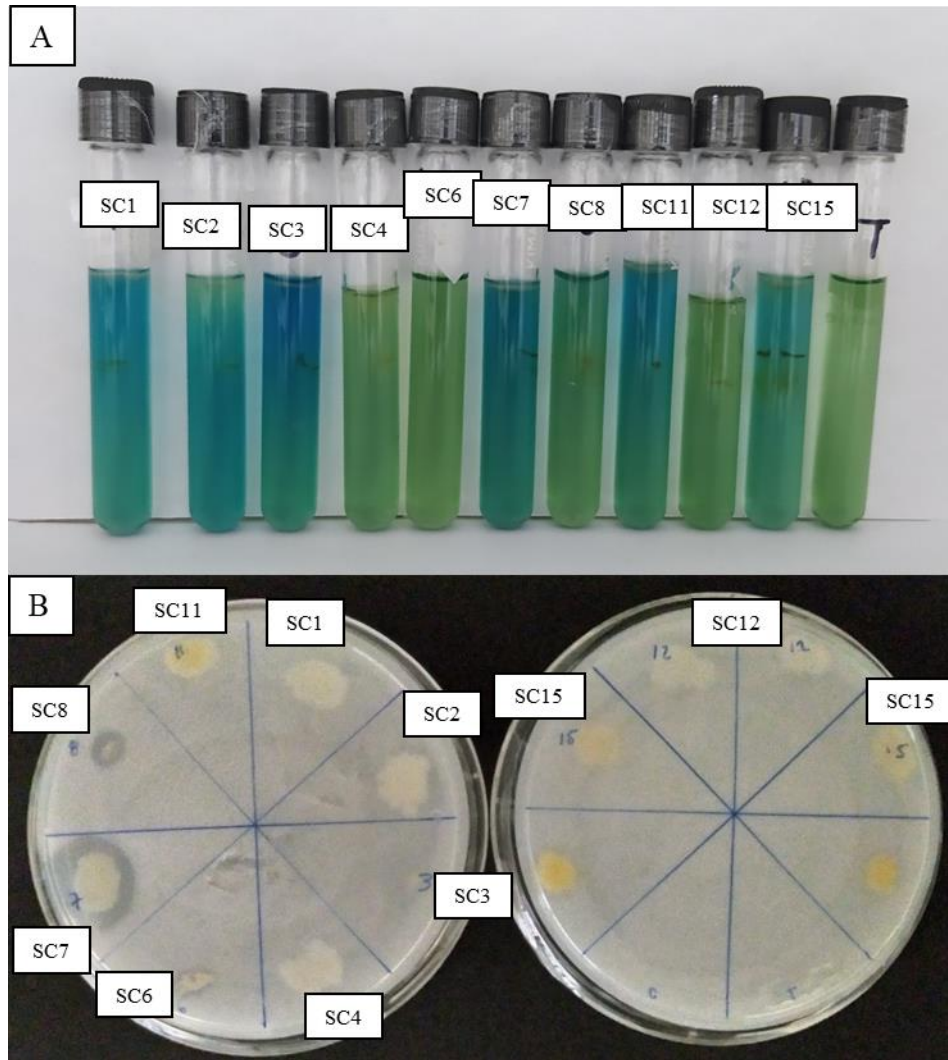
Apéndice A.

Aspecto del crecimiento del girasol (*Helianthus annuus* L.) en suelo contaminado con un hidrocarburo de petróleo (gasolina) en diferentes concentraciones, en condiciones de invernadero a los 20 días después de la siembra.



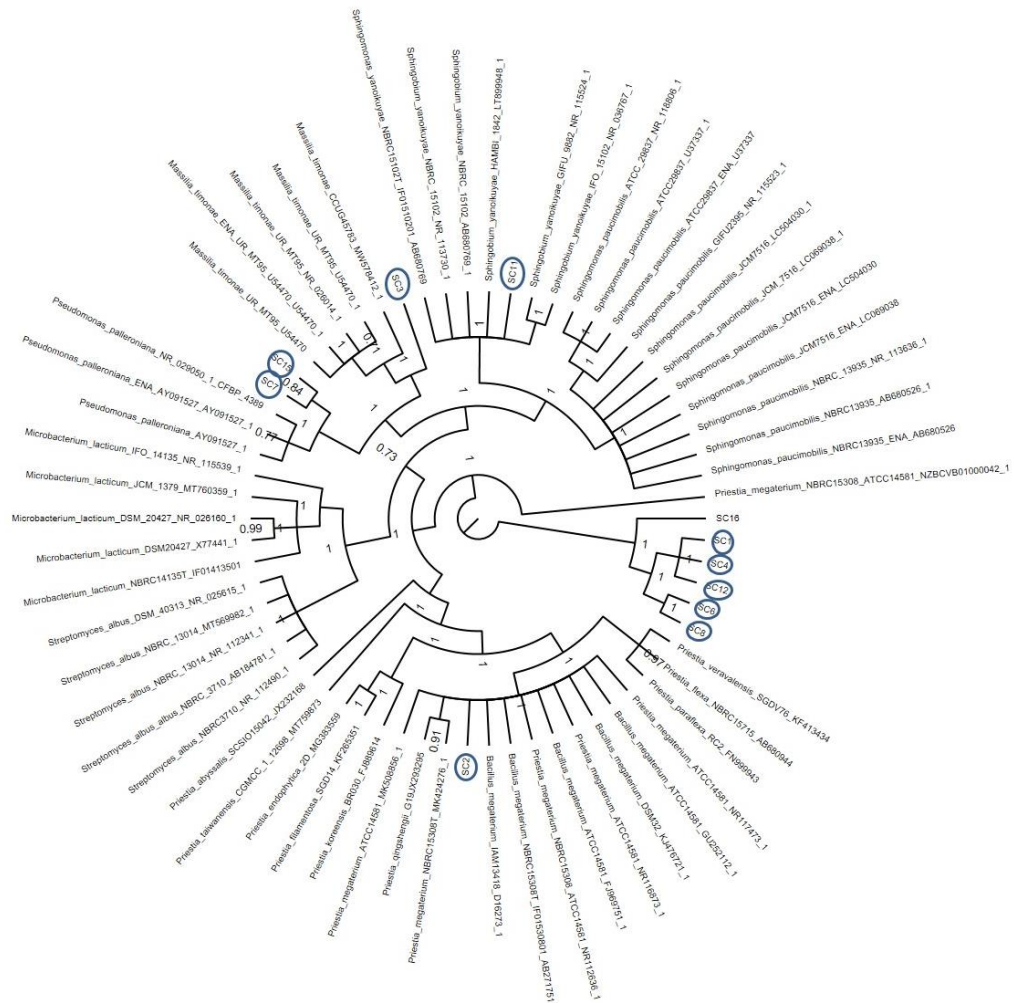
Apéndice B.

Pruebas bioquímicas de cepas seleccionadas. Prueba cualitativa de fijación de nitrógeno en medio semisólido NFb (A) y prueba cualitativa de solubilización de fosfatos en medio Pikovskaya (B).



Apéndice C.

Árbol filogenético de las 10 bacterias (marcadas en círculos) aisladas de suelo agrícola contaminado artificialmente con gasolina.



Apéndice D.

Secuencias de las especies bacterianas identificadas. Las cepas bacterianas (SC1) *Bacillus* sp., (SC2) *Priestia megaterium*, (SC3) *Massilia timonae*, (SC4) *Bacillus* sp., (SC6) *Streptomyces flavotricini*, (SC7) *Pseudomonas palleroniana*, (SC8) *Streptomyces flavotricini*, (SC11) *Sphingobium yanoikuyae*, (SC12) *Bacillus* sp. y (SC15) *Pseudomonas palleroniana*.

Cepa SC1

aacagagttt gatcctgget caggatgaac gctggcggcg tgcctaatac atgcaagtcg agcgaactga ttagaagctt
gcttctatga cgtagcggc ggacgggtga gtaacacgtg ggcaacctgc ctgtaagact gggataactt cgggaaaccg
aagctaatac cggataggat cttctcttc atgggagatg attgaaagat ggtttcggct atcacttaca gatgggcccg cggtgatta
gctagttggt gaggtaacgg ctcaccaagg caacgatgca tagccgacct gagagggtga tcggccacac tgggactgag
acacggccca gactcctacg ggaggcagca gtagggaatc ttccgcaatg gacgaaagtc tgacggagca acgccgcgtg
agtgatgaag gctttcgggt cgtaaaactc tgttgtagg gaagaacaag tacgagagta actgctcgtta ccttgacggt
acctaaccag aaagccacgg ctaactacgt gccagcagcc gcgtaatac gtaggtggca agcgttatcc ggaattattg
ggcgtaaagc gcgcgcaggc ggtttcttaa gtctgatgtg aaagcccag gctcaaccgt ggagggtcat tggaaactgg
ggaactgag tgcagaagag aaaagcggaa ttccacgtgt agcggtgaaa tgcgtagaga tgtggaggaa caccagtggc
gaaggcggct ttttggtctg taactgacgc tgaggcgcga aagcgtgggg agcaaacagg attagatacc ctggtagtcc
acgccgtaaa cgatgagtgc taagtgttag agggttccg ccttttagtg ctgcagctaa cgcattaagc actccgcctg
gggagtacgg tcgcaagact gaaactcaaa ggaattgacg ggggcccgca caagcgggtg agcatgtggt ttaattcgaa
gcaacgcgaa gaaccttacc aggtctgac atcctctgac aactctagag atagagcgtt cccttcggg ggacagagtg
acaggtggtg catggtgtc gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcgaacc cttgatctta
gttgccagca tttagttggg cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg gaggaagggtg gggatgacgt caaatcatca
tgccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatgat ggtacaaagg gctgcaagac cgcgaggta agccaatccc
ataaaacat tctcagttcg gattgtaggc tgcaactcgc ctacatgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat
gccgcgggtg aaatacgttc cggggcctt gtacacaccg cccgtcacac cacgagagtt tgtaacacc gaagtcggtg
gagtaaccgt aaggagctag ccgcctaagg tgggacagat gattgggggt gaagtcgtaa caaggtagcc gtatcgaaa

Cepa SC2

caacagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc gagcgaactg attagaagct
tgcttctatg acgttagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaacctg cctgtaagac tgggataact tcgggaaacc
gaagctaata ccggatagga tcttctcctt catgggagat gattgaaaga tggtttcggc taccacttac agatgggccc gcggtgcatt
agctagtgg tgaggtaacg gtcaccaag gcaacgatgc atagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgcgt
gagtgatgaa ggcttcggg tcgtaaaact ctgtttag ggaagaaca gtacgagagt aactgcttgc acctgacgg
tacctaaca gaaagccacg gctaactacg tgcagcagc cgcggtata cgtaggtggc aagcgttatc cggaattatt
gggcgtaaaag cgcgcgagg cggtttctta agtctgatgt gaaagccac ggctcaaccg tggagggtca ttgaaactg
gggaacttga gtgcagaaga gaaaagcggg attccacgtg tagcgggtaa atgcgtagag atgtggagga acaccagtgg
cgaaggcggc ttttggctt gtaactgacg ctgaggcggc aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc
cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta gagggttcc gcccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgct
ggggagtagc gtcgcaagac tgaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg ttaattcga
agcaacgcga agaacctac caggtcttga catcctctga caactctaga gatagagcgt tcccctcgg gggacagagt
gacaggtggt gcatggtgt cgtcagctc tctctgaga tgtgggta agtcccgaa cgagcgaac ccttgatctt
agttgccagc atttagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaatcctc
atgccctta tgacctggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaaaaag ggctgcaaga ccgcgaggtc aagccaatcc
cataaaacca ttctcagttc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca
tgcccggtg aatacgttc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacaca cgagagttg taacaccgga agtcggtgga
gtaaccgtaa ggagctagcc gcctaaggtg ggacagatga ttggggtgaa gtcgtaacaa ggtagccgta tcggaaggtg
cggctggatc acctcctaa gcttgaatc ccggg

Cepa SC3

caacagagtt tgatcctggc tcagattgaa cgctggcggc atgctttaca catgcaagtc gaacggcagc gcggggcaac
ctggcggcga gtggcgaacg ggtgagtaat atatcggaac gtaccaaga gtgggggata acgtagcgaa agttacgcta
ataccgata cgatctaagg atgaaagtgg gggatcgcaa gacctatgc tctggagcg gccgatatct gattagctag
ttggtgaggt aaaggctcac caaggcagc atcagtagct ggtctgagag gacgaccagc cacttgga ctgagacag
gtccagactc ctacgggagg cagcagtggt gaatttgg caatgggcgc aagcctgac cagcaatgcc gcgtgagtg
agaaggcctt cgggtgttaa agctctttg tcagggaaga aacggtagga gctaatact cttgctaag acggtacctg
aagaataagc accggctaac tacgtgccag cagccgggt aatacgtagg gtgcaagcgt taatcggaat tactggcgt

aaagcgtgcg caggcggttt tgtaagtctg tcgtgaaagc cccgggctca acctgggaat tgcgatggag actgcaaggc
ttgaatctgg cagagggggg tagaattcca cgtgtagcag tgaatgcgt agagatgtgg aggaacaccg atggcgaagg
cagccccctg ggtcaagatt gacgctcatg cacgaaagcg tggggagcaa acaggattag ataccctggt agtccacgcc
ctaaacgatg tctactagtt gtcgggtttt aattaacttg gtaacgcagc taacgcgtga agtagaccgc ctggggagta
cggtcgcaag attaaaactc aaaggaattg acggggaccg gcacaagcgg tggatgatgt ggattaattc gatgcaacgc
gaaaaacctt acctaccctt gacatgtcag gaagctcgga gagatctgag tgtgcccgaa agggaaactg aacacaggtg
ctgcatggct gtcgtcagct cgtgtcgtga gatgttgggt taagtcccgc aacgagcgc acccttgta ttagttgcta
cgcaagagca ctctaatgag actgccggtg acaaaccgga ggaaggtggg gatgacgtca agtcctcatg gcccttatgg
gtagggcttc acacgtcata caatgttaca tacagagggc cgccaaccg cgagggggag ctaatccag aaagtgtatc
gtagtccgga tcgcagtctg caactcgact gcgtgaagtt ggaatcgcta gtaatcgcg atcagcatgt cgcggtgaat
acgttcccgg gtcttgata caccgcccgt cacaccatgg gagcggggtt taccagaagt aggtagctta accgcaagga
gggcgcttac cacggtagga ttcgtgactg ggggtgaagtc gtaacaaggt agccgtatcg gaaggtgcbg ctggatcac

Cepa SC4

caacagagtt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc gagcgaactg attagaagct
tgcttctatg acgttagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaacctg cctgtaagac tgggataact tcgggaaacc
gaagctaata ccggatagga tcttctcctt catgggagat gattgaaaga tggttcggc tacccttac agatgggccc gcggtgcatt
agctagtgg tgaggtaacg gtcaccaag gcaacgatgc atagccgacc tgagaggggtg atcgccaca ctgggactga
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgccgct
gagtatgaa ggcttcggg tcgtaaaact ctgtttagt ggaagaaca gtacgagagt aactgctctg acctgacgg
tacctaaca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcgtaata cgtaggtggc aagcgtatc cggattatt
gggcgtaaag cgcgcgcagg cggtttcta agtctgatgt gaaagcccac ggctcaaccg tggagggtca ttggaaactg
gggaactga gtgcagaaga gaaaagcggg attccacgtg tagcgggtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccagtg
cgaaggcggc ttttggtct gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtatc
cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta gagggtttc gcccttagt gctgcagcta acgcattaag cactccgct
ggggagtacg gtcgcaagac tgaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgtg gagcatgtgg ttaattcga
agcaacgca agaacctac caggtctga catcctctga caactctaga gatagagcgt tcccctcgg gggacagag
gacaggtggg gcatggtgt cgtcagctc tctctgaga tgttgggta agtcccgca cgagcgaac ccttgatct
agttgccagc atttagttg gactctaa gtgactgcc gtgacaacc ggaggaaggt ggggatgac tcaatcatc
atgccctta tgacctggc tacacagtg ctacaatgga tggtaaaag ggctgcaaga ccgcgaggtc aagccaatcc
cataaaacca tctcagttc ggattgtagg ctgcaactc cctacatgaa gctggaatc ctagtaatc cggatcagca

tgccgcgggt gaaatacgtt cccgggcctt gtacacaccg cccgtcacac cagcagagtt tgtaacacc gaagtcgggtg
gagtaaccgt aaggagctag ccgcctaagg tgggacagat gattgggggtg aagtcgtaac aaggtagccg tate

Cepa SC6

aacagagttt gatcctggct caggacgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgatgaag cccttcgggg
tggattagtg gcgaacgggt gagtaacacg tgggcaatct gcccttact ctgggacaag ccctggaaac ggggtcta
accggatacg actgcggaag gcatctccg tgggtgaaag ctccggcggt gaaggatgag cccgcggcct atcagcttgt
tgggtgggta atggcctacc aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gcgaccggcc aactggggac tgagacacgg
cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac aatgggcgaa agcctgatgc agcgacgcc cgtgagggat
gacggcctc ggggtgtaaa cctcttcag cagggaagaa gcgaaagtga cggtaactgc agaagaagc cgggtaact
acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg cgcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt aggcggctt
tcacgtcgga tgtgaaagcc cgaggcttaa cctcgggtct gcatcgata cgggctagct agagtgtggt aggggagatc
ggaattcctg gtgtagcggg gaaatgcgca gatacagga ggaacaccgg tggcgaagcc ggatctctgg gccattactg
acgtgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgttgg gaactaggtg
ttggcgacat tccacgtcgt cgggtccgca gctaacgcat taagttcccc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggcggagcat gtggcttaac tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagcc
ttgacatata ccgaaagca ttagagatag tgccccctt gtggtcggta tacaggtggt gcatggctgt cgtcagctcg
tgtcgtgaga tgttgggta agtcccgca cgagcgcaac ccttgtcctg tgttgccagc atgcccttcg gggatgagg
gactcacagg agaccgccg ggtcaactcg gaggaagggtg gggacgacgt caagtcatca tgccccctat gtcttgggt
gcacacgtgc tacaatggcc ggtacaatga gctgcgatac cgtgaggtgg agcgaatctc aaaaagccgg tctcagttcg
gattggggtc tgcaactcga cccatgaag tcggagtcgc tagtaatcgc agatcagcat tgctgcgggt aatacgttcc
cgggccttgt acacaccgcc cgtcacgta cgaaagtcgg taacaccgca agccgggtggc ccaacccttg tggagggagc
tgtcgaaggt gggactggcg attgggacga agtcgtaaca aggtagccgt accggaaggt gcggctggat

Cepa SC7

aacagagttt gatcctggct caggacgaac gctggcggcg tgcttaacac atgcaagtcg aacgatgaag cccttcgggg
tggattagtg gcgaacgggt gagtaacacg tgggcaatct gcccttact ctgggacaag ccctggaaac ggggtcta
accggatacg actgcggaag gcatctccg tgggtgaaag ctccggcggt gaaggatgag cccgcggcct atcagcttgt
tgggtgggta atggcctacc aaggcgacga cgggtagccg gcctgagagg gcgaccggcc aactggggac tgagacacgg
cccagactcc tacgggaggc agcagtgggg aatattgcac aatgggcgaa agcctgatgc agcgacgcc cgtgagggat

gacggccttc ggggtgtaaa cctcttcag caggaagaa gcgaaagtga cggtagctgc agaagaagcg ccggctaact
acgtgccagc agccgcggta atacgtaggg cgcaagcgtt gtccggaatt attgggcgta aagagctcgt aggcggcttg
tcacgtcggg tgtgaaagcc cgaggcttaa cctcgggtct gcattcgata cgggctagct agagtgtggt aggggagatc
ggaattcctg gtgtagcggg gaaatgcgca gatacagga ggaacaccgg tggcgaaggc ggatctctgg gccattactg
acgtgagga gcgaaagcgt ggggagcgaa caggattaga taccctggta gtccacgccg taaacgttgg gaactaggtg
ttggcgacat tccacgtcgt cgggtccgca gtaacgcat taagtcccc gcctggggag tacggccgca aggctaaaac
tcaaaggaat tgacgggggc ccgcacaagc ggcggagcat gtggcttaac tcgacgcaac gcgaagaacc ttaccaagcc
ttgacatata ccgaaagca ttagagatag tgccccctt gtggtcggta tacaggtggt gcatggctgt cgtcagctcg
tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgca cgagcgcaac ccttgtcctg tgttgccagc atgcccttcg gggatgagg
gactcacagg agaccgccgg ggtcaactcg gaggaagggtg gggacgacgt caagtcacga tccccctat gtcttgggct
gcacacgtgc tacaatggcc ggtacaatga gctgcgatac cgtgaggtgg agcgaatctc aaaaagccgg tctcagttcg
gattggggtc tgcaactcga cccatgaag tcggagtcgc tagtaatcgc agatcagcat tgctgcgggtg aatacgttc
cgggccttgt acacaccgcc cgtcacgta cgaaagtcgg taacaccgga agccgggtggc ccaacccttg tggagggagc
tgtcgaaggt gggactggcg attgggacga agtcgtaaca aggtagccgt accggaaggt gcggctggat

Cepa SC11

gtttgacct ggctcagaac gaacgctggc ggcatgccta atacatgcaa gtcgaacgag atcttcggat ctagtggcgc
acgggtgcgt aacgcgtggg aatctgcctt tgggttcgga ataactctg gaaacggaag ctaataccgg atgatgacgt
aagccaaag atttatgcc caaggatgag cccgcgtagg attagctagt tgggtgggta aaggcccacc aaggcgacga
tccttagctg gtctgagagg atgatcagcc aactgggac tgagacacgg ccagactcc tacgggaggc agcagtaggg
aatattggac aatgggcgaa agcctgatcc agcaatgccg cgtgagtgat gaaggcctta ggggtgtaaa gctctttac
ccgggatgat aatgacagta ccgggagaat aagctccggc taactccgtg ccagcagccg cgtaatacag gagggagcta
gcgttgttcg gaattactgg gcgtaaagcg cacgtaggcg gctattcaag tcagaggtga aagccggggg ctcaacccc
gaactgcctt tgaactaga tagcttgaat ccaggagagg tgagtggaat tccgagtga gaggtgaaat tcgtagatat
tcggaagaac accagtggcg aaggcggctc actggactgg tattgacgct gaggtgcgaa agcgtgggga gcaaacagga
ttagataccc tggtagtcca cgccgtaaac gatgataact agctgtcagg gcacatggtg ttttgggtggc gcagetaacg cattaagtta
tccgcctggg gactacggtc gcaagattaa aactcaaagg aattgacggg ggctgcaca agcgggtggag catgtggtt
aatcgaagc aacgcgcaga acctaccaa cgtttgacat ccctatcggg gatcgtggag acacttctct tcagttcggc
tggataggtg acaggtgctg catggctgct gtcagctcgt gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgaac gagcgcaacc
ctgccttta gttccagca tttagtggg tactctaaag gaaccgccg tgataagccg gaggaagggtg gggatgacgt
caagctccta tggcccttac gcgttgggt acacacgtgc tacaatggcg actacagtgg gcagccacct cgcgagagg

agctaatec caaaagtcg ctcagttcgg atcgttctct gcaactcgag agcgtgaagg cggaaatcgt agtaatcgcg
gatcagcatg ccgcgggtga atacgttccc aggccttgta cacaccgccc gtcacacat gggagttgga ttcactcgaa
ggcgttgagc taaccgtaag gaggcaggcg accacagtgg gtttagcgac tgggggtaag tcgtaacaag gtagccgtag
gggaacctgc ggctggatca cctcctt

Cepa SC12

aacagagttt tgatcctggc tcaggatgaa cgctggcggc gtgcctaata catgcaagtc gagcgaactg attagaagct
tgcttctatg acgttagcgg cggacgggtg agtaacacgt gggcaacctg cctgtaagac tgggataact tcgggaaacc
gaagctaata ccgtagtaga tcttctcctt catgggagat gattgaaaga tggtttcggc taccactac agatgggccc gcggtgcatt
agctagttgg tgaggtaacg gtcaccaag gcaacgatgc atagccgacc tgagagggtg atcggccaca ctgggactga
gacacggccc agactcctac gggaggcagc agtaggggat cttccgcaat ggacgaaagt ctgacggagc aacgcccgct
gagtgatgaa ggcttccggg tcgtaaaaact ctgttgtag ggaagaaca gtacgagagt aactgctcgt acctgacgg
tacctaacca gaaagccacg gctaactacg tgccagcagc cgcgtaata cgtaggtggc aagcgttatc cgggaattatt
gggcgtaaag cgcgcgcagg cggtttctta agtctgatgt gaaagcccac ggctcaaccg tggagggtca ttgaaactg
gggaactga gtgcagaaga gaaaagcggg attccacgtg tagcgggtgaa atgcgtagag atgtggagga acaccagtgg
cgaaggcggc ttttggctt gtaactgacg ctgaggcgcg aaagcgtggg gagcaaacag gattagatac cctggtagtc
cacgccgtaa acgatgagtg ctaagtgtta gagggtttcc gccctttagt gctgcagcta acgattaag cactccgect
ggggagtacg gtcgcaagac tgaactcaa aggaattgac gggggcccgc acaagcgggt gagcatgtgg ttaattcga
agcaacgcga agaacctac caggtcttga catctctga caactctaga gatagagcgt tcccctcgg gggacagagt
gacaggtggt gcatggtgt cgctagctcg tctcgtgaga tgttgggtta agtcccgaac cgagcgaac ccttgatctt
agttgccagc atttagttgg gcaacttaag gtgactgccg gtgacaaacc ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatcctc
atgcccctta tgacctgggc tacacacgtg ctacaatgga tggtaaaaag ggctgcaaga ccgcgaggtc aagccaatcc
cataaaacca ttctcagtc ggattgtagg ctgcaactcg cctacatgaa gctggaatcg ctagtaatcg cggatcagca
tgccgcggtt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc acgagagttt gtaacaccgc aagtcggtgg
agtaaccgta aggagctagc cgctaaggt gggacagatg attgggggtga agtcgtaaca aggtagccgt atcgg

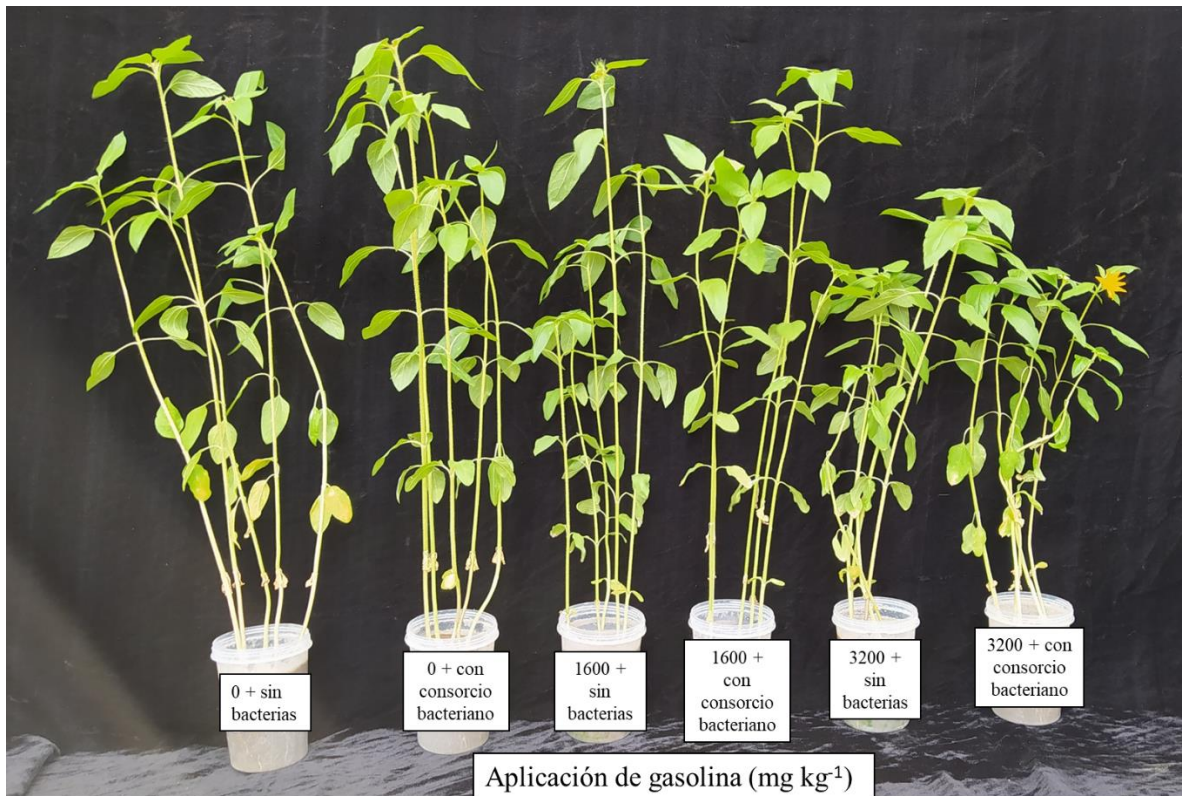
Cepa SC15

caacagagtt tgatcctggc tcagattgaa cgctggcggc aggcctaaca catgcaagtc gagcggtaga gagaagcttg
cttctcttga gagcggcgga cgggtgagta atgcctagga atctgcctgg tagtggggga taacgttcgg aaacggacgc
taataaccgca tacgtcctac gggagaaaagc aggggacctt cgggccttgc gctatcagat gagcctaggt cggattagct

agttggtgag gtaatggctc accaaggcga cgatccgtaa ctggtctgag aggatgatca gtcacactgg aactgagaca
cgggccagac tcctacggga ggcagcagtg gggaaatattg gacaatgggc gaaagcctga tccagccatg ccgcgtgtgt
gaagaaggtc ttcgattgt aaagcacttt aagttgggag gaagggcagt tgcctaatac gtaactgttt tgacgttacc gacagaataa
gcaccggcta actctgtgcc agcagccgcg gtaatacaga gggtgcaagc gttaatcgga attactgggc gtaaagcgcg
cgtaggtggt ttgtaagtt ggatgtgaaa tccccgggct caacctggga actgcattca aaactgactg actagagtat
ggtagagggt ggtggaattt cctgtgtagc ggtgaaatgc gtagatatag gaaggaacac cagtggcgaa ggcgaccacc
tggactgata ctgacactga ggtgcgaaag cgtgggggagc aaacaggatt agataccctg gtagtccacg ccgtaaacga
tgtcaactag ccgttgaag ccttgagctt ttagtggcgc agctaacgca ttaagttgac cgctgggga gtacggccgc
aaggtaaaa ctcaaatgaa ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca tgtggttaa ttcgaagcaa cgcgaagaac
cttaccaggc cttgacatcc aatgaacttt ccagagatgg attggtgcct tcgggaacat tgagacaggt gctgcatggc
tgtcgtcagc tcgtgctgtg agatgttggg ttaagtcccg taacgagcgc aaccctgtc cttagttacc agcacgttat ggtgggact
ctaaggagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga tgactcaag tcatcatggc ccttacggcc tgggctacac
acgtgctaca atggtcggta caaagggttg ccaagccgcg aggtggagct aatcccataa aaccgatcgt agtccggatc
gcagtctgca actcgactgc gtgaagtcgg aatcgctagt aatcggaat cagaatgtcg cggtgaatac gttcccgggc
ctgttacaca ccgcccgtca caccatggga gtgggttga ccagaagtag ctagtetaac cttcgggagg acggttacca
cgggtgtgatt catgactggg gtgaagtcgt aacaaggtag ccgtagggga acctgcggct ggatcacctc ctt

Apéndice E.

Aspetto del crecimiento de las plantas *Helianthus annuus*, con o sin la inoculación con microorganismos benéficos, crecidas en un suelo artificialmente contaminado con hidrocarburos de petróleo (gasolina), a los 60 días después de la siembra en condiciones de invernadero.



Apéndice F.

Cromatogramas obtenidos del análisis de las muestras de suelo mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. A) 1,600 + plantas + sin bacterias, B) 1,600 + plantas + con consorcio bacteriano, C) 1,600 + sin bacterias + sin planta, D) 3,200 + sin bacterias + sin planta, E) 3,200 + plantas + sin bacterias, F) 3,200 + plantas + con consorcio bacteriano.

