



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

**ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LA RIZOSFERA DE *Leersia hexandra* Sw. EN
UNA FINCA DEL TRÓPICO HÚMEDO CONTAMINADA CON PETRÓLEO**

NIMIDE RODRÍGUEZ RODRÍGUEZ

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: **Actividad biológica en la rizosfera de *Leersia hexandra* Sw. en una finca del trópico húmedo contaminada con petróleo**, realizada por la alumna **Nimide Rodríguez Rodríguez** 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

PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA DE TESIS:



DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

ASESOR:



DR. SERGIO SALGADO GARCIA

ASESOR:



DR. JUAN JOSÉ ALMARAZ SUAREZ

H. Cárdenas, Tabasco, México. 29 de Abril del 2016.

ACTIVIDAD BIOLÓGICA EN LA RIZOSFERA DE *Leersia hexandra*, Sw. EN UNA FINCA DEL TRÓPICO HÚMEDO CONTAMINADA CON PETRÓLEO

Nimide Rodríguez Rodríguez

Colegio de Postgraduados, 2016

El estudio de la actividad biológica en la rizosfera de *Leersia hexandra*, en una finca contaminada con petróleo intemperizado, se realizó para determinar el potencial del sistema rizosférico y las bacterias promotoras del crecimiento vegetal en la recuperación de un Gleysol impactado por la industria petrolera. Se evaluó la distribución espacial de los hidrocarburos totales del petróleo (HTPs) en el Gleysol, la biomasa aérea, densidad de raíces y el efecto rizosfera de *L. hexandra*. La distribución espacial de los HTPs (mg kg^{-1}) en Gleysol se realizó en 14 puntos ubicados cada 30 m de noroeste a sureste en un predio de 2.3 ha, se colectaron muestras de rizosfera en la capa 1 (0-15), capa 2 (15-30) y capa 3 (30-70 cm de profundidad). La distribución espacial de los HTPs (mg kg^{-1}) permitió ubicar en la finca cuatro zonas (Z) de estudio, Z1: 1393, Z2: 3455, Z3: 5574 y Z4: 7544 mg de HTPs. En cada Z se colectaron ocho repeticiones de biomasa aérea de *L. hexandra* (m^2), cinco de suelo rizosférico y no rizosférico para bacterias heterótrofas, fijadoras de N de vida libre, solubilizadoras de fosfato (UFC g^{-1}), para el bioensayo de CO_2 ($\text{mgC-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ suelo seco d}^{-1}$) y C de la biomasa microbiana, establecido en condiciones *in vitro* durante 63 días. La distribución espacial de los HTPs indican mayor acumulación en capas subyacentes (capas 2 y 3) y menor en la rizosfera de *L. hexandra* y en la capa 1. La mayor producción de biomasa aérea fue en la zona 2, el petróleo intemperizado indujo hormesis en el pasto, pero en dosis \geq a 5574 lo inhibió. En las cuatro zonas el suelo rizosférico, respecto al suelo no rizosférico, estimuló la población de bacterias heterótrofas, fijadoras de N y solubilizadoras de fosfato, y la respiración microbiana a los días 14, 21, 42 y 63 después de la incubación. El petróleo intemperizado afectó la liberación de CO_2 , indujo mayor C-biomasa, y estimuló la población de los tres grupos de bacterias en suelo rizosférico, lo que sugiere que *L. hexandra* contiene un sistema rizosférico con potencial para bioestimular la actividad microbiana benéfica para la finca respecto al suelo no rizosférico en Gleysol con $\leq 7 552 \text{ mg kg}^{-1}$ de HTPs. Se recomienda el uso de *L. hexandra* para recuperar la sustentabilidad de Gleysoles degradados por el petróleo intemperizado de fincas del trópico húmedo mexicano aledañas a infraestructuras petroleras.

Palabras claves: bacterias fijadoras de N, solubilizadoras de P, respiración microbiana, rizosfera, petróleo intemperizado.

BIOLOGICAL ACTIVITY IN THE RHIZOSPHERE OF *Leersia hexandra*, Sw. IN A FARM OF THE HUMID TROPICS CONTAMINATED WITH OIL.

Nimide Rodríguez Rodríguez

Colegio de Postgraduados, 2016

The study of the biological activity in the rhizosphere of *Leersia hexandra* in a finca weathered oil contaminated with oil, was conducted to determine the potential of the system and the rizospheric bacteria and plant growth promoting bacteria in the recovery of a Gleysol impacted by the oil industry. Assessed the spatial distribution of the total petroleum hydrocarbons (TPH) in the Gleysol, the aerial biomass, density of roots and the rhizosphere effect of *L. hexandra*. The spatial distribution of the TPH (mg kg^{-1}) in Gleysol was conducted in 14 points located every 37.5 m from north-west to south-east in a land of 2.3 hectares, we collected samples of rhizosphere, layer 1 (0-15), Layer 2 (15-30) and layer 3 (30-70 cm). The spatial distribution of the TPH (mg kg^{-1}) allowed to locate in the finca four areas (Z) of study. Z1: 1393, Z2: 3455, Z3: 5574 and Z4: 7544. In each Z was collected eight replicas of air material *L. hexandra* (m^2), five of soil rizospheric and not rizospheric for heterotrophic bacteria, fastener N of life free, solubilizer P (CFU g^{-1}), and for the bioassay of CO_2 ($\text{mgC-CO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ dry soil d}^{-1}$) and C. microbial biomass, established under in vitro conditions by 63 days. The spatial distribution of the TPH in the soil of the four areas indicate a greater accumulation in underlying layers (layer 2 and 3) and lower in the rhizosphere of *L. hexandra* and layer 1. The zone 2 produced the largest aerial biomass, oil weathered oil induces hormesis in the grass, but at doses \geq to 5574 what inhibits. In the four areas the soil rizospheric of *L. hexandra* relative to the ground not rizospheric stimulated the population of heterotrophic bacteria, fastener of N and P solubilizer and microbial respiration to day 14, 21, 42 and 63 after incubation. The oil weathered oil negatively affects the release of CO_2 , induces greater C-biomass, and stimulates in greater magnitude the population of the three groups of bacteria in soil rizospheric, with regard to the ground not rizospheric, suggesting that *L. hexandra* contains a system with potential for bioestimate rizospheric microbial activity beneficial for the farm from the ground not rizospheric in Gleysol with $\leq 7\ 552 \text{ mg kg}^{-1}$ of TPH. It is recommended the use of *L. hexandra* to retrieve the sustainability of Gleysol degraded by the oil weathered oil of estates in the humid tropics of Mexico surrounding oil infrastructure.

Key words: bacteria fastener N, solubilizer the P, microbial respiration, rhizosphere of *L. hexandra*, oil weathered oil.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de postgrado.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por haberme permitido realizar mis estudios de Maestría y por el financiamiento con cargo a las cuentas 40018 y 40019, de apoyo para investigación científica que el Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados, asignó a profesores y estudiantes en los años 2014 y 2015.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, Responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, por compartir sus conocimientos conmigo, por la confianza, la paciencia y dedicación brindada, dirigiendo y guiando mi trabajo de investigación.

Al Dr. Juan José Almaráz Suárez, Profesor Investigador del Campus Montecillo, por sus aportaciones y sugerencias, así como por la atención brindada durante mi estancia académica en Montecillos.

Al Dr. Sergio Salgado García por sus sugerencias en la realización de este documento de tesis.

Al M. C. Antonio Trujillo Narcía por su apoyo, dirección y sugerencias en los muestreos en campo.

A la señora Darvelia Flores Romero y su familia por abrir las puertas de su casa y permitir realizar la colecta de muestras de suelo y del pasto en su parcela.

A los estudiantes de Servicio Social asignados al Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental que me apoyaron en la fase de laboratorio: Ariana, Noé Izack, Azalea, Marcela, Stefany, Yani y Liliana. Gracias por su amistad.

A mis compañeros de generación Génesis, Beatriz, Socorro, Leticia, Félix, Rebeca, en especial a Alejandro y Magín que me apoyaron muchísimo en esta etapa, gracias “amigos”.

DEDICATORIA

A mí amado Dios que me ha permitido lograr esta meta. Sin ti nada soy.

Al amor de vida. Mi hijo Alejandrino, el esfuerzo también fue tuyo.

A mi madre María Reyes y hermanas Abi, Ady, Noa gracias por cuidar de mi hijo;
a mis hermanos Timoteo, Mateo y Zet, los quiero mucho.

Y hasta el cielo papá (Timoteo Rodríguez †) mi ejemplo de lucha y perseverancia.
Y mi flaquita hermosa (Maday †) hermanita siempre estás en mi corazón.

CONTENIDO

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Definición y características del humedal.....	4
2.2. El humedal con explotación agrícola	4
2.3. Definición y composición del suelo	5
2.4. Función del suelo en el ecosistema.....	6
2.5. La diversidad de organismos en el suelo.....	7
2.5.1. La acción de los organismos.....	9
2.5.2. Fuerza de energía y carbono	10
2.5.3. Actividad microbiana en el suelo.....	11
2.5.4. Número de individuos	11
2.5.5. Biomasa microbiana	12
2.5.7. Actividad metabólica	12
2.5.8. La rizosfera y sus efectos	13
2.6. Microflora benéfica para las plantas	15
2.6.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal.....	15
2.6.2. Bacterias fijadoras de N de vida libre.....	16
2.6.3. Solubilizadoras de fosfato.....	17
2.7. El petróleo y su interacción con los organismos del suelo	17
2.7.1. Características y composición química del petróleo crudo intemperizado.....	18
2.7.1.1. Hidrocarburos saturados.....	19
2.7.1.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos	19
2.7.1.3. Resinas.....	20
2.7.1.4. Asfáltenos	20
2.7.3. Efecto del petróleo en microflora del suelo	21
CAPÍTULO III. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo general	24
3.1.1. Objetivos particulares.....	24

CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS.....	25
4.1. Hipótesis general.....	25
4.1.1. Hipótesis particulares	25
CAPÍTULO V. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Ubicación geográfica y características climáticas de la finca	26
5.1.1. Características del suelo.....	26
5.1.2. Uso actual del suelo de la finca.....	27
5.1.3. Características del pasto <i>Leersia hexandra</i>	28
5.1.4. Infraestructura petrolera.....	29
5.1.5. Vertido del petróleo en la finca.....	29
5.1.6. Ubicación del área y diseño de muestreo.....	30
5.2. Muestreo del suelo rizosférico y suelo subsuperficial	30
5.2.1. Muestreo por puntos en la finca	30
5.2.2. Muestreo por zona (Z).....	31
5.3. Análisis de hidrocarburos totales del petróleo	32
5.4. Delimitación de zonas en el sitio	33
5.4.1. Características de los suelos en las zonas.....	33
5.5. Variables evaluadas.....	35
5.5.1. Materia seca aérea.....	35
5.5.2. Densidad de raíz	35
5.5.3. Actividad biológica.....	36
5.5.3.1. Población de bacterias en suelo rizosférico y no rizosférico.....	36
5.5.3.3. Carbono de la biomasa microbiana.....	39
5.6. Análisis estadístico.....	40
CAPÍTULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
6.1. Distribución de los hidrocarburos totales del petróleo en Gleysol	41
6.1.1. Contenido de hidrocarburos totales del petróleo en suelo y rizosfera de <i>Leersia hexandra</i> por zonas	45
6.2. Materia seca aérea y densidad de raíces de <i>Leersia hexandra</i> en las zonas de la finca	46
6.2.1. Distribución de la materia seca aérea de <i>Leersia hexandra</i> en las zonas de la finca.....	46
6.3. Distribución de raíces de <i>Leersia hexandra</i> en las zonas de la finca	49

6.4. Bacterias y hongos en suelo rizosférico y no rizosférico en suelo con petróleo intemperizado.....	51
6.4.1. Bacterias heterótrofas y promotoras del crecimiento vegetal en suelo y rizosfera por zona	51
6.4.2. Efecto del petróleo en bacterias.....	52
6.4.3. Población de hongos heterótrofos en suelo rizosférico y no rizosférico por zona	54
6.4.4. Efecto del petróleo intemperizado en la población de hongos heterótrofos en suelo rizosférico y no rizosférico	55
6.5. Respiración microbiana	57
6.5.1. Efecto rizosfera en la respiración microbiana	58
6.5.2. Efecto del petróleo en la respiración microbiana	60
6.6. Carbono de la biomasa microbiana en suelo rizosfera y suelo no rizosférico de <i>Leersia hexandra</i>	62
6.6.1. Carbono de la biomasa por zonas en la finca	62
6.6.2. Efecto del petróleo en el C-biomasa	64
CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES	67
7.1. Conclusiones generales	67
7.1.1. Conclusiones particulares	67
CAPÍTULO VIII. LITERATURA CITADA	69
CAPÍTULO IX.....	93

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación general y tamaño de algunos grupos importantes de organismos del suelo.....	8
Cuadro 2.	Efecto de diferentes dosis de petróleo en el crecimiento y producción de planta.....	21
Cuadro 3.	Efecto del petróleo en bacterias promotoras de crecimiento vegetal.....	23
Cuadro 4.	Características físico y químicas de los suelos de las zonas contaminados y no contaminados con petróleo intemperizado	34
Cuadro 5.	Concentración de hidrocarburos totales del petróleo por puntos y espacios de muestreo en cada zona de la finca.....	42
Cuadro 6.	Efecto de la rizosfera en la acumulación de hidrocarburos totales del petróleo por zonas.....	46
Cuadro 7.	Población de bacterias en suelo rizosférico de <i>Leersia hexandra</i> y suelo no rizosférico en cuatro zonas sin y con petróleo.....	51
Cuadro 8.	Incremento del CO ₂ en tres tiempos por efecto de la rizosfera de <i>Leersia hexandra</i> en suelo sin y contaminados con petróleo.....	59
Cuadro 9.	Efecto rizosfera en la acumulación del carbono de la biomasa microbiana.....	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Composición del suelo y distribución de las colonias bacterianas.....	6
Figura 2.	Ciclo del carbono.....	10
Figura 3.	Esquematización de los componentes de la rizosfera.....	14
Figura 4.	Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado.....	19
Figura 5.	Localización de la finca Mi Ranchito, puntos de muestreo (P) y área por zonas, en el ejido José Narciso Roviroza, Huimanguillo, Tabasco.....	27
Figura 6.	Morfología de <i>Leersia hexandra</i>	28
Figura 7.	Infraestructura petrolera dentro de la finca.....	29
Figura 8.	Ubicación de la finca y zonas de muestreo en el ejido José Narciso Roviroza, Huimanguillo, Tabasco.....	31
Figura 9.	Muestra fresca de suelo. Pesado de muestra suelo, muestra preparada para extracción, extracción de los hidrocarburos totales del petróleo en quipo Soxhlet	33
Figura 10.	Horno de secado de biomasa foliar de <i>Leersia hexandra</i> , a 75°C... ..	35
Figura 11.	Determinación de la densidad de raíces en un cm ²	36
Figura 12.	Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en suelo rizosférico y no rizosférico.....	37
Figura 13.	Respiración microbiana de suelo rizosférico y no rizosférico. Peso de muestra, unidad experimental, incubación y titulación.....	39
Figura 14.	Distribución vertical de hidrocarburos totales del petróleo en el Gleysol de cuatro zonas de la finca.....	43
Figura 15.	Variación de la materia seca foliar de <i>Leersia hexandra</i> por zonas en la finca.....	47
Figura 16.	Cantidad de raíces finas delgadas y gruesas de <i>Leersia hexandra</i> según los contenidos de petróleo en las zonas de la finca de La	49

	Venta, Tabasco.....	
Figura 17.	Población de bacterias heterótrofas y promotoras del crecimiento vegetal en suelo sin contaminación y contaminado con petróleo.....	53
Figura 18.	Efecto de los hidrocarburos del petróleo en la población de hongos heterótrofos en rizosfera y suelo según las zonas en la finca.....	55
Figura 19.	Efecto del petróleo en la población de hongos heterótrofos.....	56
Figura 20.	Liberación de CO ₂ de la respiración microbiana en suelo rizosférico y suelo no rizosférico de <i>Leersia hexandra</i> en cuatro zonas de un predio con petróleo intemperizado en La Venta, Tabasco.....	58
Figura 21.	Respiración microbiana en rizosfera (A) y suelo (B) sin y con petróleo en cinco tiempos	61
Figura 22.	Carbono de la biomasa microbiana en suelos rizosférico y no rizosférico en cinco tiempo después de la incubación.....	63
Figura 23.	Efecto del petróleo en el carbono de la biomasa microbiana en zona no contaminada y zona contaminada con petróleo.....	65

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La degradación de la tierra está relacionada con el abuso de los recursos naturales del suelo, subsuelo, agua y vegetación, consecuencia del desarrollo no sustentable de la sociedad (Brevik *et al.*, 2015). La extracción y transformación del petróleo crudo tiene accidentes que contaminan el suelo con hidrocarburo, el cual se acumula en capas superficiales, migra al subsuelo e induce cambios en las propiedades físicas, químicas y biológicas basales por el incremento de la concentración del contaminante (Muratova *et al.*, 2008; Mohsenzade *et al.*, 2009; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). La degradación de los recursos bióticos del suelo por la presencia de petróleo es por el potencial tóxico, cancerígeno y mutagénico inherente a los hidrocarburos (Chauhan *et al.*, 2008). El daño a los organismos es fisiológico porque limita o inhibe los mecanismos de defensa al estrés, además el petróleo induce daños irreversibles y los organismos mueren (Tadeo, 2000). Algunos organismos en ambientes contaminados activan respuestas de adaptación mediante síntesis de enzimas y la activación de mecanismos de defensa antioxidante que confiere resistencia y adaptación a la exposición al recurso degradado (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Olalekan, 2014).

La exposición de la planta, la microflora del suelo y las interacciones rizosféricas a diferentes tipos y dosis de petróleo causan diferentes efectos. Algunos daños son la disminución de la germinación de la semilla y del crecimiento vegetativo, alteración de la tasa de respiración microbiana, disminución de la biodiversidad, inhibición de la densidad de bacterias y la modificación de la morfología celular (Smith *et al.*, 2006; Omosun *et al.*, 2009; de Farias *et al.*, 2009; Ogbo, 2009; Njoku *et al.*, 2009; Saadoun y Al-Ghazawi, 2010; Basumatary *et al.*, 2012). En la rizosfera se limita el crecimiento radical, la circulación de oxígeno y la densidad de

bacterias promotoras del crecimiento vegetal. La rizosfera es importante para los procesos de recuperación de suelos degradados, en ella se produce mayor respiración basal, aumenta la densidad de la microflora y microfauna que en el suelo a distancia (Brady y Weil, 2008; García y Rivero, 2008). Las causas que limitan el crecimiento y desarrollo de la planta, la densidad y diversidad microbiana por la exposición al petróleo son la falta de disponibilidad de agua, carbono, energía y nutrimentos en la solución del suelo, debido a que el aceite crudo obstruye los poros y ocupa los espacios porosos (Adenipekun *et al.*, 2009; Omosun *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011).

Los pastos han demostrado tolerancia al estrés y se utilizan en procesos de recuperación de suelos degradados por el petróleo (Merkl *et al.*, 2005; Kechavarzi *et al.*, 2007; Maldonado-Chávez *et al.*, 2010), este potencial es atribuido a su extenso y fibroso sistema radical, que le confiere mayor área de superficie de la raíz que otras especies y puede penetrar en el suelo a una profundidad de hasta tres metros (Orozco-Soto *et al.*, 2014), pero además a la inducción de moléculas antioxidantes en el sistema radical que confiere resistencia al estrés generado por los contaminantes (Olalekan, 2014).

Los microorganismos hongos heterótrofos y las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (RPCV) establecidos en el sistema radical de los pastos *Echinochloa polystachya* y *Brachiaria mutica* estimulan la degradación del petróleo en el suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Rivera-Cruz *et al.*, 2004; Rivera-Cruz, 2011a; Vásquez-Luna *et al.*, 2011). Los microorganismos producen y liberan exoenzimas (monooxigenasa y dioxigenasa) que participan en procesos de óxido-reducción de los hidrocarburos del petróleo degradándolos a compuestos menos tóxicos (Camacho-Morales *et al.*, 2010). La importancia de las RPCV en suelos degradados es porque fijan N atmosférico, solubilizan nutrimentos (fósforo y potasio) y sintetizan fitohormonas, atributos que en conjunto contribuyen al mejoramiento de la fertilidad del suelo, incremento de la diversidad biológica

(Vessey, 2003; Brady y Weil, 2008) y mejoramiento de los servicios ambientales de provisión.

El pasto *Leersia hexandra* Swartz es una especie forrajera localizada en regiones tropicales húmedas, tolera la contaminación con petróleo y metales pesados (Liu *et al.*, 2011; Rivera-Cruz, 2011b; Liu *et al.*, 2015). El pasto invade y estabiliza humedales por la acumulación de abundante follaje y raíces adventicias dentro de la lámina de agua. Forma follaje suave, decumbente, de tallos flexibles con hojas angostas y pequeñas (Rodríguez-Carrasquel, 1983; Vegetti, 2002). La actividad microbiana, las bacterias heterótrofas y RPCV asociados al suelo rizosférico de *L. hexandra* en Gleysol degradado por el petróleo son importantes estudiarlos debido a que en el ecosistema contribuyen al equilibrio nutrimental, la atenuación de los hidrocarburos y la sustentabilidad de la finca con uso agrícola y pecuario.

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Definición y características del humedal

Los humedales son considerados el “eslabón” entre sistemas que no son completamente acuáticos ni terrestres. Son hábitats interiores costeros y marinos de un continente. Es definido como “extensiones de marismas, pantanos y turberas, o superficies cubiertas de aguas, sean éstas de régimen natural o artificial, permanentes o temporales, estancadas o corrientes, dulces, salobres o saladas, que permanecen inundados la mayor parte del año, incluidas las extensiones de agua marina cuya profundidad en marea baja no exceda de seis metros” (CONABIO, 2009).

El humedal de agua poco profunda hasta 1 a 2 metros se caracteriza porque el suelo predominante es Gleysol e Histosol con baja permeabilidad. La vegetación generalmente son hidrófitas estrictas sumergidas, emergentes y flotantes, subacuáticas con representantes herbáceas o leñosas en ambos casos (Caso *et al.*, 2003). Este tipo de vegetación incluye manglares, bosques y selvas de galería, vegetación del petén, popal, palmar inundable y sabana (INEGI-CONABIO-INE, 2005), tule (Juncaceae), tulle (Cyperaceae), ninfas (Nymphaeaceae) y pastos (Poaceae) (Estrada *et al.*, 2013; Rivera-Cruz, 2011a).

2.2. El humedal con explotación agrícola

Los humedales de sabana tienen lámina de agua poco profunda (10 a 150 cm), son usados principalmente para la ganadería bovina (INEGI, 2004). Al respecto, Palma-López *et al.*, (2007) indican que la vegetación hidrófila de selva baja inundable y de pastizales se utiliza como forraje bovino, principalmente bajo sistema de explotación extensiva. Los pastos dominantes en sitios inundables se

distinguen por su adaptación a la fluctuación del agua en el humedal. Los pastos tienen un sistema de raíz que permite el aprovechamiento del oxígeno derivado, ya sea de la solución externa o a través de la aerénquima cortical. Por lo tanto, es un componente de la tolerancia al anegamiento de las raíces del suelo (Jimenez, 2013). Las especies con esta adaptación son *Echinochloa polystachya* y *Brachiaria mutica* (Baruch, 1994), *Cynodon dactylon* (Furness y Breen, 1985), *Paspalum fasciculatum* (Rivera-Cruz, 2011a); *Panicum versicolor*, *Paspalum notatum*, *Paspalum conjugatum*, *Hymenachne amplexicaulis* y *Axonopus* sp (Peñuela *et al.*, 2011) y *Leersia hexandra* (Vegetti, 2002).

El tipo de raíz dominante de los pastos son sistemas estoloníferos perenne o rizomatosa: raíces primarias gruesas (entre 0.5 y 1 mm de diámetro) y largas de color claro. La raíz secundaria posee ramificaciones pequeñas, finas y pueden sobrepasar los 10 cm de profundidad. El calibre del rizoma se encuentra generalmente en los 1.5 y 2.5 mm de diámetro (Hernández *et al.*, 1992).

2.3. Definición y composición del suelo

El suelo es un cuerpo natural, externo a la roca madre que soporta organismos vivos, se caracteriza por horizontes y capas que se distinguen del material inicial por el resultado de las adiciones, pérdidas, transferencias y transformaciones de energía y materia, y por la habilidad de soportar vegetación donde se dan las condiciones necesarias para el desarrollo de las plantas (USDA-NRCS, 2014). Su origen es por cinco factores de formación: Material parental (pasivo), clima (activo), organismos o biosfera (activo), relieve (pasivo) y tiempo (neutro) (Ortiz, 2010). El suelo se ha considerado como una mezcla de material mineral, materia orgánica, agua, aire (USDA-NRCS, 2014). La composición de un suelo de textura franca y con condiciones ideales para el desarrollo de plantas puede ser aproximadamente de la siguiente manera: materia mineral 45%, materia orgánica 5%, agua 25% y aire 25% (Ortiz, 2010). La Figura 1 muestra la distribución de microcolonias de microorganismos adheridas a los componentes del suelo.

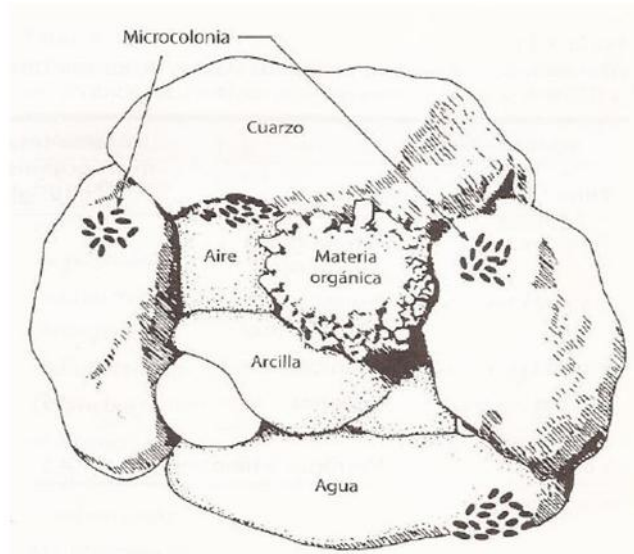


Figura 1. Composición del suelo y distribución de las colonias bacterianas (Atlas y Bartha, 2002).

2.4. Función del suelo en el ecosistema

El suelo es el sistema clave en el funcionamiento de los ecosistemas terrestres. En él se llevan a cabo dos procesos vitales: la descomposición y el flujo de nutrientes. Estos procesos son controlados principalmente por la actividad biológica, la cual depende en última instancia de la temperatura y la humedad. (Swift *et al.*, 1979). El suelo realiza cinco funciones: 1) soporta el crecimiento de las plantas superiores, provee un medio para las raíces de las plantas y suplementa nutrimentos esenciales para la planta. Las propiedades del suelo pueden llegar a determinar la naturaleza de la vegetación e indirectamente el número y tipo de animales que la vegetación puede soportar, 2) las propiedades del suelo son el principal factor que controla el sistema hidrológico del agua, 3) el suelo recicla el sistema. Cuando el suelo recibe desechos de cuerpos muertos de animales y vegetales estos son descompuestos y los nutrimentos liberados

quedan disponibles, 4) es un hábitat para organismos desde pequeños reptiles, insectos y diversos microorganismos, y, 5) juega un papel importante en la ingeniería del medio, debido a que proporciona la base para casi todas las carreteras, aeropuertos y la casas habitación (Brady y Weil, 2008).

2.5. La diversidad de organismos en el suelo

Los organismos del suelo se dispersan por todas partes del suelo. Cada puñado de suelo probablemente contenga miles de millones de organismos, con representación de casi todos lo *phylum* de los seres vivos. En el Cuadro 1 se presenta una clasificación de los organismos con énfasis en la actividad realizada. El término fauna es usado generalmente para distinguir animales (incluyendo unicelulares protistas). La flora es un término usado para referir a las plantas (incluyendo a los unicelulares algas), así como también todos los microorganismos no animales (Brady y Weil, 2008).

La microflora y la macroflora son componentes biológicos del suelo, representados por organismos autotróficos y heterótrofos, con funciones específicas en el ciclo de materia y energía en el ecosistema. Por ejemplo, las raíces de las plantas y las algas representan a la flora del suelo, las cuales son productores primarios, que a través de la fotosíntesis con la energía del sol, convierten al CO₂ en carbohidratos disponibles para otros organismos. Entre los organismos que conforman la microflora están las algas, bacterias, hongos y levaduras que pueden descomponer casi cualquier sustancia natural (FAO, 2015).

Cuadro 1. Clasificación general y tamaño de algunos grupos importantes de organismos del suelo.

Grupos generales (tamaño en mm)	Grupo taxonómico	Ejemplos
Macrofauna (>2mm) Todo heterótrofo, largamente herbívoro y detritívoro.	Vertebrados Artrópodos Anélidos Moluscos	Topos, ratones, hormigas, escarabajos y sus larvas, ciempiés, gusanos, arañas, termitas, cochinillas, lombrices, caracoles, babosas.
Macroflora Gran parte autotrófica	Plantas vasculares Bryofitas	Raíces absorbentes, musgos
Mesofauna (0.1-2mm) Todo heterótrofo Gran parte de detritívoros Gran parte predadores	Artrópodos Anélidos	Ácaros, colémbolos, gusanos, ácaros y protura
Microfauna (<0.1 mm) Detritívoros, predadores, fungívoros, bacterívoros.	Nematodos, rotíferos, protozoarios y tardigrade.	Nematodos, rotíferos, amebas, ciliados, flagelados y osos de agua.
Microflora (<0.1 mm) Gran parte de autotróficos. Gran parte de heterótrofos	Plantas vasculares Algas Hongos	Pelos radicales, algas verdes, amarillas, diatomeas, levaduras, mohos, hongos, royas, setas.
Heterótrofos y autotróficos	Bacterias Cianobacterias Actinomiceto Arqueas	Aerobios, anaerobios azul-verdes algas, actinomicetos.

Fuente: Brady y Weil, 2008.

2.5.1. La acción de los organismos

Una de las funciones principales de la microfauna en el suelo es la descomposición de los recursos que entran al suelo y pasan por tres procesos durante su degradación: fragmentación, transformación enzimática (catabolismo) y lavado por agua (lixiviación). Los dos primeros son regulados por la actividad biológica, el tercero depende completamente de la precipitación. En este modelo el recurso entra al sistema y es fragmentado, transformado enzimáticamente y lavado en repetidas ocasiones. Por ejemplo, una hoja (r1) al ser fragmentada se transforma en un recurso diferente (r2), el cual puede después ser atacado por bacterias y hongos y transformarse en otro recurso diferente (r3), y así sucesivamente. Durante la transformación de esta hoja se producen cuatro productos: un nuevo recurso, CO₂, nutrientes en solución y nutrientes inmovilizados en los organismos, o en nuevos compuestos orgánicos complejos a lo cual se le denomina humus. Con el paso del tiempo, y dependiendo de las condiciones ambientales y de la biota presente en el suelo, este recurso se descompone totalmente y su carbono y nutrientes pasan a la atmósfera (CO₂ y CH₄), al reservorio de materia orgánica y nutrientes del suelo o al tejido de la biota edáfica (Swift *et al.*, 1979).

La macroflora y la microflora en el suelo es abundante porque las raíces primarias y pelos radicales secretan sustancia que atraen a los microorganismos, esto explica la especificidad de la rizosfera de la planta con ciertos microorganismos. Una gran parte del material fotosintetizado por la planta (20 a 50%) es secretado por las raíces en forma de exudados, polímeros solubles y lisados. De los elementos que constituyen la materia orgánica fuera del oxígeno y nitrógeno y otros elementos menores, la rizodeposición proporciona carbono orgánico en la rizosfera (Gobat *et al.*, 2004).

2.5.2. Fuerza de energía y carbono

El ciclo del carbono está estrechamente ligado al ciclo del oxígeno y depende tanto de la macrofauna, microfauna, macroflora y microflora. Los procesos químicos básicos del ciclo son la fotosíntesis, la respiración, la quema de combustibles fósiles y fenómenos naturales como las erupciones volcánicas, es por esto que el ciclo del carbono es el responsable de las emisiones de CO_2 a la atmósfera, ya que por medio de este mecanismo se equilibran los diferentes reservorios o almacenes de carbono en el planeta (Ibañez *et al.*, 2004).

La Figura 2 muestra que el carbono orgánico en el suelo y el CO_2 de la atmósfera están vinculados mediante la fotosíntesis de las plantas u organismos fotótrofos, los cuales fijan el C procedente del CO_2 atmosférico, mismo que pasa a formar parte de los tejidos vegetales y de los microorganismos en forma de C orgánico. Los organótrofos utilizan estos compuestos como alimento y los residuos son mineralizados, liberan CO_2 con lo que se cierra el ciclo (Porta *et al.*, 2003).

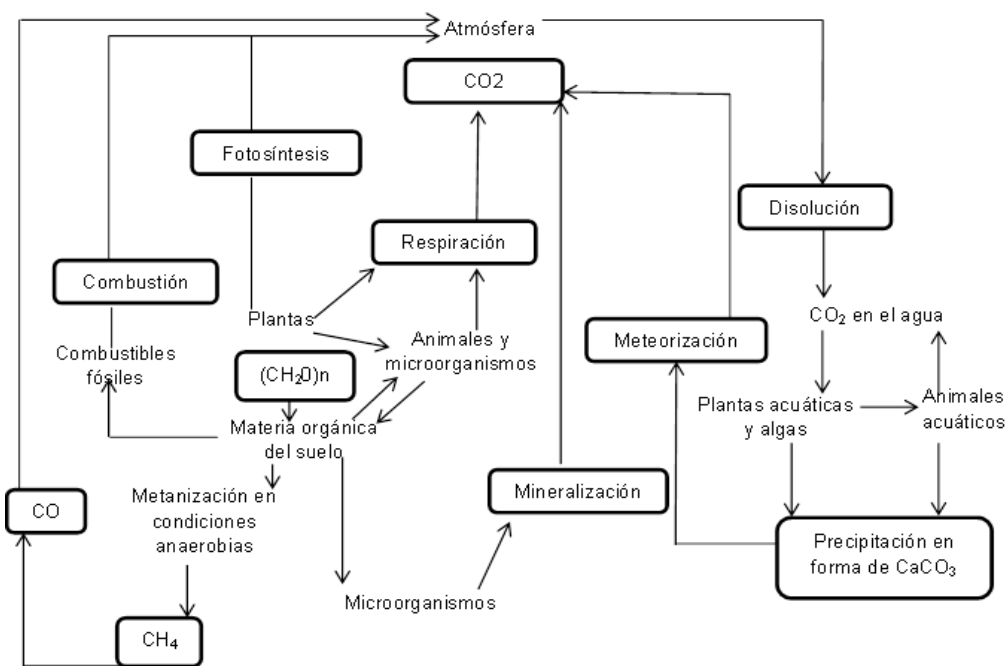


Figura 2. Ciclo del carbono (Porta *et al.*, 2003).

2.5.3. Actividad microbiana en el suelo

La importancia de los grupos específicos de organismos, entre estos la macroflora, microflora y microfauna, es comúnmente identificada por: 1) el número de individuos, 2) la biomasa por unidad de volumen de área en el suelo, y 3) su actividad metabólica (frecuentemente medido como la cantidad de dióxido de carbono generado en la respiración). La actividad biológica en el suelo es muy heterogénea, y los organismos vivos están muy distribuidos. La concentración de la actividad microbiana ocurre en las inmediaciones de las raíces vivas de las plantas y en los materiales orgánicos derivados de heces fecales de macrofauna y residuos vegetales (Brady y Weil, 2008).

2.5.4. Número de individuos

Las raíces de las plantas ocupan cerca del 1% del volumen del suelo y son responsables de una cuarta parte de la respiración del ecosistema. Compiten por el oxígeno pero también surten de carbono y energía necesaria para la microfauna y la microflora (Brady y Weil, 2008).

La microflora domina en la actividad biológica del suelo. Se estima que cerca del 80% del metabolismo en el suelo es derivado de la actividad de la microflora (Brady y Weil, 2008), pero la actividad se favorece por la acción de la macrofauna y microfauna. El número de bacterias y hongos generalmente es evaluado en forma de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de suelo y m² (Odum y Warrett, 2006).

2.5.5. Biomasa microbiana

La biomasa microbiana se define como el total de células vivas en un área determinada (Gobat *et al.*, 2004). La biomasa microbiana del suelo ha sido definida como la fracción viviente de la materia orgánica que comprende todos los organismos menores de $5 \times 10^3 \mu\text{m}^3$ que no sea material vegetal (Jenkinson, 1988). La biomasa microbiana incluye microorganismos muy diferentes (bacterias, hongos, levaduras, algas, protozoarios etc.). Se han propuesto varios métodos para cuantificar la biomasa microbiana de los suelos, se basan en el conteo de las células microbianas; otro método es el uso de parámetros fisiológicos tales como el de la cuenta directa al microscopio, cuantificación de ATP, la fumigación con cloroformo-incubación, la fumigación con cloroformo-extracción y la respiración inducida por sustrato (Delgado y Mingrelia, 1999).

2.5.7. Actividad metabólica

La actividad metabólica en el suelo se mide indirectamente por la respiración y está estrechamente asociada a los microorganismos de la rizosfera. La respiración es uno de los procesos más importantes de la liberación de carbono (Cheng *et al.*, 2005).

La respiración que es la oxidación biológica de la materia orgánica a CO_2 , ocupa una posición clave dentro del ciclo del carbono. La respiración es una medida del carbono potencialmente mineralizable en el suelo y refleja la actividad global o energía gastada por el pool microbiano, lo que proporciona una estimación de la actividad descomponedora de los microorganismos del suelo (Paz, 2006).

El suelo tiene una amplia participación en la producción y flujo de CO_2 emitido a la atmosfera (Atlas y Bartha, 2002). El CO_2 del suelo producto de la actividad biológica es la ruta principal por la que se pierde carbono del sistema suelo (Andrews y Schlesinger, 2001). La biomasa microbiana del suelo es uno de los

principales agentes de las transformaciones bioquímicas del mismo y una reserva de nutrimento más lábil que el conjunto de la materia orgánica (Jenkinson, 1988).

El incremento de las poblaciones microbianas puede atribuirse al aumento de la fracción orgánica fácilmente biodegradable como carbono y carbohidratos hidrosolubles, o bien a la incorporación de microorganismos exógenos al suelo procedentes de residuos incorporados (García *et al.*, 2000). La incorporación de materiales orgánicos frescos del suelo al poseer una mayor cantidad de compuestos fácilmente biodegradables que los composts provoca la actividad de una mayor cantidad de biomasa microbiana. Además la actividad de la biomasa microbiana, producto de la enmienda orgánica, decrece con el tiempo (García *et al.*, 2000).

Por lo tanto el carbono de la biomasa microbiana se ha empleado por algunos autores como índices sensibles de los cambios que experimenta la materia orgánica del suelo (Powlson y Jenkinson, 1981). Otros autores han considerado al carbono de la biomasa microbiana como un índice útil para comparar sistemas naturales y alterados por la actividad antropogénica, en particular la contaminación (Ross *et al.*, 1980; Sparlin *et al.*, 1981).

2.5.8. La rizosfera y sus efectos

La rizosfera es la porción o capa fina del suelo que se encuentra adherida a la raíz de la planta, es la zona de suelo donde los exudados radicales se depositan y pueden estimular, inhibir y/o afectar la actividad de los microorganismos. Aquí ocurren procesos de interacciones comensales y mutualistas entre la planta y los microorganismos (Pinton *et al.*, 2001; Atlas y Bartha, 2002). La rizosfera está integrada por diferentes regiones internas y las cuales contribuyen a la captación de nutrimentos que proceden del suelo, al igual que el transporte y asimilación de compuestos que la misma planta sintetiza para satisfacer su crecimiento (Figura 3). Las dos regiones principales son la endorrizósfera y la ectorrizósfera, esta última se divide en rizoplano y rizosfera (Pinton *et al.*, 2001).

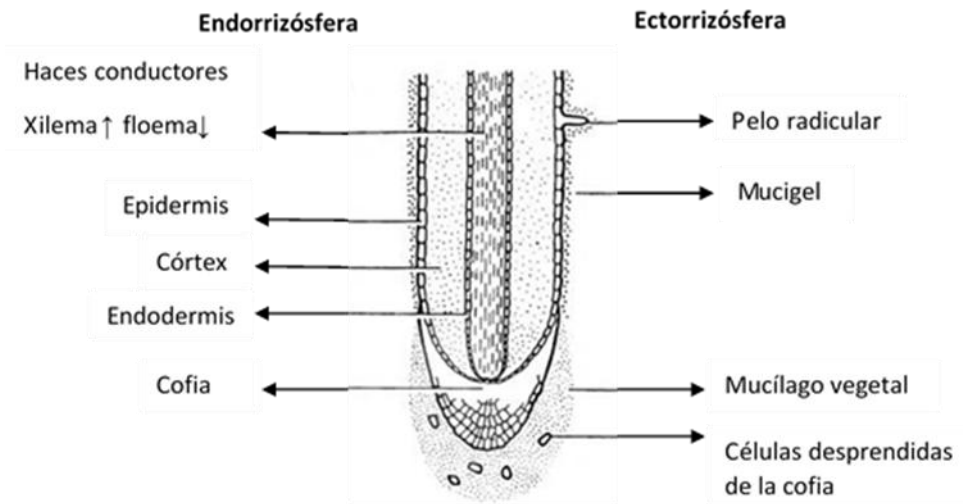


Figura 3. Esquematación de los componentes de la rizosfera (Brimecombe *et al.*, 2001).

La estructura del sistema radicular contribuye a que se establezca la población microbiana en la rizosfera (Torres-Guerrero *et al.*, 2013). Los exudados de la raíz que se depositan en la rizosfera son azúcares, ácidos orgánicos, aminoácidos, agua, iones inorgánicos, oxígeno, riboflavina, dióxido de carbono, iones de bicarbonatos, protones, electrones, etileno, secreciones como mucílago, enzimas y sideróforos (Uren, 2001).

Las interacciones entre los microorganismos y la rizosfera se basan principalmente en la modificación interactiva del ambiente del suelo derivado de procesos como captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos por las raíces al suelo, producción microbiana de metabolitos secundarios y captura de nutrientes minerales por parte de los microorganismos. El llamado efecto rizosfera/ suelo (R/S) es la relación entre el número de microorganismos de la rizosfera (R) y el número de microorganismos en el suelo alejado de las raíces (S). La relación generalmente tiene valores de 5 a 20, pero

es normal encontrar valores de 100, es decir, poblaciones microbianas 100 veces mayores en la rizosfera que en el suelo (Atlas y Bartha, 2002).

La población y diversidad de microorganismos reportados en suelo con raíz (rizoplano y rizosfera) es mucho mayor que en los suelos sin raíces, también el número de raíces y la extensión que ellas ocupan influyen en la cantidad de microorganismos presentes en el suelo (Manoharachary y Mukerji, 2006). Las poblaciones más importantes son los hongos, bacterias, protozoos y nematodos, el recuento de estas poblaciones determinado por la intensidad respiratorio da valores superiores a las del resto del suelo (Fuentes, 2007).

2.6. Microflora benéfica para las plantas

2.6.1. Bacterias promotoras del crecimiento vegetal

Los organismos del suelo y de la rizosfera agrupan bacterias y hongos promotores del crecimiento de organismos autotróficos. Las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal son bacterias que se encuentran libres en el suelo y que también son capaces de adaptarse, colonizar y permanecer en la rizosfera de las plantas (Xuliang *et al.*, 2007). Las bacterias promueven el crecimiento y desarrollo de la planta derivado de sus funciones básicas como son la solubilización de nutrimentos minerales, fijación de nitrógeno atmosférico, protección y disminución de patógenos de las raíces, ya sea por competencia o por antagonismo (Khan, 2008), además producen sustancias promotoras del crecimiento de vegetal, en conjunto contribuyen al crecimiento de la raíz y follaje (Hopkins y Hüner, 2009; Beneduzi *et al.*, 2012).

2.6.2. Bacterias fijadoras de N de vida libre

El crecimiento de la planta está determinado de forma directa o indirecta por la disponibilidad de nutrientes minerales, en especial por los macronutrientes (nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio y sodio). El N es el factor limitante en el crecimiento y desarrollo de las plantas después del agua (Baca *et al.*, 2000). El N forma parte de las proteínas, aminoácidos, nucleótidos, componente de la clorofila, está implicado en todos los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal (Hopkins y Hüner, 2009).

Las bacterias fijadoras de N de vida libre pueden ser anaerobias obligadas, aerobias o facultativas, se hospedan en suelo, rizosfera y en rizoplasma. En estas se incluye especies de un número creciente de géneros tales como *Azotobacter*, *Azospirillum*, *Beijerinckia*, *Chromatium*, *Clostridium*, *Desulfovibrio*, *Klebsiella*, *Paenibacillus*, *Pseudomonas*, *Rhodospseudomonas*, *Rhodospirillum* y *Thiobacillus*. Aunque la tasa de fijación de N por las bacterias de vida libre son relativamente bajas, estas bacterias están muy extendidas en el suelo y algunas se asocian a la rizosfera de la planta (Philippot y Germon, 2005).

El N molecular no es fácilmente asimilable por los organismos porque la unión entre los átomos está formada por un triple enlace muy difícil de romper. La única manera de poder usar el N de la atmósfera es mediante una reacción química que rompe estos tres enlaces y se incorporan átomos de hidrógeno para formar amoníaco, este es un compuesto que los organismos sí son capaces de procesar metabólicamente. Las bacterias nitrificantes capaces de oxidar el NH_4^+ a NO_2^- son principalmente del género *Nitrosomonas*, aunque se conocen otros géneros que pueden realizar este proceso al cual se le llama nitrificación (Pacheco *et al.*, 2002).

2.6.3. Solubilizadoras de fosfato

El fósforo es uno de los elementos esenciales para el crecimiento y desarrollo de las plantas en todas sus etapas fisiológicas, sin embargo puede no estar disponible ya que es rápidamente inmovilizado al interactuar con el resto de los componentes del suelo. Las rizobacterias pueden incrementar la capacidad de la planta de absorber éste elemento solubilizando el fósforo a través de la producción de ácidos orgánicos débiles (Li *et al.*, 2007).

Los compuestos inorgánicos insolubles de fósforo [$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] no están totalmente disponibles para las plantas, pueden ser convertidos, por bacterias solubilizadoras de P, en fosfato di y monobásico, que son formas asimilables para la planta. Las principales especies activas en este proceso pertenecen a *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Micrococcus*, *Bacillus* y *Flavobacterium* (Díaz-Vargas *et al.*, 2001).

La solubilización del fosfato ocurre por la liberación de ácidos producidos por la oxidación directa de la glucosa y otros azúcares; los ácidos que se producen por esta vía incluyen ácidos acético, láctico, málico, succínico, tartárico, oxálico y cítrico, siendo los más fuertes los ácidos glucónico y 2-cetoglucónico capaces de actuar como quelantes de Ca^{+2} en condiciones apropiadas. Estos ácidos son producidos por bacterias, entre las que destacan *Achromobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Escherichia*, *Flavobacterium*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Serratia* (Corrales-Ramírez *et al.*, 2014).

2.7. El petróleo y su interacción con los organismos del suelo

El petróleo crudo es una fuente de carbono y energía para los microorganismos del suelo, sin embargo según la cantidad y composición del petróleo crudo que se derrame en el ecosistema, ocasiona alteración de los diferentes componentes bióticos, abióticos y de la cadena alimenticia. Los hidrocarburos más livianos se volatilizan y fotooxidan pero los hidrocarburos policíclicos aromáticos, asfáltenos y

resinas son acumulados en el suelo, raíz y agua por tiempos prolongados (Labud *et al.*, 2007).

Los hidrocarburos del petróleo derivados del petróleo fresco provocan la quema y muerte de plantas, disminución de la microflora y microfauna, esto lleva a un desequilibrio ecológico general y los efectos de la contaminación en el suelo dependen su vulnerabilidad, propiedades de amortiguación y capacidad de auto-depuración (Erazo-Parga y Cárdenas-Romero, 2013). En particular los hidrocarburos derivados del petróleo intemperizado por el tiempo de permanencia en el suelo han logrado establecerse y se han integrado como parte del carbono en el ecosistema. Según Rivera-Cruz (2011b) esto ha inducido el establecimiento de plantas y microorganismos tolerantes y adaptados a esta fuente de carbono, por lo tanto estos organismos en el suelo pueden contribuir al equilibrio y dinámica de los ecosistemas.

2.7.1. Características y composición química del petróleo crudo intemperizado

El petróleo es una mezcla natural, compleja, compuesta de hidrocarburos y otros componentes minoritarios formados bajo la superficie terrestre (Castillo *et al.*, 2005). Su composición se basa principalmente de hidrocarburos (compuestos de hidrógeno y carbono) que representan entre el 50 a 98% en relación a la composición total (Botello *et al.*, 2005).

El petróleo intemperizado es un petróleo crudo sometido a procesos de meteorización e intemperismo en la superficie del suelo cuando ocurre el derrame (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004). Se compone de hidrocarburos saturados ramificados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, asfaltenos y resinas (Figura 4).

2.7.1.1. Hidrocarburos saturados

Los hidrocarburos saturados son aquellos que no poseen dobles enlaces. Se dividen en función de su estructura química en alcanos o parafinas y cicloalcanos o naftalenos. Los alcanos se dividen a su vez en ramificados o no ramificados en función de su estructura química lineal. Están definidos por la fórmula general C_nH_{2n+2} . Los cicloalcanos contienen al menos un anillo de átomos de carbono, aunque el número de anillos es muy variable. Su fórmula general es C_nH_{2n} y es relativamente común la presencia a lo largo de su estructura de sustituyentes del tipo alquilo (Harayama *et al.*, 1999).

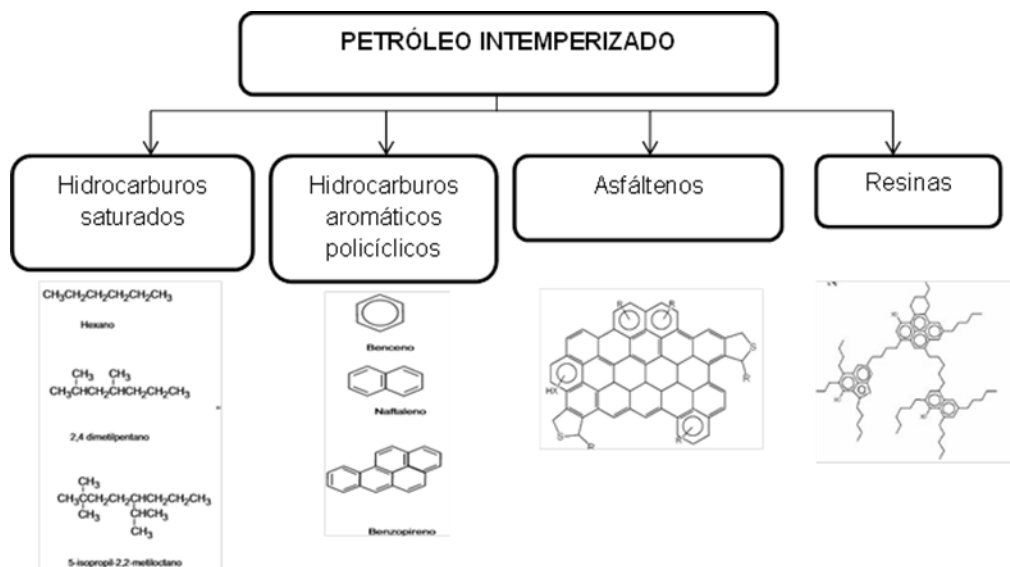


Figura 4. Clasificación de los componentes químicos del petróleo intemperizado (Botello *et al.*, 2005; Olguín *et al.*, 2007; Borges *et al.*, 2014).

2.7.1.2. Hidrocarburos policíclicos aromáticos

Son menos abundantes que los hidrocarburos saturados y contienen por lo menos un anillo bencénico íntimamente ligado o conectado en su estructura molecular. Este grupo de hidrocarburos lo conforman compuestos cuya estructura molecular

se origina por la unión de tres o más anillos bencénicos, algunos ejemplos son pireno, criseno, benzoantraceno, benzopireno, benzofluoreno, benzofluoranteno y perileno (Botello *et al.*, 2005).

2.7.1.3. Resinas

Al someter los maltenos a una cromatografía los productos separados con los disolventes más polares se llaman resinas. En general se trata de moléculas con fuerte carácter aromático, que contiene heteroátomos (N, O, S y a veces Ni y V) y de masa molecular entre 500 y 1,000 (Wuaquier, 2004).

2.7.1.4. Asfáltenos

El petróleo contiene una fracción significativa de materiales de alto peso molecular constituido por moléculas mixtas de hidrocarburos con moléculas polares, llamados asfaltenos; su estructura es muy compleja formada por 10 a 20 anillos bencénicos con cadenas laterales de hidrocarburos alifáticos y nafténicos (Botello *et al.*, 2005). Una representación de su estructura consiste en láminas aromáticas apiladas, enlazadas entre sí por los electrones π de los dobles enlaces del anillo bencénico. Son sólidos, negros, brillantes, cuyo peso molecular varía entre 10000 y 100000. Al contener un gran número de “islotos” de anillos aromáticos condensados los asfáltenos son muy ricos en carbono, su estructura espacial se aproxima a láminas de estructura gráfica (Wuaquier, 2004).

2.7.2. Efecto del petróleo en las plantas

Diversos reportes científicos indican que el petróleo provoca efecto negativo en el crecimiento de la planta (Adams *et al.*, 2015), producción (Rivera-Cruz *et al.*, 2005), tasa fotosintética y concentración de clorofila en la planta (Reyes, 2003) e inhibe la emergencia de semillas (Quiñones, 2003). En el Cuadro 2 se observa el

efecto negativo de diferentes dosis de petróleo en parámetros del crecimiento y producción de pastos y leguminosas nativas de regiones tropicales.

2.7.3. Efecto del petróleo en microflora del suelo

El petróleo influye negativamente en el crecimiento y actividad de los microorganismos del suelo, sin embargo existen alrededor de 60 géneros de bacterias y 80 de hongos que contienen especies que degradan hidrocarburos en una amplia gama de hábitats y en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, lo que demuestra su adaptación (Prince y Drake, 1999).

Cuadro 2. Efecto de diferentes dosis de petróleo en el crecimiento y producción de planta.

Producto	HTPs [¶] (mg kg ⁻¹)	Efecto negativo	Autor/año
Petróleo	15000-35000	Disminución de la emergencia, volumen radical, longitud de raíz y altura de <i>Zea mays</i> .	Quiñones <i>et al.</i> , 2003
Petróleo	100000	Disminución de materia seca vegetal de <i>Echinocloa polystachya</i> .	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2004
Petróleo	150000	Muerte de <i>Mimosa</i> sp y <i>Mimosa pigra</i> .	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2005
Combustóleo	50000	Crecimiento de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	Ferrera-Cerrato <i>et al.</i> , 2007
Petróleo	90000-18000	Materia seca, altura, producción vegetal de <i>Leersia hexandra</i> .	Arias <i>et al.</i> , 2012
Queroseno	2000	Área foliar, materia seca y volumen radical en gramíneas.	García <i>et al.</i> , 2013

[¶]Hidrocarburos totales del petróleo.

Puede haber aumento en la densidad de microorganismos del suelo (Quiñones, 2003) conforme pasan los días después de la incorporación del petróleo al suelo, pero disminuye la diversidad lo cual puede deberse a que algunos microorganismos se adaptan a las nuevas condiciones y utilizan los componentes del petróleo como nuevo sustrato, mientras que para los otros pueden ser tóxicos e inhibirlos (Zamora *et al.*, 2012).

Las bacterias promotoras del crecimiento vegetal han sido reportadas por diversos investigadores que sobreviven en suelos contaminados con petróleo crudo fresco e intemperizado, en el Cuadro 3 se observan estas evidencias. Según Vásquez-Luna *et al.* (2011) las bacterias fijadoras de N de vida libre totales aumentan en suelos contaminados con 1200 a 40000 mg kg⁻¹ HTPs derivado del petróleo, lo mismo suceden en suelo con petróleo intemperizado (Rivera-Cruz *et al.*, 2002). Las bacterias solubilizadoras de fosfato tienen mayor crecimiento de la densidad en suelo con petróleo intemperizado (Dorantes, 2010).

Cuadro 3. Efecto del petróleo en bacterias promotoras de crecimiento vegetal.

Compuesto	HTPs [¶] (mg kg ⁻¹)	Efecto	Autor
Petróleo Intemperizado	9110	Estimulación de la densidad de BFN en horizonte orgánico.	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2002.
Queroseno	500-5000	Aumento en la población de BFN en rizosfera de <i>Phaseolus vulgaris</i> .	Hernández <i>et al.</i> , 2003.
Gasolina, diésel y combustóleo	5 Lm ⁻² , 7.5 y 10 L m ⁻² de lodos petroquímicos	Disminución de la población total de <i>Pseudomonas</i> a los 60 días.	Chirinos <i>et al.</i> , 2010.
Petróleo intemperizado	90714	Se favorece la población de bacterias solubilizadoras de P.	Dorantes, 2010.
Petróleo intemperizado	2500	Inhibición de la densidad de <i>Azospirillum</i> y solubilizadoras de P.	Rivera-Cruz <i>et al.</i> , 2011b.
Petróleo fresco	1200-40000	Aumento de las poblaciones de bacterias fijadoras de N.	Vásquez-Luna <i>et al.</i> , 2011.

[¶]Hidrocarburos totales del petróleo.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar la distribución espacial del petróleo intemperizado en un Gleysol, la productividad del pasto *Leersia hexandra* y la actividad biológica rizosférica para formular estrategias de recuperación del suelo con uso forrajero.

3.1.1. Objetivos particulares

1. Identificar la distribución vertical y horizontal de los hidrocarburos totales del petróleo en suelo rizosférico del pasto *Leersia hexandra* y en suelo subyacente para delimitar zonas impactadas.
2. Evaluar *in situ* el efecto de los hidrocarburos totales del petróleo en la materia seca aérea y en la densidad de raíces de *Leersia hexandra*.
3. Cuantificar en suelo rizosférico de *Leersia hexandra* y no rizosférico las densidades de bacterias heterótrofas, fijadoras de N de vida libre y solubilizadoras de fosfato.
4. Medir el efecto de los hidrocarburos totales del petróleo en la tasa de respiración microbiana y en el carbono de la biomasa en suelos rizosférico y no rizosférico del pasto.

CAPÍTULO IV

HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

La productividad de *Leersia hexandra* y su actividad biológica rizosférica es afectada por la distribución espacial y la cantidad del petróleo en el Gleysol.

4.1.1. Hipótesis particulares

1. La cantidad de hidrocarburos totales del petróleo es menor en la rizosfera de *Leersia hexandra* y también en la capa superficial del suelo.
2. La producción de materia aérea de *Leersia hexandra* y la densidad de raíces disminuye por la presencia de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo.
3. La densidad de bacterias heterótrofas, fijadoras de N de vida libre y solubilizadoras de fosfato en suelo rizosférico es inhibida por hidrocarburos totales del petróleo.
4. La tasa de respiración microbiana depende del suelo rizosférico y no rizosférico, del tiempo de incubación y de la cantidad de hidrocarburos totales del petróleo por zona en la finca.

CAPÍTULO V

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Ubicación geográfica y características climáticas de la finca

El sitio de estudio se localiza en el ejido José Narciso Rovirosa, ubicado a 1.5 km al sureste del Complejo Procesador de Gas La Venta, municipio de Huimanguillo Tabasco, México. La superficie evaluada es 23 036.405 m². La ubicación geográfica es 18° 04' 37" latitud norte y 94° 02' 28" longitud oeste (Figura 5). El clima es cálido, con una precipitación media anual de 1,500 a 4,500 mm y temperatura media anual de 22 a 28 °C (INEGI, 2014). El clima de Tabasco tiene registrado tres épocas: época de lluvias, la precipitación mensual es mayor de 300 mm; la época de nortes registra precipitación de más de 250 mm mensuales, y la época de sequía con precipitación mensual menor a 40 mm. En la época evaluada (sequía, mayo 2015) se encontró una lámina de agua de hasta 60 cm en algunos de los puntos muestreados.

5.1.1. Características del suelo

El suelo es un Gleysol propio de ecosistemas de humedales. El suelo se localiza saturado de agua el mayor tiempo del año. Los colores que predominan son rojizos, parduzcos o amarillentos en la cara de los agregados y en la superficie del suelo, que se combina con colores grises o azulados en el interior de los agregados o en la parte más profunda del suelo (IUSS, 2007). Las propiedades físicas y químicas del suelo de esta finca son textura franco arcillosa, CO muy alto y N total muy alto (Ramírez-May, 2012).

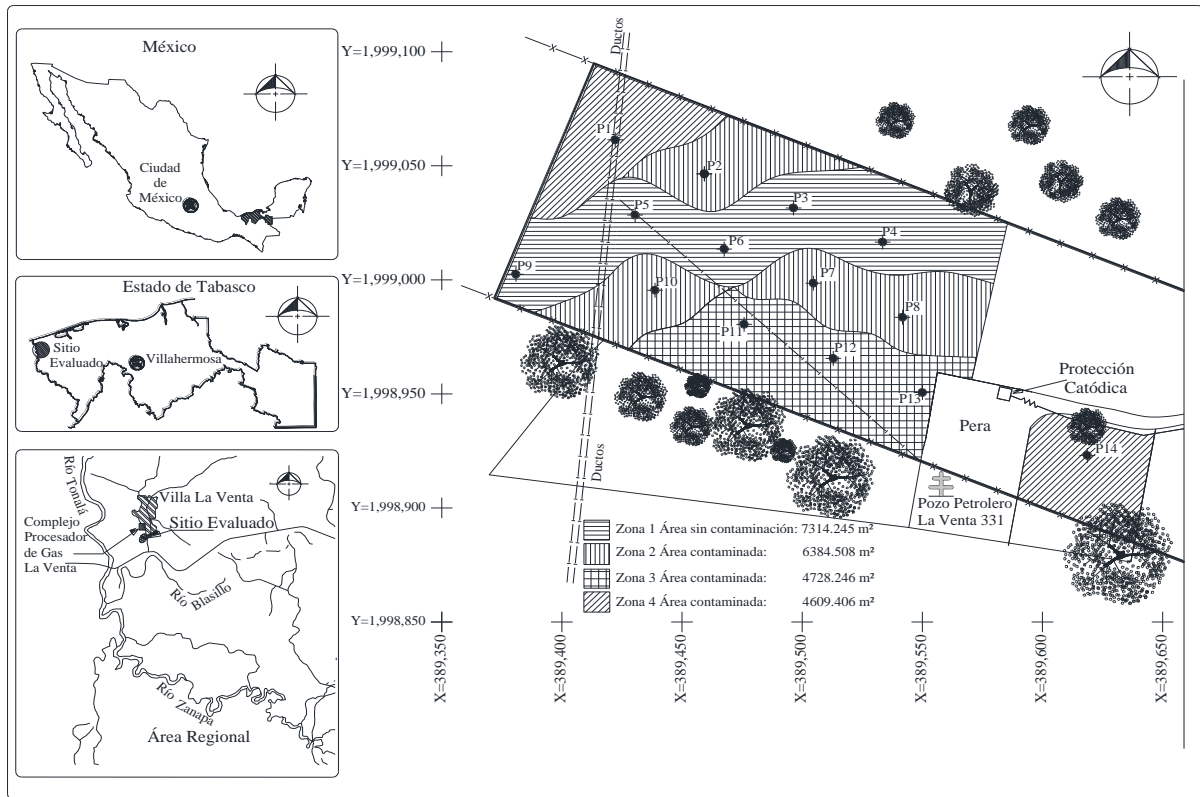


Figura 5. Localización de la finca “Mi Ranchito”, puntos de muestreo (P) y área por zonas. Ejido José Narciso Roviroso, Huimanguillo, Tabasco.

5.1.2. Uso actual del suelo de la finca

El sitio es un humedal donde existe cobertura con pasto *Leersia hexandra*, denominado *japonesa* por los pobladores, es usado como alimento para el ganado bovino, ovino y caprino. Este pasto es reportado por Rivera-Cruz (2011a) como atenuador de humedales, debido a que forma sobre el suelo una masa foliar y radical que permite el pisoteo de los animales sobre el suelo anegado, sin que este se hunda en el sedimento.

5.1.3. Características del pasto *Leersia hexandra*

Es una planta perenne de porte bajo, estolonífera, semidecumbente, de tallos flexibles, con hojas angostas y pequeñas, es abundante en suelos pesados, anegadizos (Figura 6a) y con un sistema radical abundante (Figura 6b). Se encuentra adaptado a esteros y humedales donde la lámina de agua sobrepasa los 25 centímetros (FONAIAP, 1983). Según IBUNAM (2015) su descripción botánica es:

Reino: Plantae

Phylum: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida

Orden: Cyperales

Familia: Gramineae (Poaceae)

Género: *Leersia*

Especie: *hexandra*

Nombre científico: *Leersia hexandra* Sw.

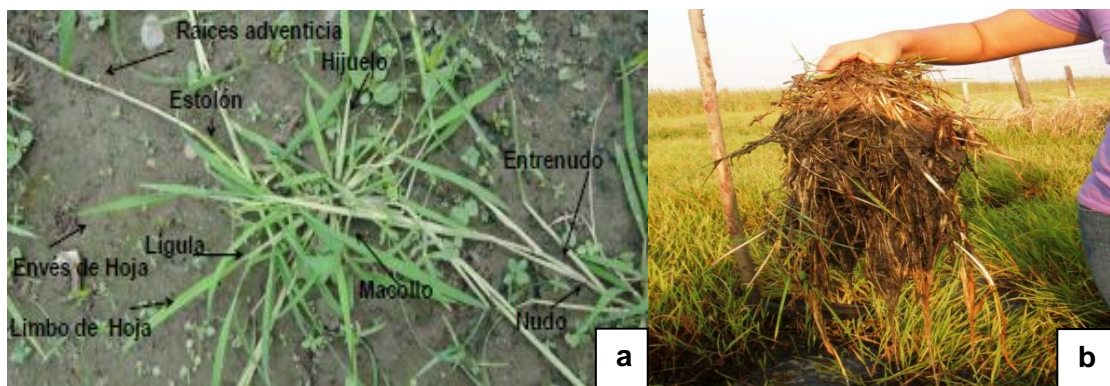


Figura 6. a) Morfología de *Leersia hexandra* Sw. (Arias, 2012), b) rizosfera de *Leersia hexandra* en la finca forrajera.

5.1.4. Infraestructura petrolera

El terreno estudiado es atravesado por ocho ductos que conducen petróleo crudo o gas de los pozos petroleros al Complejo Procesador de Gas La Venta (CPGLV), también otros ductos conducen petróleo sin agua y gas a la petroquímica La Cangrejera Coatzacoalcos Veracruz. En este sitio se encuentra una presa de tratamiento del pozo taponado La Venta 331, una caseta de protección catódica (Figura 7) que sirve para prevenir el desgaste y la corrosión de los ductos que atraviesan (Dorantes, 2010).

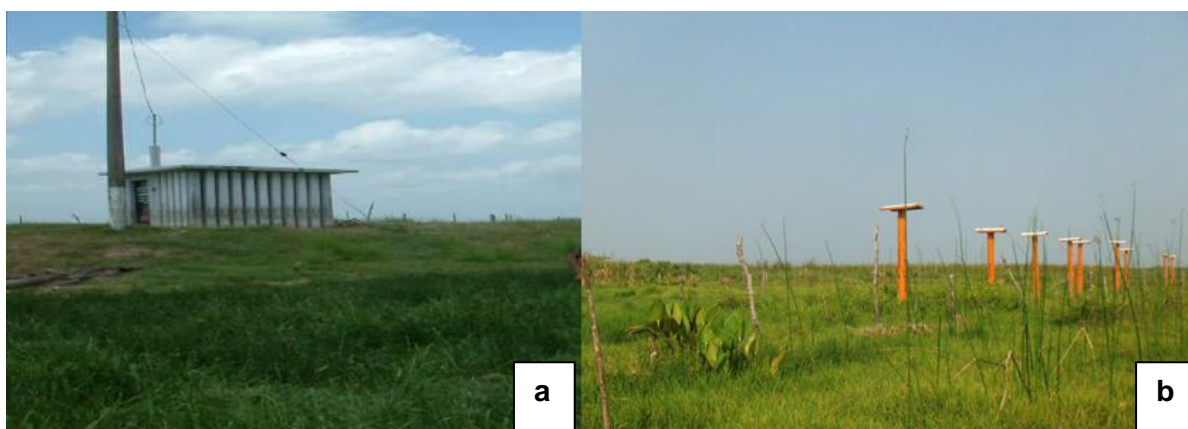


Figura 7. Infraestructura petrolera dentro de la finca, a) caseta de protección catódica y b) señalamientos de ubicación de ductos.

5.1.5. Vertido del petróleo en la finca

El vertido de petróleo fresco en el suelo de la finca procede de ruptura de ductos, por transporte a través del agua de lluvia desde las presas de tratamiento e pozos petroleros aledaños y también del CPGLV, localizado al noreste del sitio. Este depósito de aceite se ha realizado desde los años 1960 hasta la fecha. Según Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004) el petróleo fresco *in situ* ha sido intemperizado por procesos físicos, químicos y biológicos. La distribución de los

HTPs en la finca fueron evaluados por diferentes investigadores, e indican variación a través del tiempo. En el año 2006 los contenidos variaron de 17,850 a 58,215 mg kg⁻¹ de HTPs (Trujillo-Narcía *et al.*, 2006), en el 2009 se cuantificaron 5,279 a 90,714 mg kg⁻¹ (Dorantes, 2010) y el 2010 en la capa 1(0-15 cms) se encontró 7,602 a 16,032 y en la capa 2 (15 a 100 cm) 5,095 a 439,515 mg kg⁻¹ (Carranza, 2011).

5.1.6. Ubicación del área y diseño de muestreo

El área evaluada es un predio de 23 036.405 m² (Figura 5). Se utilizó muestreo dirigido en retícula triangular equilátero cada 37.5 m de distancia de noroeste a suroeste y 27.5 de suroeste a noreste en el sitio, como se ilustra en la Figura 5 puntos de muestreo y entre las líneas de muestreo. Se establecieron tres líneas de norte a sur, cada una con cuatro puntos de muestreo (Figura 5), se ubico fuera del predio el punto 14, en la presa de tratamiento abandonada de residuos petroleros.

5.2. Muestreo del suelo rizosférico y suelo subsuperficial

5.2.1. Muestreo por puntos en la finca

La colecta se realizó en 14 puntos del terreno, se extrajo suelo rizosférico de *L. hexandra* (capa 1) y suelo no rizosférico en tres capas: capa 1 (0-15 cm de profundidad), capa 2 (15-30 cm de profundidad) y la capa 3 (30 a 70 cm de profundidad). Esta colecta se realizó durante abril de 2015, se realizó para determinar la distribución espacial de los HTPs y las características físicas y químicas del suelo. Los contenidos de HTPs fue la base para delimitar zonas de estudio en la finca. La colecta de suelo rizosférico se efectuó con espátula y cuchillo, el suelo de las capas 1, 2 y 3 fue colectado usando una barrena con nucleador cerrado (Figura 8a). El núcleo de la barrena previamente se limpió usando un detergente biodegradable, cada muestra se colocó en bolsa de

polietileno previamente etiquetada (Figura 8b) y se conservaron en una hielera a temperatura de 4°C.



Figura 8. Colecta de suelo por capas, a) con barrena de acero inoxidable y b) almacenamiento de muestra.

5.2.2. Muestreo por zona (Z)

El muestreo por zona se realizó durante mayo de 2015, y se colectó material aéreo y raíz del pasto *L. hexandra*, suelos rizosférico y no rizosférico para el conteo de bacterias heterótrofas, promotoras del crecimiento vegetal y tasa de respiración microbiana. Para el conteo de bacterias heterótrofas y promotoras del crecimiento vegetal se colectó 40 g de suelo rizosférico y no rizosférico, y para el bioensayo *in vitro* de respiración microbiana se colectó 300 g. Las muestras de suelo rizosférico y no rizosférico se colectaron en el estrato 0-15 cm de profundidad, cinco repeticiones distribuidas al azar en cada zona.

5.2.2.1. Colecta de material aéreo de *Leersia hexandra*

La materia seca aérea por zona se colectó con el uso de un cuadrado 1 m² (Doubenmire, 1956), se cortaron los tallos y hojas de *L. hexandra* sobre la superficie del suelo. En cada zona de muestreo se colectaron ocho repeticiones de materia aérea de *L. hexandra*, la distribución de las repeticiones fue de manera aleatoria.

5.3. Análisis de hidrocarburos totales del petróleo

La determinación de los HTPs, en mg kg⁻¹ base seca, se realizó mediante el método analítico EPA 3540B (USEPA 1996) y la cuantificación por gravimetría según la norma NMX-AA-134-SCFI-2006 (DOF, 2006). Se utilizó 10 g de muestra fresca de suelo (Figura 9a y b) y cloruro de metileno ACS (CH₂Cl₂) con 99.9% de pureza (Fermont) como extractante. La muestra de suelo se sometió a lavadurante ocho horas con el solvente en equipo soxhlet (Figura 9c). La HTPs fue gravimétrica. Los HTPs en base seca contenidos en suelo se reportan en mg kg⁻¹ y se aplicó la fórmula siguiente:

HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = (RB – RA) * (FC) / (P * FH) (Fernández-Linares *et al.*, 2006).

Donde:

HTPs (mg kg⁻¹ de s.s.) = hidrocarburos totales del petróleo en mg kg⁻¹ de suelo seco.

RA= peso (mg) del recipiente vacío a peso constante.

RB = peso (mg) del recipiente con el extracto orgánico concentrado.

P = cantidad de suelo extraído (g).

FH = factor de corrección de humedad [1-(%humedad/100)].

FC = factor de corrección para transformar a kg de s.s. = 1 000.

5.4. Delimitación de zonas en el sitio

Se delimitaron cuatro zonas (Z) en función de la concentración de HTPs por punto. La concentración promedio por punto se obtuvo con los HTPs contenidos en rizosfera, capa 1, 2 y 3. La Z1 integró los puntos (P3, P4, P5, P6 y P9), con 1393 mg kg^{-1} HTPs (sin contaminación) y una superficie de 7314.245 m^2 ; la Z2 incluyó los puntos P2, P7, P8 y P10, con 3455 mg kg^{-1} y una superficie de 6484.508 m^2 ; la Z3 con 5574 mg kg^{-1} (P11, P12 y P13), superficie 4728.246 m^2 , y la Z4 con 7552 mg kg^{-1} e incluye los P1 y P14, la superficie fue 4609.406 m^2 (Figura 5).

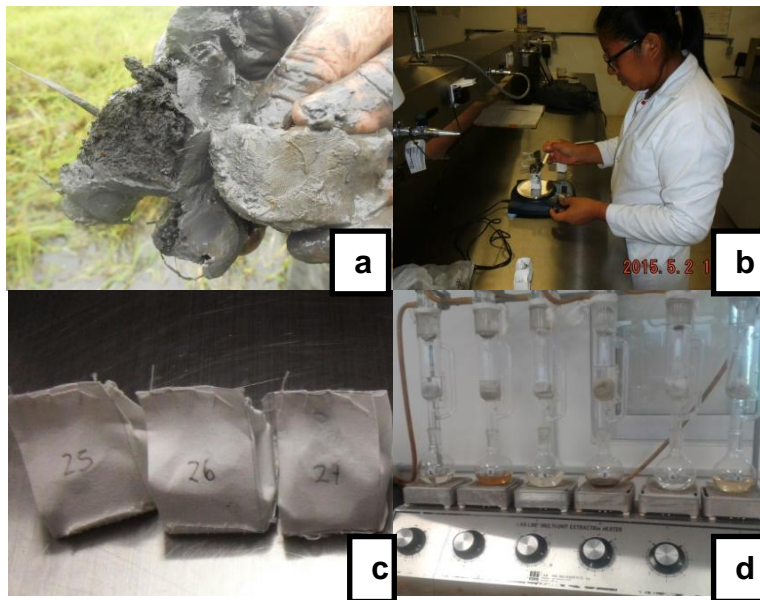


Figura 9. Detalles del proceso de extracción de los HTPs. a) Muestra húmeda de suelo, b) pesado de muestra suelo, c) muestra preparada para extracción, y d) extracción de los HTPs en equipo soxhlet.

5.4.1. Características de los suelos en las zonas

El suelo de las cuatro zonas utilizadas en el conteo microbiano y en el bioensayo de respiración se realizó el estudio de las propiedades físicas y químicas. La textura (Bouyoucos, 1962), pH en H_2O (potenciometría), materia orgánica del suelo

(Walkley y Black, 1934), nitrógeno total por micro-Kjeldahl digerido con H_2SO_4 (Page *et al.*, 1982), fósforo disponible (Olsen y Sommers, 1982) y $S-SO_4^{2-}$ por turbidimetría (Etchevers, 1992). En el Cuadro 4 se observa que los cuatro suelos tienen textura franco arcillo limoso, son fuertemente ácidos, la fertilidad es alta por los contenidos de MO, N total micro-Kjeldahl, P disponible y $S-SO_4^{2-}$. La Z1 tiene niveles inferiores al límite máximo permisible de HTPs en suelo con uso agrícola, las Z2, Z3 y Z4 tienen límites superiores para los organismos vivos según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013).

Cuadro 4. Características físicas y químicas de los suelos de las zonas contaminadas y no contaminadas con petróleo intemperizado

Características	Sin	Contaminado con petróleo		
	contaminación	intemperizado		
	Z [¶] 1	Z2	Z3	Z4
pH _{H2O}	4.2	4.5	4.0	4.4
MO ^{&} (%)	16.8	14.8	15.2	31.6
N total (%)	0.74	0.84	0.84	1.58
P disponible (mg kg ⁻¹)	7	9	8	12
SO ₄ ²⁻ (mg kg ⁻¹)	266	172	266	313
HTPs [§] (mg kg ⁻¹)	1393	3455	5574	7525
Arena (%)	50	45	46	55
Arcilla (%)	18	16	19	18
Limo (%)	32	39	35	27

[¶]Zona, [&]Materia orgánica. [§]Hidrocarburos totales del petróleo.

5.5. Variables evaluadas

5.5.1. Materia seca aérea

La materia seca aérea se determinó mediante técnica gravimétrica (Alcántar, 1992). El material vegetal fresco se lavó con agua del grifo y se extendió sobre bolsas de plásticos bajo sombra con la finalidad de que perdiera la humedad, posteriormente, se introdujo en bolsas de papel etiquetadas a la estufa de secado (Figura 10) a temperatura de 75 °C durante cinco días, tiempo después la materia seca fue pesada con una balanza semianalítica.

5.5.2. Densidad de raíz

La densidad y diámetro de las raíces fue evaluada por zona y por triplicado, la muestra se colectó en la capa 0-15 cm de profundidad, se usó un cuadrante de 1 cm² (Cuanalo, 1981) (Figura 11), se contaron según el tamaño y diámetro: muy finas (< 0.5 mm), finas (0.5 mm) y delgadas (1 mm).



Figura 10. Secado de la biomasa foliar de *Leersia hexandra*, a 75°C.

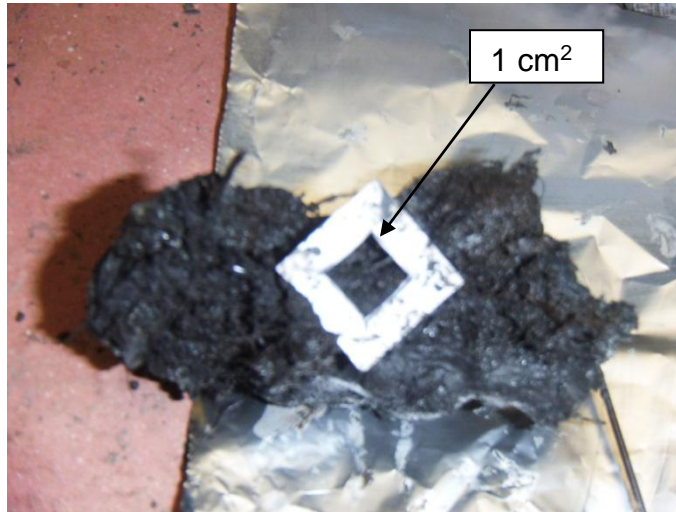


Figura 11. Determinación de la densidad de raíces en 1 cm².

5.5.3. Actividad biológica

La actividad biológica del suelo se midió en laboratorio, se cuantificó la población microbiana (bacterias promotoras del crecimiento vegetal) y la respiración de microorganismos. La tasa de respiración microbiana se evalúa en base al CO₂ liberado.

5.5.3.1. Población de bacterias en suelo rizosférico y no rizosférico

El estudio de los grupos de bacterias se realizó mediante la técnica de cuenta viable por dilución seriada. Los medios de cultivos para los diferentes tipos de bacterias fueron los siguientes: agar nutritivo para bacterias heterótrofas (Johnson y Curl, 1972) (Anexo, Cuadro 1), medio de cultivo carbón combinado para bacterias fijadoras de N de vida libre (BFN) (Rennie, 1981) (anexo, Cuadro 2); medio de cultivo Pikovskaya para bacterias solubilizadoras de fosfato (BSP (Pikovskaya, 1948) (anexo, Cuadro 3); medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) para hongos heterótrofos (Johnson y Curl, 1972) (anexo, Cuadro 4). La técnica de cuenta viable consiste en pesar 10 g de suelo fresco y diluir en 90 mL de agua destilada estéril, después se agita durante 15 minutos a 100 rpm, luego se extrae

una alícuota de 1 mL para realizar las diluciones. Para la siembra en caja de Petri se extrae una alícuota de 0.1 mL y se rastrilla, en seguida se incuba a 28 °C en incubadora durante 48 h para bacterias y 72 h para hongos (Figura 12) (Madigan *et al.*, 2009). Las UFC g⁻¹ se reportan por gramo de rizosfera y de suelo seco no rizosférico.

5.5.3.2. Respiración microbiana (CO₂) en rizosfera y no rizosfera

La respiración microbiana, llamada metabolismo aeróbico de raíz y microorganismos, se evaluó con la técnica volumétrica de fumigación-incubación (Jekinson y Powlson, 1976 cit. García, 1981). La fumigación del suelo fue sustituida por la esterilización en olla de presión a 1.3 kg cm⁻² por 30 minutos. Se estableció un bioensayo en condiciones *in vitro* con suelo rizosférico de *L. hexandra* y no rizosférico colectados en la zona del terreno sin contaminación y contaminadas con HTPs de petróleo intemperizado.

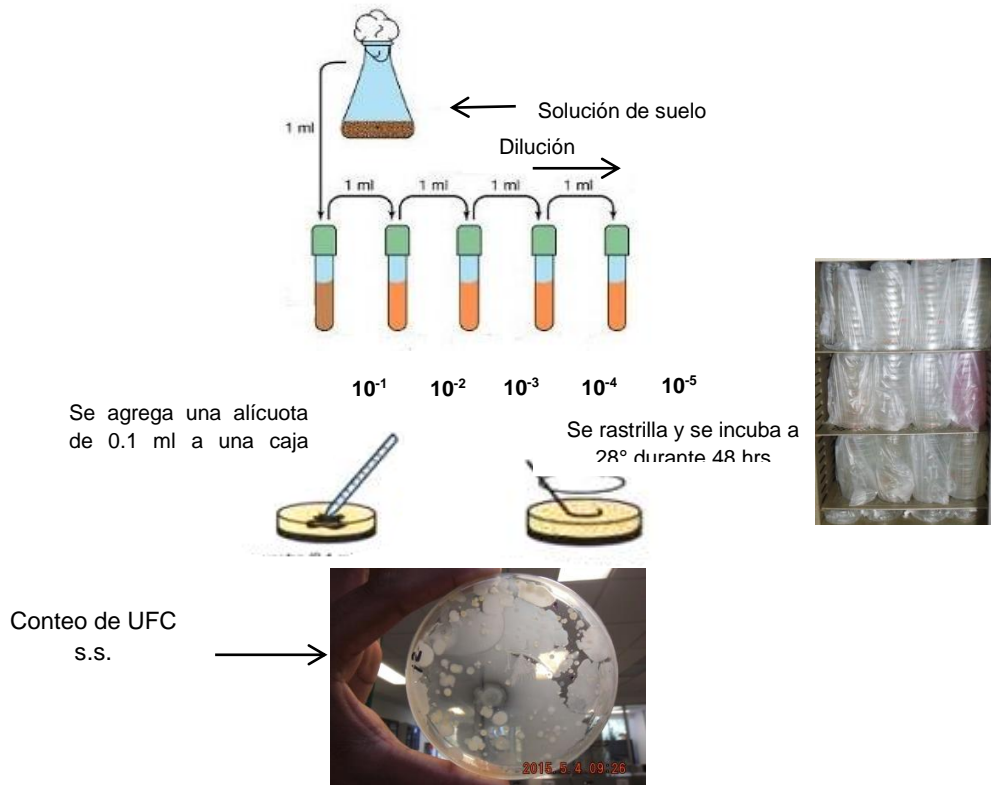


Figura 12. Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en suelos rizosférico y no rizosférico.

El diseño de tratamientos estuvo integrado con suelo rizosférico y suelo no rizosférico con cuatro niveles de HTPs (mg kg^{-1}) cada uno: 1393 sin contaminación (Z1), 3455 (Z2), 5574 (Z3) y 7544 (Z4). En total fueron 10 tratamientos, ocho con muestras problema y dos de control (muestra estéril y blanco sin suelo). Cada unidad experimental (UE) consistió de un frasco de vidrio estéril (100 mL) con tapa de rosca. Se establecieron 50 unidades experimentales, se incubaron a $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 63 días. A las UE de los ocho tratamientos se les adicionó 50 g de suelo rizosférico y/o no rizosférico, además se introdujo suelo estéril y un blanco sin suelo. Sobre la muestra se colocó un vial de 10 mL con 5 mL de KOH 1 N y una tira de papel filtro estéril, para capturar el CO_2 desprendido durante la respiración microbiana, después fue titulado con HCl al 0.1 N y dos gotas de fenolftaleína en solución alcohólica al 1%, 1 mL de BaCl 5% para precipitar los carbonatos. Las titulaciones se realizaron en cinco tiempos: días 2, 14, 21, 42 y 63 (Figura 13).

La respiración aeróbica en $\text{mg CO}_2 \text{ g}^{-1}$ suelo y/o rizosfera d^{-1} se calculo con la siguiente fórmula (García, 1981):

Mililitros de HCl (testigo)-mililitro HCl (muestra-problema transformado en Na_2CO_3)=mililitros de NaOH.

Mililitros de NaOH (convertido en Na_2CO_3) x N del HClx22=miligramos de CO_2 (molar).

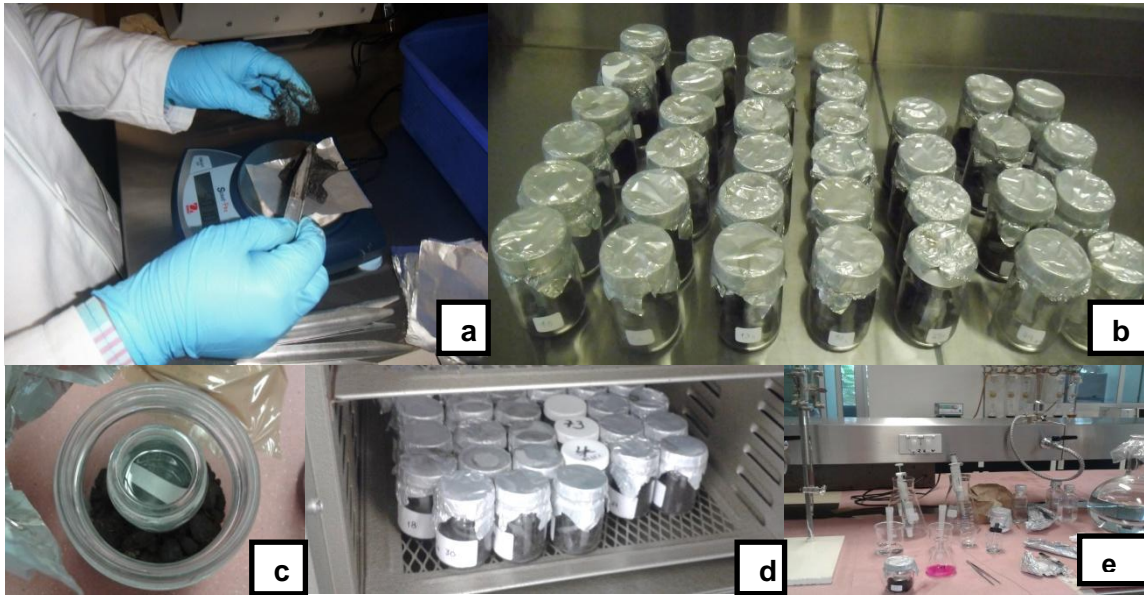


Figura 13. Respiración microbiana de suelos rizosférico y no rizosférico. a) P peso de muestra, b) unidad experimental, c) vial con KOH, d) incubación, y e) titulación.

5.5.3.3. Carbono de la biomasa microbiana

El C-de la biomasa microbiana es definido por Jenkinson y Ladden (1981) como un agente bioquímico que puede ser alterado, lo consideran como el repositorio de nutrimentos más disponible para las plantas. Medir el C-de la biomasa puede revelar los cambios del suelo mucho antes que con técnicas como carbono o nitrógeno total. Pérez *et al.*, (2014) menciona que cuanto mayor es el C de la biomasa microbiana del suelo, mayor será la reserva del C del suelo, esto implica un menor potencial de degradación de la materia orgánica presente en el suelo. El método para evaluar el C-biomasa fue el de fumigación-incubación y se utilizó el diseño de tratamiento establecido para evaluar la tasa de respiración microbiana.

La estimación del C-biomasa microbiana según Jenkinson (1988) se aplica la fórmula siguiente: $mgC = (B - V) \cdot NE$.

Donde:

B = volumen (mL) de ácido requerido para titular el NaOH desde el blanco (sin suelo).

V = volumen (mL) de ácido necesario para titular el NaOH en las muestras.

N = normalidad del ácido

E = peso equivalente (C, PE=6).

Se expresa en μg de C/g suelo y/o rizosfera. Para lo cual se multiplica por 1000, por 5 (volumen NaOH usado) y se divide por el peso de la muestra de suelo (50 g).

Para expresarlo en términos de C-biomasa:

$$\text{C-biomasa} = (\text{C}_t - \text{C}_c) / \text{K}_c$$

Donde:

C_t = $\mu\text{gC/g}$ suelo en la muestra fumigada

C_c = $\mu\text{gC/g}$ suelo en la muestra control no fumigada

K_c = 0.45

5.6. Análisis estadístico

La delimitación de zonas de estudio se realizó en base al promedio de los HTPs por punto, se indica en el apartado 5.4 de esta tesis. Se utilizó el procedimiento de Duncan ($p \leq 0.05$) con el programa Statistical Analysis System versión 8.01 (SAS, 2005) para: 1) Las medias de los hidrocarburos totales del petróleo según la profundidad y por zona, 2) la media de producción de materia seca aérea de *L. hexandra*, cantidad de raíz, la población de bacterias heterótrofas, bacterias fijadoras de N de vida libre, solubilizadoras de fosfato y hongos heterótrofos en suelos no rizosférico y rizosférico se realizó según los contenidos de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo, por zona, 3) la media de tasa de respiración (CO_2) y C-biomasa en suelos rizosférico y no rizosférico por zona según el tiempo de incubación (día 2, 14, 21, 42 y 63).

CAPÍTULO VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Distribución de los hidrocarburos totales del petróleo en Gleysol

El contenido de los HTPs de las 56 muestras de los 14 puntos colectados en el suelo rizosférico de *L. hexandra* (capas 1, 2 y 3) presentaron diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) (Cuadro 5). Los mayores contenidos de HTPs fueron en suelo rizosférico 9463 mg kg^{-1} en el punto 19, zona 3; las capas 1, 2 y 3 con 15146 , 17876 y 12991 mg kg^{-1} , respectivamente, en los puntos 1 y 14 de la zona 4. Las menores concentraciones de HTPs se localizaron en 13 puntos de 14 en donde se colectó rizosfera de *L. hexandra*.

Los promedios de HTPs de la distribución espacial por puntos según la zona fueron 1392 , 3510 , 5573 y 7543 mg kg^{-1} en las zona 1, 2 3 y 4, respectivamente (Figura 13). Los contenidos promedios de HTPs en las zonas 2, 3 y 4 rebasan los límites máximos permisibles de fracción pesada según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013), pero en la zona 1 los hidrocarburos del petróleo se mantienen dentro de los límites normales.

En las zonas 1, 2, 3 y 4 las medias de los HTPs en rizosfera de *L. hexandra* y en las tres capas fueron diferentes (Duncan, $p \leq 0.05$); la cantidad de HTPs aumentó gradualmente al aumentar la profundidad del suelo (Figuras 13 a, b, c y d).

La zona 1 presentó niveles de 292 (rizosfera), 912 (capa 1), 1751 (capa 2) y 2617 mg kg^{-1} de HTPs (capa 3) (Figura 13a), los cuales están por debajo de los límites máximos permisible de fracción pesada de hidrocarburos en suelo según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013). Esta zona se ubica en el área central de la finca e integra los puntos P3, P4, P5, P6 y P6 (Figura 14).

Cuadro 5. Concentración de hidrocarburos totales del petróleo por puntos y espacios de muestreo en cada zona de la finca.

Zona	Punto	Suelo	Distribución espacial/ profundidad (cm)		
		rizosférico	Capa 1 (0-15)	Capa 2 (15-30)	Capa 3 (30-70)
Hidrocarburos totales del petróleo (mg kg ⁻¹)					
1	1	205d	1220b	1712b	1428c
	3	405d	435b	889b	3064bc
	4	209d	525b	805b	4055bc
	5	511d	1304b	1568b	1544c
	6	130d	1077b	3784ab	2995bc
	$\bar{X} =$	292±159B	912±404B	1751±1204B	2617±1115A
	CV	54.45	44.29	68.76	42.6
2	2	357d	1355b	11362ab	399c
	7	114d	718b	6425b	6385abc
	8	575cc	2680b	4480ab	5027bc
	10	780cd	2788b	3277ab	7975abc
	$\bar{X} =$	601±539B	1885±1015AB	6386±3561B	4946±3262A
	CV	89.6	53.84	55.76	65.9
3	11	2769b	1134b	7393ab	10608ab
	12	9463a	9593ab	1239b	4205bc
	13	217d	2736b	13065ab	4464bc
	$\bar{X} =$	4148±4775A	4487±4493AB	7 232± 5914B	6 425±3624A
	CV	115.08	100.1	81.7	56.40
4	1	580d	15146a	10625ab	1501c
	14	687cd	947b	17876 a	12991a
	$\bar{X} =$	633±75.6B	8 046±1040A	14250±5127A	7 246 ±8124A
	CV (%)	11.94	124.7	35.9	112.1

Letras entre medias generales presentan diferencias estadística significativas (Duncan p≤0.05, a>b, n=Z1:15, Z2:12, Z3:9, Z4:6). Letras mayúsculas indican medias entre zonas y letras minúsculas indican medias entre los puntos de cada zona.

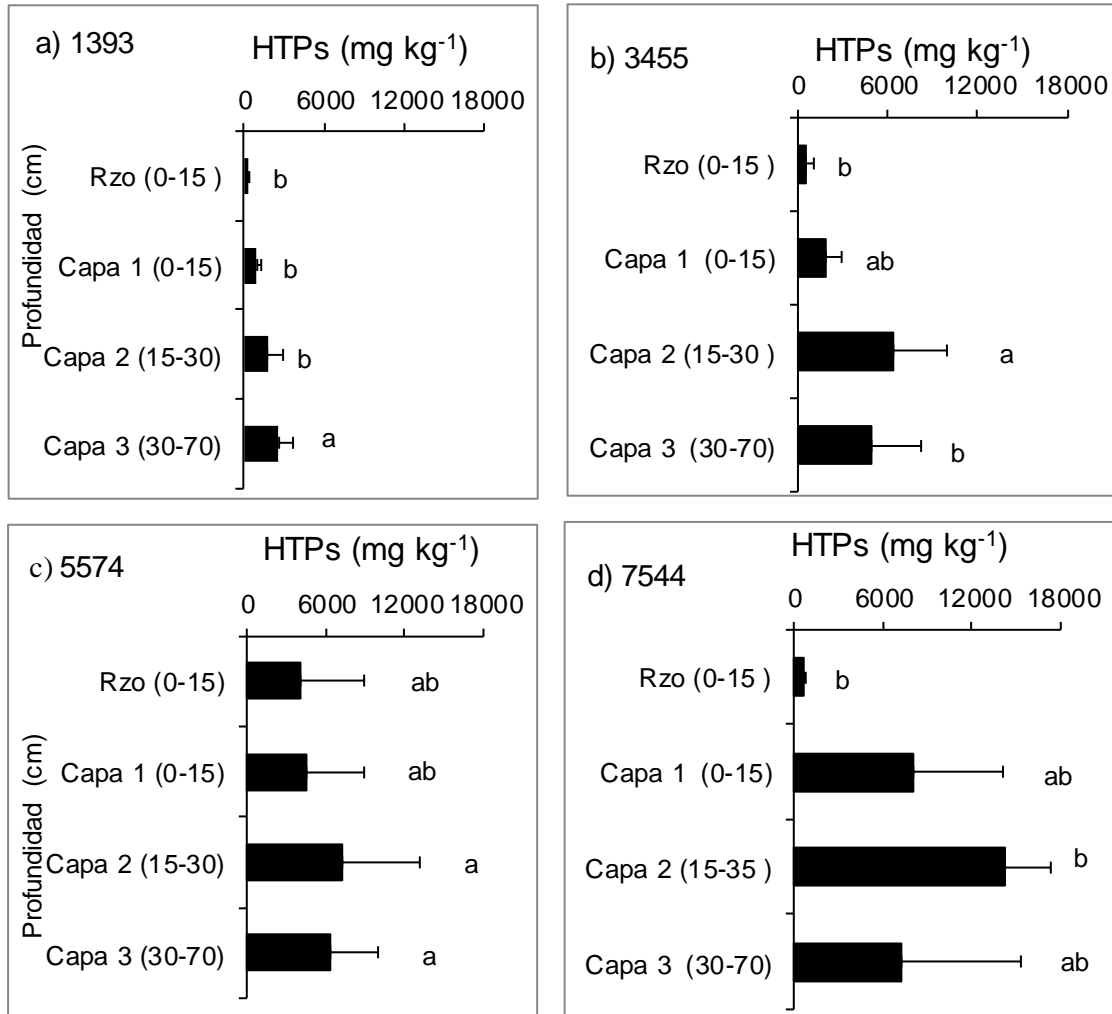


Figura 14. Distribución vertical de hidrocarburos totales del petróleo en el suelo Gleysol de cuatro zonas de la finca. a). Zona 1, b). Zona 2, c). Zona 3, d). Zona 4. Letras diferentes por columnas en cada zona indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, n en Z1=5, Z2=4, Z3=3 y Z4= 2).

La zona 2 con niveles de 602 (rizosfera), 1885 (capa 1), 6386 (capa 2) y 4947 mg kg⁻¹ de HTPs (capa 3) (Figura 13b) muestra contenidos por arriba de los límites máximos permisibles para los seres vivos en la capa 2 y 3. La zona 3 con niveles de 4149 (rizosfera), 4487 (capa 1), 7232 (capa 2) y 6225 mg de HTPs (capa 3) son superiores al límite máximo permisible para los seres vivos en los cuatro espacios (Figura 14c). Esta zona se ubica al oeste de la pera del pozo taponado La Venta

331 (Figura 5), se relaciona con el derrame de ductos enterrados sin uso actual, ubicados a un metro de profundidad.

La zona 4 presentó niveles de 633 (rizosfera), 8046 (capa 1), 14250 (capa 2) y 7246 (capa 3) de HTPs (Figura 14d), las cantidades en las tres capas son superiores al límite máximo permisible para los seres vivos. Esta zona se ubica cerca de ductos que conducen petróleo crudo (P1, zona 4, Figura 5) y en la presa de tratamiento de suelo con petróleo (P14, zona 4, Figura 5)

Los HTPs derivados del petróleo intemperizado están presentes en menor concentración en la rizosfera de *L. hexandra* y en suelo superficial y comparado con lo observado en capas subyacentes en las cuatro zonas de la finca evaluada. Diferentes estudios indican que en la profundidad del suelo de 0-30 cm de fincas aledañas a infraestructura petrolera se presentan contenidos entre 652, 65890 a 115000 mg kg⁻¹ de HTPs (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Rivera-Cruz, 2011b; Zhu *et al.*, 2013); 1005 a 7227 y 7794 a 32522 mg kg⁻¹ de hidrocarburos fracción ligera y mediana, respectivamente (Uribe-Hernández *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013; Rodríguez-Vázquez *et al.*, 2016).

Los contenidos de HTPs en las cuatro zonas presentaron un patrón creciente a medida que aumentó la profundidad del suelo. La rizosfera y la capa 1 (0-5 cm) funcionaron como bioestimuladores de la remoción del petróleo por la menor acumulación respecto a las capas subyacentes que contienen mayor contenido. Sin embargo Rivera-Cruz *et al.* (2002) en suelo Gleysol con vertido reciente y crónico de petróleo reportan contenidos mayores de HTPs en horizontes superficiales, que se caracterizan por los altos contenidos de materia orgánica y argumentan que el movimiento del petróleo depende del poro del suelo y es restringido particularmente por la sección más reducida del poro, localizado en horizontes subyacentes.

En la capa superficial (0-5 cm) las raíces de *L. hexandra* están presentes en el suelo sin contaminación, se extiende de manera horizontal pero no penetra en

horizontes subyacentes contaminados, forma la rizosfera extendida sobre la superficie del suelo en contacto con el agua superficial del humedal. Al respecto, Kechavarzi *et al.* (2007) identificaron que las raíces del pasto ryegrass exploran las partes no contaminadas del perfil del suelo y que con el tiempo las raíces se extendieron dentro de la capa contaminada. Así mismo, la disminución de la concentración de HTPs en el suelo puede ser por el tiempo de exposición del petróleo al ambiente (Adam y Duncan, 2002).

Un factor que contribuye a la remoción de los HTPs en rizosfera son los microorganismos que degradan y estabilizan a los hidrocarburos del suelo bajo condiciones aeróbicas (Cunningham *et al.*, 1996; Muratova *et al.*, 2012). Otro factor puede ser que en capas subyacentes los HTPs se acumulan a través del tiempo por arrastre del agua, el aceite penetra a través de las grietas del suelo en época de inundación y sequía, las fracciones de hidrocarburos pesados se adhieren y quedan adsorbidos en las partículas del sustrato expuesto, asumen una forma de mota en agregados y consistencia parecida al alquitrán (Mehrasbi *et al.*, 2003). Las fracciones acumuladas en el subsuelo del Gleysol evaluado permanecen en condiciones anaeróbicas la mayor parte del año, estas condiciones según Pravecek *et al.* (2005), McGill (2007) y Madigan *et al.* (2009) inducen menor velocidad de degradación de los hidrocarburos policíclicos aromáticos al no dispone de oxígeno como captador de electrones.

6.1.1. Contenido de hidrocarburos totales del petróleo en suelo y rizosfera de *Leersia hexandra* por zonas

La rizosfera es el espacio integrado por raíces y suelo de la capa 1 (0-15 cm) en las cuatro zonas de la finca. La mayor cantidad de HTPs se localizó en la capa 1, sin raíz, y las menores en la rizosfera en las cuatro zonas (Cuadro 6). Esta respuesta indica que la rizosfera acumula menor cantidad de HTPs respecto al suelo de la capa 1. El efecto de la rizosfera en la disminución de HTPs fue de 3.12, 3.13, 1.08 y 12.71 veces respecto a la capa 1.

Cuadro 6. Efecto de la rizosfera en la acumulación de hidrocarburos totales del petróleo por zonas.

Zonas/ HTPs (mg kg ⁻¹)	Hidrocarburos totales del petróleo		Efecto rizosfera
	Suelo rizosférico (R)	Capa 1 (0-15 cm)	Capa1/R
Z1: 1393	292	912	3.12
Z2: 3455	601	1885	3.13
Z3: 5574	4149	4487	1.08
Z4: 7544	633	8046	12.71

HTPs: Hidrocarburos totales del petróleo (mg kg⁻¹). n=18 (Z1), n=9 (Z2), n=9 (Z3), n=6 (Z4)

El efecto rizosfera indica la disminución de los HTPs por la presencia de la rizosfera con respecto a los contenidos en capa1. Se obtuvo con la relación Capa1/R: es la relación de los HTPs en suelo con respecto a rizosfera. Valores mayores a 1 indica que la rizosfera indujo menor acumulación de HTPs.

La rizosfera en las zonas 1 y 2 tuvieron menores contenidos de HTPs, indujeron similar efecto positivo entre 3.12 a 3.13 en la zona 4, la rizosfera indujo una reducción mayor de HTPs (Cuadro 6). Este efecto positivo sugiere que el pasto *L. hexandra* es una especie vegetal que puede ayudar a la atenuación natural del petróleo intemperizado. Al respecto, Maldonado-Chavez *et al.* (2010) establecieron pasto *Brachiaria mutica* en suelo contaminado con 79457 mg kg⁻¹ de petróleo intemperizado y removi6 hasta un 31% respecto al suelo sin planta.

6.2. Materia seca a6rea y densidad de ra6ces de *Leersia hexandra* en las zonas de la finca

6.2.1. Distribuci6n de la materia seca a6rea de *Leersia hexandra* en las zonas de la finca

La media de materia seca a6rea de *L. hexandra* present6 diferencias estad6sticas significativas (Duncan, $p \leq 0.05$) por efecto de los HTPs en el suelo de las zonas de estudio (Figura 15). El rango de la materia a6rea producido en la finca var6 de

10.65.2 a 1658 g m⁻² en suelo sin y contaminado con HTPs. La zona 1 (testigo) produjo 4.91% menos que en la zona 2 que acumuló 3455 mg kg⁻¹ HTPs, siendo en esta zona donde se alcanzó la mayor cantidad de material aéreo de *L. hexandra* (1658 g m⁻²).

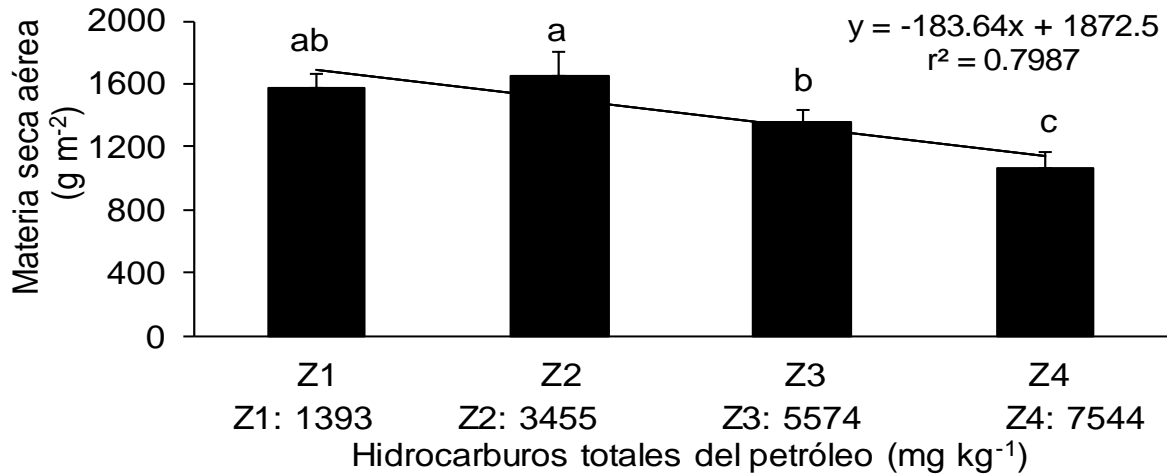


Figura 15. Variación de la materia seca aérea de *Leersia hexandra* por zonas en la finca. Letras diferentes por columna presentan diferencias estadística significativas (Duncan, $p \leq 0.05$, $a > b$, $n=8$).

La cantidad de materia seca aérea de *L. hexandra* fue directamente proporcional a la concentración de petróleo ($r^2 = 0.7987$) debido a que en la zona 2 aumentó 4.91% respecto al testigo, pero en la zona 3 disminuyó 14.1%, mientras que la zona 4 la disminución fue aún mayor la disminución en 32.4% (Figura 15). Los promedios de la materia aérea de *L. hexandra* entre zona sin contaminación (1576 g m⁻²) y zonas contaminadas (1359 g m⁻²) indican disminución de 13.78%. Resultados similares reportan Hernández-Valencia y Mager (2003) en *B. brizantha* y *P. maximum* al disminuir su biomasa foliar en un 81.37% y 98%, respectivamente, al ser expuestos a altas concentraciones de petróleo crudo.

El efecto positivo de dosis bajas de petróleo en la producción de *L. hexandra* obtenido en esta investigación, según Calabrese (2012), es atribuido al proceso de

hormesis comprobado en seres vivos expuestos a dosis de contaminantes, y se propone como una inversión estratégica que protege al ecosistema del estrés. Se argumenta que el petróleo incrementa al carbono orgánico en el suelo y los microorganismos rizosféricos hidrocarbonoclasticos que lo mineralizan (Ekundayo y Obuekwe, 2000; Wang *et al.*, 2013), pero también es una especie dominante en suelos anegados la mayor parte del año, cuya adaptación es para la sobrevivencia en microambientes donde imperan factores limitantes y alta perturbación (Sarma, 2011).

El efecto negativo (13.78%) del petróleo en la producción del pasto *L. hexandra* obtenido en esta investigación han sido reportados en otras especies de pastos por otros autores pero con un mayor efecto (Rivera-Cruz *et al.*, 2004; Xiao-Dong *et al.*, 2004; Merkl *et al.*, 2005; Muratova *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2013). Rivera-Cruz *et al.* (2004) reportan 41 y 32 % menor biomasa de *E. polystachya* y *B. mutica* en suelo con 9035 mg kg⁻¹ de HTPs intemperizados. Merkl *et al.* (2005) informan que la biomasa aérea de *C. aggregatus* y *E. indica* se inhibe un 30.1 y 46.8 % a los 180 d en suelo con 5% de petróleo crudo. Xiao-Dong *et al.*, (2004) reconoce menor a 50% la reducción de la biomasa de los pastos *Festuca arundinacea* y *Poa pratensis* en suelo con 2 y 3 g kg⁻¹ de creosota después de 120 días. Muratova *et al.* (2012) confirmaron que la biomasa aérea de maíz se redujo 63 a 97% en suelo con 1% de diésel, por su parte Zhu *et al.*, (2013) encontraron decrecimiento en la biomasa desde 5.3 a 1076.5 g m⁻² en *Phragmites australis* en suelo con 652 mg kg⁻¹ HTPs.

Las plantas pueden activar sistemas de defensa que suprimen o eliminan Especies Reactivas de Oxígeno (ERO), lo que las hace adaptarse a factores de estrés bióticos y abióticos (Demidchik, 2015), ejemplos son la falta de agua y por salinidad (Ruíz y Terenti, 2012), presencia de metales pesados (Liu *et al.*, 2011) y contaminantes (Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012). El pasto *L. hexandra* ha sido reportado como tolerante a contaminación por cromo (Liu *et al.*, 2015) y a petróleo fresco (Arias, 2012; González, 2015; Alejandro, 2016).

6.3. Distribución de raíces de *Leersia hexandra* en las zonas de la finca

La cantidad de raíces finas no presentaron diferencias estadísticas (Duncan, $p \leq 0.05$) pero las raíces delgadas y gruesas si tuvieron diferencias estadísticas (Duncan, $p \leq 0.05$) según la zona. Las medias de la cantidad de raíces finas sin diferencias estadística posiblemente fue por la desviación estándar muy alta obtenida en cada zona (Figura 16). La mayor cantidad de raíces con valores de 66 y 84 se encontraron en las zonas 2 y 3, respectivamente; la menor, con un valor de 50, en la zona 4, tuvo el mayor contenido de HTPs. Por lo anterior, el incremento de raíces es favorecido por dosis de 3455 y 5 455 mg kg^{-1} HTPs, mientras que la dosis de 7543 mg kg^{-1} redujo las raíces en 20.2% respecto a la cantidad de raíces obtenida en la zona testigo.

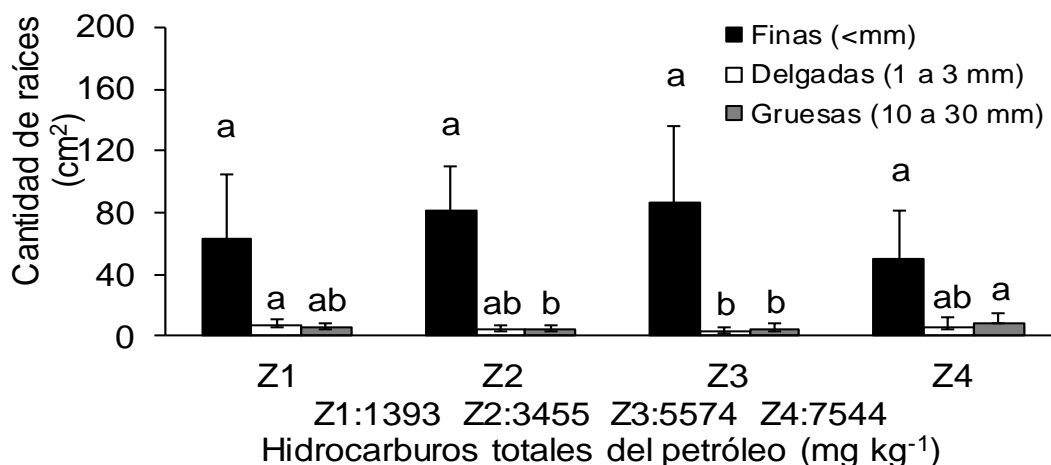


Figura 16. Cantidad de raíces finas delgadas y gruesas de *Leersia hexandra* según los contenidos de petróleo en las zonas de la finca de La Venta, Tabasco. Letras diferentes entre barras del mismo color indica diferencias estadísticas (Duncan, $p \leq 0.05$).

La mayor cantidad medias de raíces delgadas (7 dm^2) se encontró en la zona 1 con suelo no contaminado, la cantidad disminuyó en las tres zonas que tienen

suelo contaminado. La disminución respecto a la cantidad de raíces de la zona 1 fueron 51.42, 48.6 y 17.14% en las zonas 2, 3 y 4, respectivamente.

La cantidad de raíces gruesas en las cuatro zonas varían entre 3 a 9 por dm², la mayor cantidad se obtuvo en la zona 4, que fue la de mayor contaminación, en segundo lugar fue la zona 3 con seis raíces. Es importante destacar que en las zonas 3 y 4 con mayor contaminación aumentó la cantidad de raíces gruesas.

La zona 4 con 7543 mg kg⁻¹ HTPs mostró la mayor cantidad de raíces gruesas y la menor de raíces finas. Al parecer el petróleo es un factor de estrés para el crecimiento y desarrollo de raíces finas, como lo reportado por Hernández y Mager (2003), ellos en un estudio con petróleo crudo encontraron que los hidrocarburos del petróleo inducen la disminución de la biomasa radical en *B. brizantha* y *P. maximum*, esto puede atribuirse a que el petróleo inhibe la producción de auxina, lo que hace que la planta desarrolle raíces finas. Las raíces finas son de utilidad para la nutrición y desarrollo de la planta (Taiz y Zeiger, 2006).

Lamont (2003) menciona que es posible que la planta reciba un estímulo químico asociado a la población bacteriana, que incremente la producción de raíces finas, lo que significa que donde hay mayor población bacteriana podría producirse mayor número de raíces. El desarrollo radical de las plantas está estrechamente ligada a la asociación con los microorganismos del suelo y ello conlleva a la absorción de nutrientes por las plantas (Pedraza *et al.*, 2010) lo que indica que posiblemente la adaptación de *Leersia hexandra* se debe a que su sistema radical está muy bien adaptado a los factores bióticos y abióticos que hay en dicho ecosistema.

6.4. Bacterias y hongos en suelo rizosférico y no rizosférico en suelo con petróleo intemperizado

6.4.1. Bacterias heterótrofas y promotoras del crecimiento vegetal en suelo y rizosfera por zona

Las poblaciones de bacterias heterótrofas, fijadoras de N de vida libre y solubilizadoras de P presentaron diferencias estadísticas (Duncan, $p \leq 0.05$) en cada una de las cuatro zonas por efecto de la rizosfera de *L. hexandra*. Los tres grupos de bacterias fueron mayores en suelo rizosférico que en el suelo no rizosférico, en las cuatro zonas, excepto la Zona 4, donde las solubilizadoras de P fueron menores en rizosfera (Cuadro 7). La mayor población de bacterias rizosféricas (500×10^3 UFC) se encontró en la Zona 3, el efecto rizosfera fue 45.4. La poblaciones de bacterias fijadoras de N de vida libre rizosféricas fue mayor (520×10^2 UFC) en la Zona 4, con un efecto rizosfera de 10. Las poblaciones de bacterias solubilizadoras de fosfato fue mayor (700×10^3 UFC) en la Zona 3, sin embargo, el mayor efecto rizosfera fue en la Zona 1 (sin contaminación).

Cuadro 7. Población de bacterias en suelo rizosférico de *Leersia hexandra* y suelo no rizosférico en cuatro zonas sin y con petróleo en un predio de La Venta, Tabasco.

Zona/ HTPs (mg kg ⁻¹)	Heterótrofas (10 ³ UFC g ⁻¹ s.s)		Efecto□	Fijadoras de N (10 ² UFC g ⁻¹ s.s)		Efecto	Solubilizadora P (10 ³ UFC g ⁻¹ s.s)		Efecto
	SR§	SNR§§		SR	SNR		SR	SNR	
	1: 1393	140ab¶	43b	3.25	180b	38bc	4.7	150ab	2b
2: 3455	320ab	44b	7.27	100b	27bc	3.7	480a	20b	24
3: 5574	500a	11bc	45.4	360b	120b	3	700a	81b	8.64
4: 7552	220ab	90b	2.44	520a	52bc	10	29b	110ab	0.26

§Suelo rizosférico, §§suelo no rizosférico, □efecto de la rizosfera indica el aumento en el número de bacterias en la rizosfera con respecto al suelo no rizosférico. Se obtuvo con la relación SR/SNR. ¶Por cada tipo de bacterias, las zonas con letras diferentes indican diferencias significativas (Duncan, $p=0.05$, $n=5$).

Diferentes estudios han identificado que la rizosfera de los pastos en suelos contaminados con petróleo son hospederos e incrementan la población de bacterias heterótrofas y promotoras del crecimiento vegetal (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Kirk *et al.*, 2005). El incremento de rizobacterias en *L. hexandra* en suelo con petróleo intemperizado ya fue reportado en otros estudios. Rivera-Cruz (2011b) encontró poblaciones del orden de 10^3 UFCs de *Azospirillum*, *Azotobacter* y solubilizadoras de P en los pastos *Cynodon plectostachyus*, *E. polystachya* y *Paspalum virgatum* evaluadas en suelo con 25000 y 65589 mg kg⁻¹ HTPs. Miranda-Martínez *et al.* (2007) indican valores de 10.9×10^4 UFCs de bacterias fijadoras de N de vida libre en *E. polystachya* cultivada en suelo con 30 mg kg⁻¹ del hidrocarburo poliaromático fenantreno. Así mismo, Shahsavari *et al.* (2013) encontraron que la rizosfera de maíz y trigo incrementa la actividad de los microbios hidrocarbonoclasticas respecto al suelo testigo.

6.4.2. Efecto del petróleo en bacterias

El efecto del petróleo intemperizado en las UFC de bacterias heterótrofas, fijadoras de N y solubilizadoras de fosfato en suelo rizosférico fue positivo. Los valores promedios fueron 346×10^3 , 326×10^2 y 403×10^3 UFC g⁻¹ r.s., respectivamente. En el suelo no rizosférico contaminado se encontró similar efecto positivo del petróleo en los tres tipos de bacterias, pero con menor población respecto al suelo rizosférico, las poblaciones fueron 48×10^3 , 66×10^2 y 70×10^3 UFC (Figura 17). En suelo sin contaminación el efecto de la rizosfera en el incremento de la bacterias heterótrofas, fijadoras de N de vida libre y solubilizadoras de fosfato fue de 3.25, 4.73 y 75 veces con respecto a suelo no rizosférico. En suelo contaminado el incremento de los tres grupos de bacterias fue del orden de 7.2, 4.93 y 1.9, respectivamente. La relación de los HTPs con bacterias heterótrofas y solubilizadoras de P fue positiva; $r^2 = 0.448^*$ y 0.741^{**} , respectivamente.

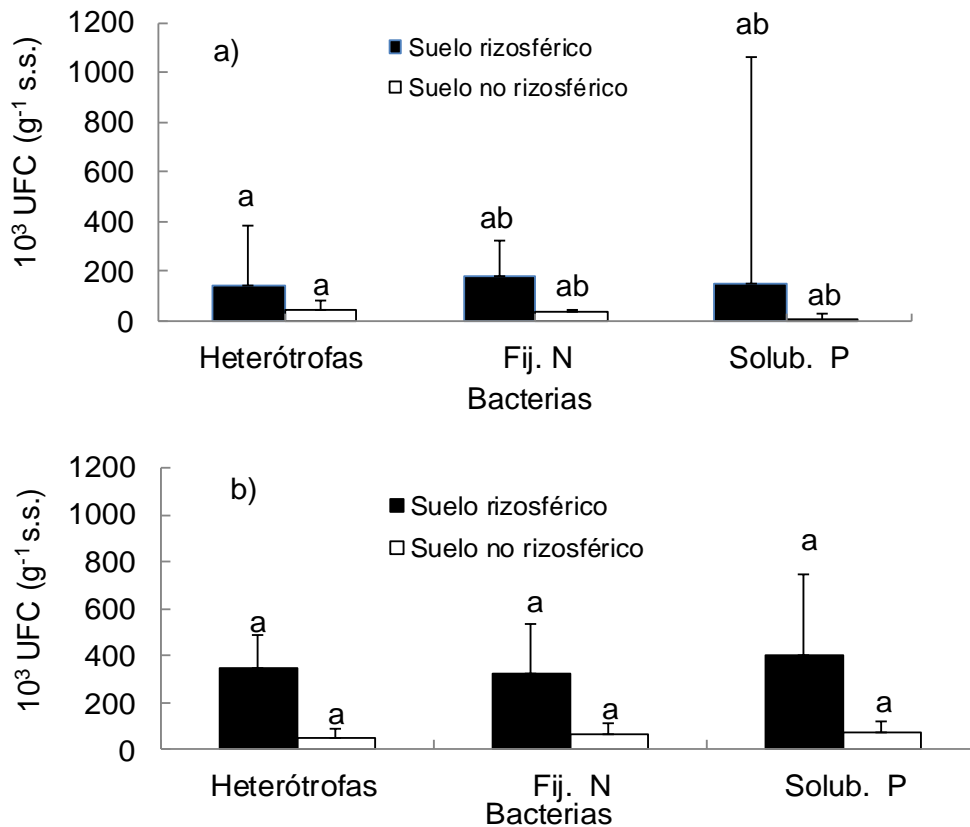


Figura 17. Población de bacterias heterótrofas y reguladoras del crecimiento vegetal en suelo sin contaminación y contaminado con petróleo. Letras diferentes por cada tipo de bacterias indican diferencias significativas (Duncan, $p \leq 0.05$).

El efecto positivo del petróleo en la estimulación de la población de bacterias, encontrado en esta investigación, es similar al reportado por Amadi *et al.* (1996), Abbasian *et al.* (2016), Kirk *et al.* (2005), Gaskin y Bentham (2010), que identificaron que la biomasa microbiana aumenta en suelos contaminados con hidrocarburos, atribuyen a que los microbioorganismos degradadores de hidrocarburos se correlacionan de manera positiva con la distribución de petróleo en el ambiente. Este tipo de bacterias, en la rizosfera de *L. hexandra* y suelo contaminado con petróleo intemperizado, son benéficas en el suelos degradados

con la contaminación debido a que realizan la fijación de N de vida libre y solubilizan P, pero además mitigan los efectos tóxicos del contaminante sobre la planta durante el cometabolismo, al exudar la enzima ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico desaminasa, monooxigenasas y dioxigenasas que hidrolizan los HTPs en presencia de oxígeno (Pothuluri y Cerniglia, 1994; Badalucco y Kuikman 2001; Xiao-Dong *et al.*, 2004).

6.4.3. Población de hongos heterótrofos en suelo rizosférico y no rizosférico por zona

La población de hongos heterótrofos en suelo rizosférico y en suelo no rizosférico de *L. hexandra*, en las cuatro zonas evaluadas en la finca, presentan diferencias estadísticas (Duncan, $p \leq 0.05$) por efecto de la concentración de HTPs (Figura 18). En las cuatro zonas la mayor población de hongos fue en suelo no rizosférico respecto al suelo rizosférico, por lo tanto la rizosfera no estimula el crecimiento de los hongos. En suelos rizosférico y no rizosférico se observó la tendencia de disminución de la población de hongos a partir de la Zona 2, se encontró la mayor población en ambos microespacios evaluados, pero las poblaciones disminuyeron en las zonas 3 y 4.

En la zona 1 sin contaminación se contó la menor población de hongos (13×10^1 y 47×10^1) en suelo rizosférico y no rizosférico, respectivamente. La Zona 2 con una población de hongos en suelo no rizosférico de 17×10^2 UFC g^{-1} s.s, mientras que en la rizosfera solo fue de 48×10^1 . La Zona 3 con 5574 mg kg^{-1} de HTPs alcanzó una población de 91×10^1 UFC en suelo no rizosférico y disminuyó a 14×10^1 en suelo rizosférico. En la zona 4 con 7544 mg kg^{-1} la población fue de 47×10^1 y 21×10^1 en suelo no rizosférico y rizosférico, respectivamente.

La presencia de hidrocarburos tiene un efecto positivo en las poblaciones de hongos en la zona 2. Merkl *et al.*, (2005b) mencionan que los microorganismos que habitan la rizosfera pueden ser estimulados o inhibidos en función de la

actividad fisiológica y capacidad de crecimiento de la planta en presencia de contaminantes. No obstante, Merkl *et al.*, (2006) encontraron que poblaciones de hongos en suelo rizosférico de *B. brizantha* y en suelo no rizosférico fue relativamente mayor en el suelo contaminado que en suelo no contaminado.

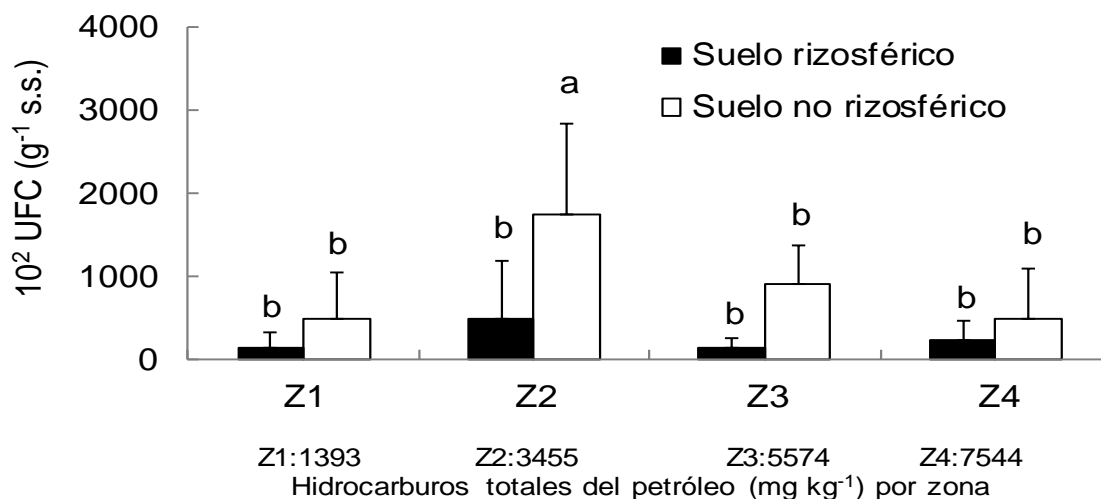


Figura 18. Efecto de los hidrocarburos del petróleo en la población de hongos heterótrofos en rizosfera y suelo según las zonas en la finca. Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas significativas (Duncan, $p=0.05$, $a>b$, $n=5$).

6.4.4. Efecto del petróleo intemperizado en la población de hongos heterótrofos en suelo rizosférico y no rizosférico

La media de la población de hongos heterótrofos fue estadísticamente diferente por efecto del microespacio evaluado en suelo sin contaminación y suelo contaminado (Duncan, $p\leq 0.05$) (Figuras 19 a y b). La población mayor de hongos en suelo no rizosférico sin contaminación fue de 47×10^1 , fue 3.55 veces mayor respecto al suelo rizosférico. En suelo no rizosférico contaminado la población de hongos mayor fue de 10×10^2 , 3.7 veces mayor respecto al suelo rizosférico.

El comportamiento de la población de hongos fue similar a lo reportado por Sangabriel *et al.*, (2006) quienes encontraron que las poblaciones de hongos filamentosos fueron mayores en presencia de combustóleo que en suelo no contaminado. De igual forma Li *et al.*, (2007) mencionan que las poblaciones de hongos se correlacionaron positivamente con los HTPs en el suelo a una concentración de 5000 mg kg⁻¹.

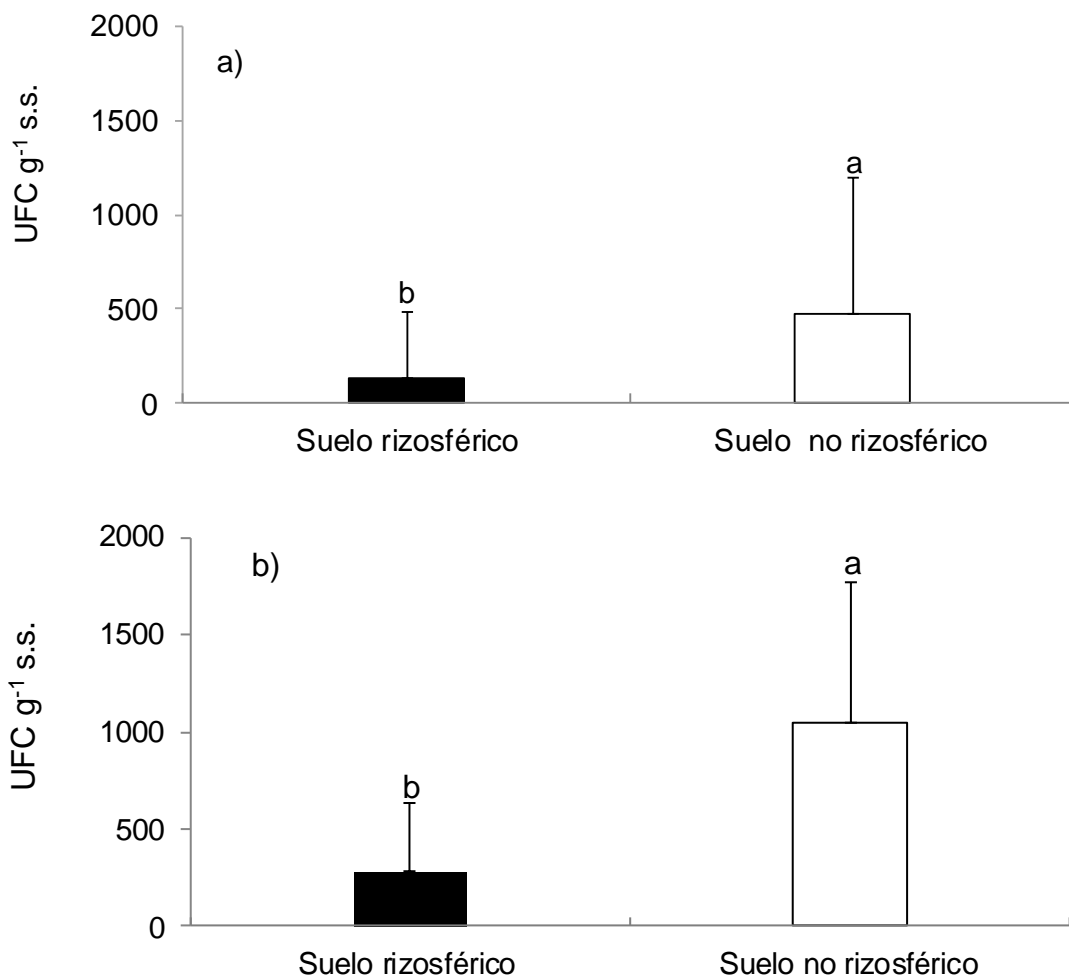


Figura 19. Efecto del petróleo en la población de hongos heterótrofos. a) Zona sin contaminación (n=5) y b) Zona contaminada (n=15). Letras diferentes en las barras indican diferencias estadísticas (Duncan, p=0.05, a>b).

6.5. Respiración microbiana

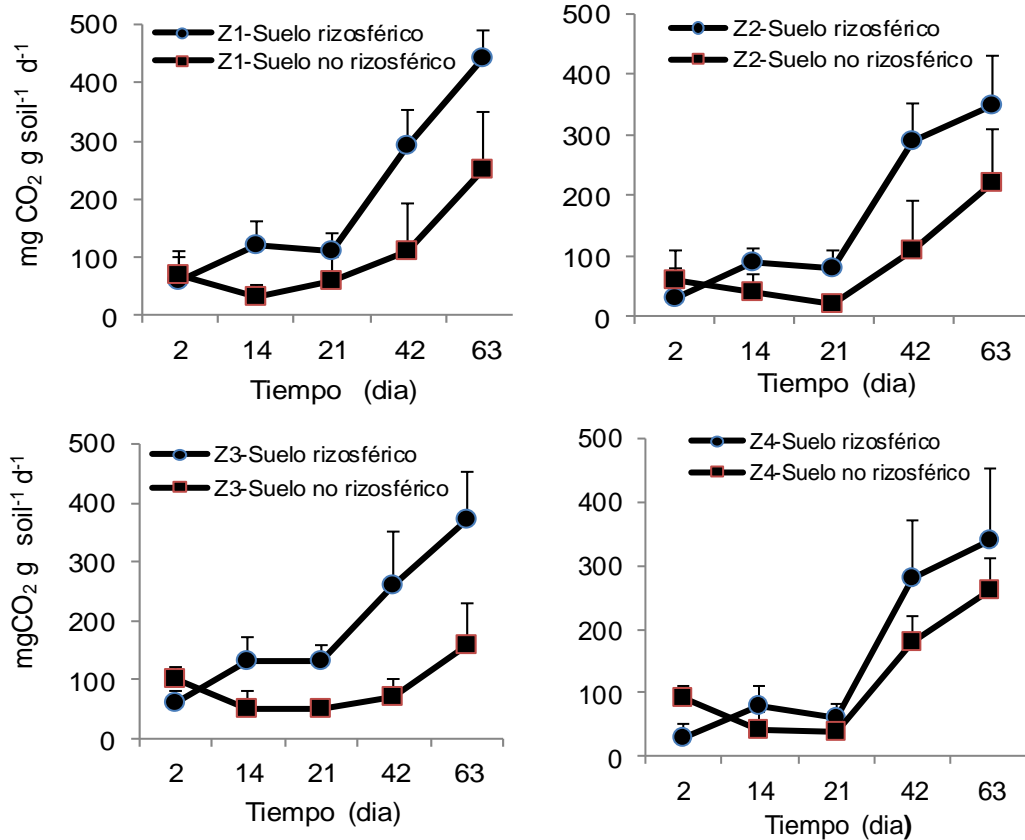
La respiración microbiana en forma de CO₂ que se evaluada proviene de los microorganismos adheridos a raíz y el suelo (Badalucco y Kuikman, 2001). En esta investigación la respiración microbiana, cuantificada en cinco tiempos sucesivos en rizosfera y en suelo no rizosférico bajo condiciones controladas, indica que a partir del día 14 posterior a la incubación fue mayor en la rizosfera respecto al suelo no rizosférico en las cuatro zonas (Figura 20).

En suelos rizosférico y no rizosférico se observa disminución de la respiración microbiana en los primeros tres tiempos iniciales (1, 14 y 21 días) y aumentó a altos días 42 y 63. La liberación de CO₂ mostró al inicio la fase lag de crecimiento microbiano y cambió a la fase logarítmica los días 42 y 63 (Figura 20). Resultados similares fueron obtenidos por Baptista *et al.*, (2005) en un experimento con 9700 mg kg⁻¹ HTPs derivado de petróleo crudo durante 45 días.

La respiración al inicio de la incubación (día 1) fue menor o igual a 100.37 mg CO₂ en rizosfera y suelo para todas las zonas, después aumentó en los siguientes tiempos evaluados, y el incremento fue notorio a partir del día 63. En la Zona 1 (sin contaminación) el máximo valor de respiración de suelo rizosférico fue 440 mg CO₂, fue superior en 43.1% que el valor observado en suelo no rizosférico. En las zonas 2, 3 y 4 (contaminadas) la respiración en suelo rizosférico tuvo máximos que fueron de 320, 370 y 340 mg CO₂, fueron 31.3, 56.8 y 23.5 veces mayor que los valores del suelo no rizosférico, respectivamente.

Los resultados de la producción de CO₂ en rizosfera y suelo sin petróleo intemperizado (zona 1) y con petróleo en las zonas 2, 3 y 4 en cinco tiempos son presentados en la Figura 20. Se observa en los primeros tres tiempos (días 1, 14 y 21) baja producción de CO₂ en rizosfera, suelo sin y con petróleo intemperizado, pero a partir del día 42 aumentó, siendo más acentuado en suelo rizosférico. En suelo rizosférico sin contaminación (Z1) el máximo valor fue de 440 mg CO₂, fue

21.8% mayor respecto al suelo rizosférico contaminado, produjo 343.9 mg CO₂. En suelo no rizosférico sin contaminación el máximo valor fue de 213.65 mg, fue 14.8% veces mayor respecto a suelo no rizosférico contaminado (Figura 20).



6.5.1. Efecto rizosfera en la respiración microbiana

El efecto rizosfera ocurrió el día 21, 42 y 63 después de la incubación del suelo proveniente de las cuatro zonas (Cuadro 8). El día 21 el máximo efecto rizosférico fue de 3.9 en la zona 2, el mínimo en la zona 4. Esto sugiere que el suelo de la zona 2 con 3455 mg kg⁻¹ de HTPs estimuló la liberación de CO₂, pero al exponer a los microorganismos a mayor concentración de petróleo (7552 mg kg⁻¹) la respiración microbiana en suelos rizosférico y no rizosférico se inhibió.

Cuadro 8. Incremento del CO₂ en tres tiempos por efecto de la rizosfera de *Leersia hexandra* en suelo sin y contaminados con petróleo

Zona	mgCO ₂ g suelo ⁻¹ d ⁻¹								
	Día 21			Día 42			Día 63		
	SR	SNR	Efecto [§]	SR	SNR	Efecto [§]	SR	SNR	Efecto [§]
1	110.1	60.2	1.79	290.9	110.8	2.6	440	250.2	1.75
2	80.7	20.4	3.9	290.1	110.7	2.6	350.4	220.1	1.59
3	130.3	50.1	2.6	260	70.2	3.7	370.1	160.2	2.31
4	60.5	40.2	1	280.9	180.7	1.5	340.8	260.7	2.45

[§]Se obtuvo de la relación rizosfera y suelo. Si los valores son igual a 1, no hay efecto rizosfera. Si los valores son menores a 1 sin efecto rizosfera. Si los valores son mayores a 1 existe efecto. R: Rizosfera. S: Suelo.

El efecto máximo mostrado el día 42 fue de 3.7 mg en la zona 3 y el mínimo fue 1.5 en la zona 4. El día 63 se encontró el mayor efecto rizosfera en la zona 4 con 2.45, la cual es la zona con mayor contenido de hidrocarburos y el menor efecto en la zona 2 con 1.59, con 3455 mg kg⁻¹ de HTPs. Estos resultados evidencian que el petróleo induce un efecto positivo a los 63 días no siendo así en las zonas con menor concentración. Merkl *et al.*, (2005b) mencionan que los microorganismos con capacidad de crecimiento usando como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos del petróleo, participan en proceso cometabólicos, es decir, utilizan de manera simultánea moléculas orgánicas derivadas de carbohidratos e hidrocarburos, los cuales son degradados.

El efecto rizosfera encontrado en esta investigación ha sido reportado por diversos investigadores (Aciego, 1998; Germida *et al.*, 2002; Pérez-Armendáriz *et al.*, (2010). Ellos argumentan que en la rizosfera convergen gran cantidad de microorganismos debido a la disponibilidad de agua y nutrientes, lo que conlleva a una mayor población en este sitio comparado con suelo sin vegetación. En la rizosfera establecida en suelo contaminado con 65000 mg kg⁻¹ de petróleo intemperizado se encontró que en tratamientos de suelo no estériles mostró mayor

acumulación de CO₂ que en los tratamientos que fueron esterilizados, esto quiere decir que en suelos donde no se altera la microbiota nativa existe mayor actividad metabólica de los microorganismos (Pérez-Armendáriz *et al.*, 2010). La importancia de la rizosfera de *L. hexandra* en suelos, sin y contaminados en las cuatro zonas, es un indicador que sugiere un proceso metabólico que contribuye a la degradación de los HTPs, proceso que según Kaimi *et al.*, (2006) sucede en suelos con hidrocarburos del petróleo.

6.5.2. Efecto del petróleo en la respiración microbiana

Los resultados de la producción de CO₂ en suelos rizosférico y no rizosférico sin petróleo intemperizado (Zona 1) y los promedios obtenidos en las zonas 2, 3 y 4 en cinco tiempos (suelo con petróleo) son presentados en la Figura 21a y 21b. Se observa en los primeros tres tiempos (Días 1, 14 y 21) baja producción de CO₂ en rizosfera, en suelo sin y con petróleo intemperizado, en cambio a partir del día 42 y 63 aumentó la producción de CO₂. En suelo rizosférico sin contaminación (Z1) el máximo valor fue de 440 mg CO₂, fue 21.8% mayor respecto al suelo rizosférico contaminado que produjo 343.9 mg CO₂. En suelo no rizosférico sin contaminación el máximo valor fue de 213.65, fue 14.8% veces mayor respecto al suelo no rizosférico contaminado (Figura 21a). Resultados diferentes fueron reportados por de la Garza *et al.*, (2008) al incubar lodos de refinería con 2.3, 2.66 y 5.03% de hidrocarburos, donde encontró mayor liberación de CO₂ en la concentración mayor.

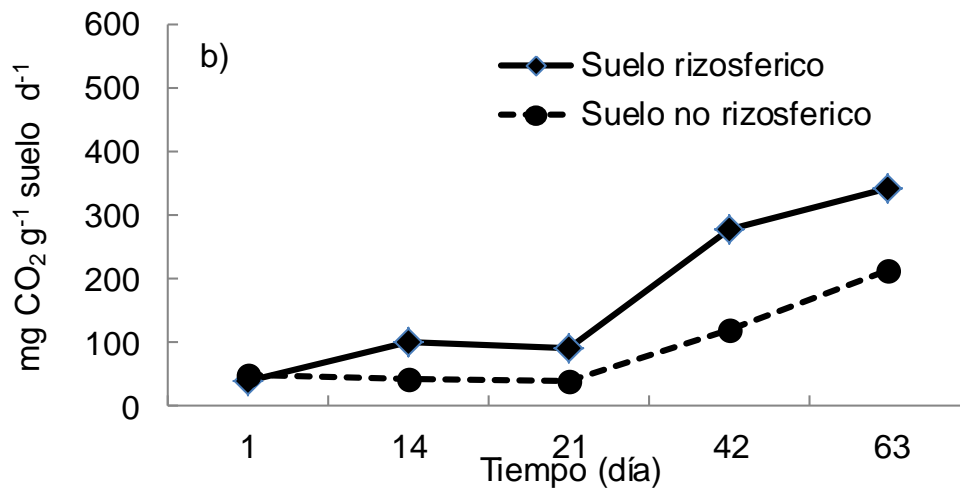
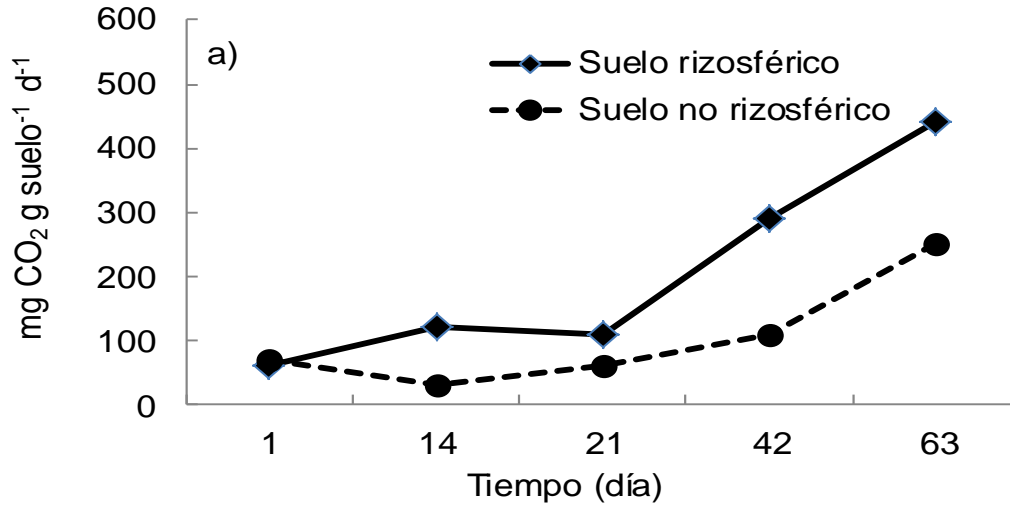


Figura 21. Respiración microbiana en suelo rizosférico y no rizosférico sin (a) y con petróleo (b) en cinco tiempos.

6.6. Carbono de la biomasa microbiana en suelo rizosfera y suelo no rizosférico de *Leersia hexandra*

6.6.1. Carbono de la biomasa por zonas en la finca

El carbono de la biomasa microbiana constituye el componente vivo de la materia orgánica del suelo, representa la fracción lábil y por lo tanto responde rápidamente al efecto de perturbación o recuperación del suelo (Ross *et al.*, 2001). En esta investigación el C-biomasa microbiana en suelos rizosférico y no rizosférico en la Zona 1, sin contaminación, y en las Zonas 2, 3, 4, tienen tendencia decreciente conforme el tiempo aumenta (Figura 22). Esto significa que en las cuatro zonas se desarrolló un proceso de mineralización del carbono orgánico, con fracciones lábiles menores conforme el metabolismo microbiano incrementa.

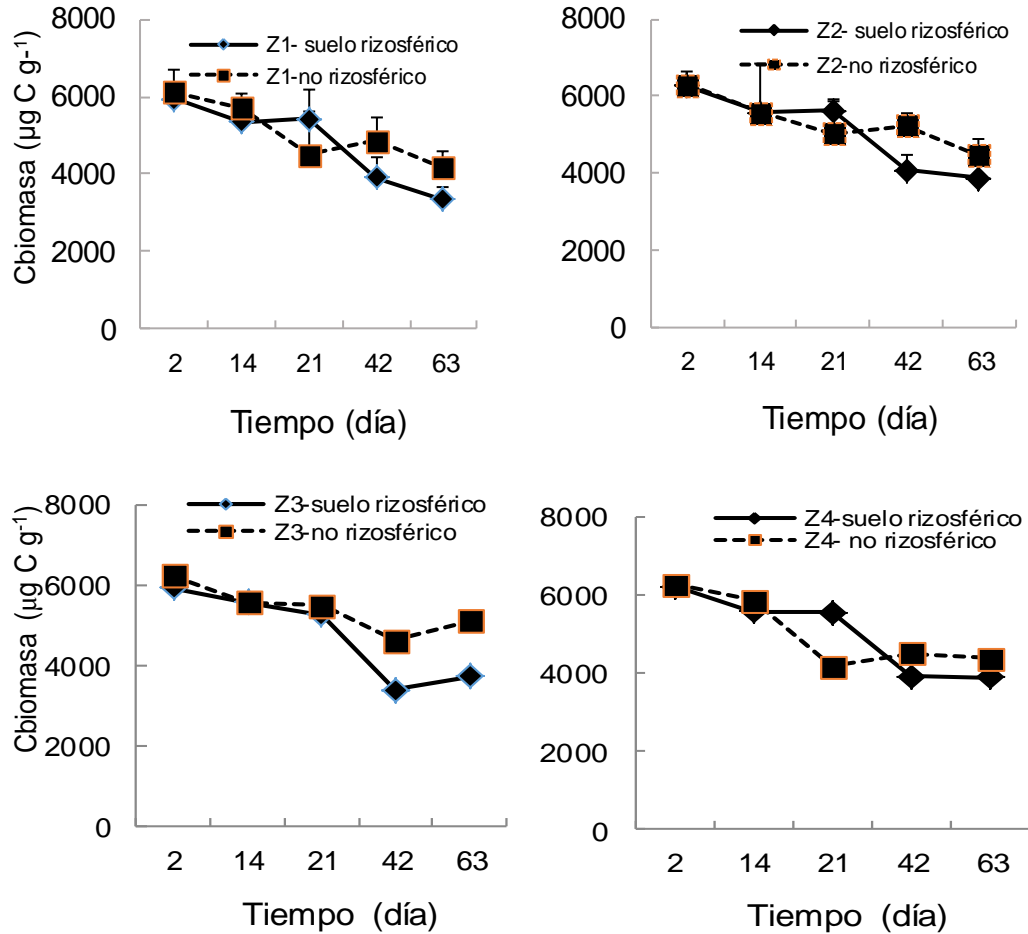


Figura 22. Carbono de la biomasa microbiana en suelo rizosférico y suelo no rizosférico en cinco tiempo después de la incubación.

La cantidad de C-biomasa fue mayor en el suelo no rizosférico respecto al suelo rizosférico en las cuatro zonas de la finca evaluada. En los tiempos 2, 14 y 21 días el C-biomasa fue similar en suelo rizosférico y en suelo no rizosférico. En la zona 1 (sin contaminación) al día 42 y 63 el C-biomasa en 50 g de suelo rizosférico fue 3916 y 3338 μgC , pero fue mayor en suelo no rizosférico que alcanzó acumular 4856 y 4174, respectivamente. En la zona 2 (3455 mg kg^{-1} HTPs) los días 42 y 63 después de la incubación, el C-biomasa en suelo rizosférico (4078 y 3858) fue menor al acumulado en el suelo no rizosférico. En la

zona 3 (5574 mg kg⁻¹ HTPs) los días 42 y 63, después de la incubación en rizosfera, acumuló 3909 y 3898 µg C g⁻¹.

El suelo rizosférico de *L. hexandra* indujo efecto negativo en el C-biomasa microbiana en las cuatro zonas evaluadas durante los días 42 y 63 después de la incubación. Al día 42 la disminución fue del orden de 0.81, 0.78, 0.73 y 0.86 veces en las zonas 1, 2, 3 y 4, respectivamente. El día 63 la disminución fue 0.79, 0.86, 0.72 y 0.88 en las zonas 1, 2, 3 y 4 (Cuadro 9). La menor acumulación del C-biomasa microbiana inducida por la rizosfera muestra el potencial de este espacio para la mineralización del carbono lábil.

6.6.2. Efecto del petróleo en el C-biomasa

El efecto del petróleo en el C-biomasa acumulado en suelo sin contaminación (Figura 23a) y contaminado (Figura 23b) fue mayor en suelo no rizosférico al día 42 y 63 respecto al suelo rizosférico. En suelo rizosférico contaminado aumentó 0.03, 0.04, 0.01, y 0.41 veces al día 2, 14, 21 y 63 respecto al suelo rizosférico no contaminado. Así mismo, en suelo no rizosférico contaminado el C-biomasa microbiana incrementó 0.02, 0.08 y 0.11 veces respecto al suelo no rizosférico contaminado al día 2, 21 y 63. Por las relaciones anteriores se deduce que el incremento del C-biomasa en suelos rizosférico y no rizosférico contaminado con petróleo intemperizado es mínimo, con respecto al suelo sin contaminación. Esta respuesta puede ser a que los microorganismos nativos de suelos de las zonas contaminadas y sin contaminación realizan un metabolismo estable, utilizando como fuente de carbono y energía las reservas que cada suelo de la finca contiene.

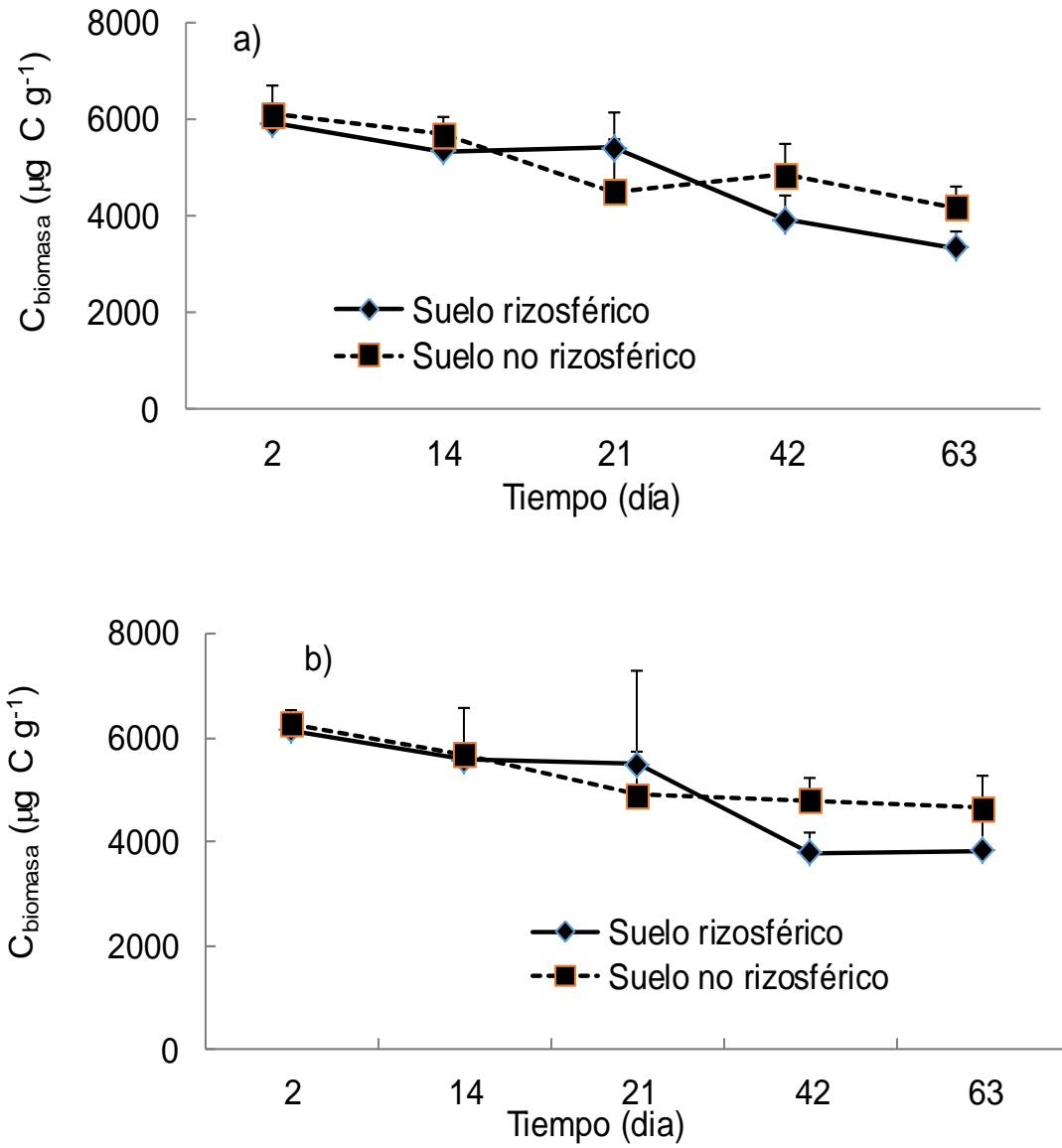


Figura 23. Efecto del petróleo en el carbono de la biomasa microbiana en zona no contaminada (a) y en zona contaminada con petróleo (b).

Cuadro 9. Efecto rizosfera en la acumulación del carbono de la biomasa microbiana ($\mu\text{g C g}^{-1}$) en 50 g de suelo rizosférico y/o suelo no rizosférico.

Zona	Día								
	21			42			63		
	SR	SNR	Efecto [§]	SR	SNR	Efecto [§]	SR	SNR	Efecto [§]
1	4516	5409	0.83	3916	4856	0.81	3338	4174	0.79
2	5631	5033	1.11	4087	5222	0.78	3858	4463	0.86
3	5281	5491	0.96	3381	4631	0.73	3727	5110	0.72
4	5567	4185	1.33	3909	4522	0.86	3898	4393	0.88

[§]Se obtuvo de la relación suelo rizosférico y suelo no rizosférico. Si los valores son igual a 1, la rizosfera influye igual que el suelo en el C-biomasa. Si los valores son menores a 1 la rizosfera no influye. Si los valores son mayores a 1.0 la rizosfera influye en el C-biomasa.

CAPÍTULO VII

CONCLUSIONES

7.1. Conclusiones generales

La presencia de la rizosfera de *Leersia hexandra* y la profundidad de la capa de suelo influyó en la distribución espacial de los hidrocarburos totales del petróleo en la finca, siendo mayor la acumulación en capas subyacentes y menor en suelo rizosférico del pasto *Leersia hexandra* y capa superficial. Esta distribución de los hidrocarburos totales del petróleo determinó la presencia de cuatro zonas: sin contaminación y tres niveles de contaminación, en ellas se genera una productividad aérea vegetal y la actividad microbiológica rizosférica de *Leersia hexandra*.

7.1.1. Conclusiones particulares

1. La contaminación en la finca es heterogénea y la concentración de los HTPs se distribuye de manera espacial-vertical en el suelo. El patrón es que al aumentar la profundidad del suelo también aumenta la concentración del petróleo en las cuatro zonas delimitadas. La rizosfera del pasto contribuye en la menor acumulación del petróleo en el suelo.
2. La materia aérea y la densidad de raíces fue mayor en las zonas 2, ahí existe hasta 3544 mg kg⁻¹ de HTPs pero en la zona 3 y 4, con mayor contaminación, (7544 mg kg⁻¹) fue menor la materia seca y la densidad de raíces del pasto, sin embargo aumentaron las densidades de las bacterias heterótrofas y rizobacterias en suelos rizosférico y no rizosférico aumentó.
3. La actividad microbiológica en la rizosfera del pasto *Leersia hexandra*, en suelos sin y contaminado, fue mayor respecto al suelo no rizosférico.

Aumentaron las densidades de las bacterias heterótrofas, bacterias fijadoras de N, bacterias solubilizadoras de fosfato y la tasa de respiración microbiana, no así en las UFC de hongos heterótrofos que fue mayor en suelo no rizosférico.

4. La tasa de respiración microbiana aumentó durante el tiempo de incubación, por la presencia de la rizosfera en suelo sin y contaminado, pero fue afectada en ambos espacios por las dosis altas de petróleo intemperizado en la finca.
5. El carbono de la biomasa microbiana fue menor en suelo rizosférico y en el suelo contaminado, esto sugiere que la mineralización del carbono lábil fue mayor, respecto al suelo no rizosférico y no contaminado.

CAPÍTULO VIII

LITERATURA CITADA

Abbasian, F., Lockington R., Megharaj M., and Naidu R. 2016. The Biodiversity Changes in the Microbial Population of Soils Contaminated with Crude Oil. *Current Microbiology*. 1-8. First online: 08 February 2016.

Adam, G., and H. Duncan. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environ. Pollut.* 120:363-370.

Adams, R.H., A. Alvarez-Ovando L., y G. Castanon N. 2015. Efecto de la concentración de hidrocarburos sobre la producción del pasto (*Brachiaria humidicola*) en Texistepec, Veracruz. *Rev. Intern. Bot. Exp.* 84: 222-232.

Aciego, J. 1998. Efecto rizosfera del cultivo maíz sobre algunas poblaciones microbianas y características químicas de un suelo tropical. *Venesuelos* 6:39-41.

Adenipekun, C.O., Oyetunji, O.J., and Kassim, L.S. 2009. Screening of *Abelmoschus esculentus* L. Moench for tolerance to spent engine oil. *Journal of Applied Biosciences*. 20:1131-1137.

Alcántar, G., Etchevers B. J. D. y Aguilar S. A. 1992. Los análisis físicos y químicos: su aplicación en Agronomía. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México 125 p.

Alejandro, C. A. 2016. *Leersia hexandra* Sw., especies y colonización por micorrizas arbusculares: organismos indicadores de toxicidad y adaptación al petróleo fresco. Tesis de Maestría en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco, México. 124 p.

Amadi, A., Abbey D.S., and Nma A. 1996. Chronic effects of oil spill on soil properties and microflora of a rainforest ecosystem in Nigeria. *Water, Air, and Soil Pollution* 86:1-11.

Andrews, A.J. y Schlesinger. 2001. Soil CO₂ dynamics, acidification, and chemical weathering in a temperate forest with experimental CO₂ enrichment. *Global Biogeochemical Cycles* 15:149-162.

Arias, T.A. 2012. La ecotoxicidad y el pasto japonesa (*Leersia* sp) en la fitorremediación de un Gleysol contaminado con petróleo fresco, intemperizado y sulfatos. Tesis de Maestría en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. H. Cárdenas Tabasco, México. 149 p.

Arias, T. A., Rivera-Cruz M.C., Aceves-Navarro L.A y Quintero-Lizaola R. 2012. Pasto japonesa (*Leersia* sp) como especie fitorremediadora en suelos contaminados con petróleo fresco e intemperizado. XXXVII Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. Zacatecas Zacatecas México. pp. 55-62.

Atlas, R. M. y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. 4a Edición. Editorial Pearson. Madrid, España. 677 p.

Baca, B.E., Soto Urzua. L., Pardo Ruiz. M.P. 2000. Fijación Biológica de Nitrógeno. *Elementos* 38:43-49.

Badalucco, L and Kuikman J.P. 2001. Mineralization and Immobilization in the Rhizosphere. In: *The rhizosphere Biochemistry and organic Substances at the Soil-Plant interface*. Pinton, Varanini and Nannipieri (eds). Marcel Dekker. New York. pp.159-196.

Baptista, S.J., M. Christie C., y D. Dias de Carvalho F. 2005. Production of CO₂ in Crude Oil Biorremediation in Clay Soil. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 48:249-255.

Baruch, Z. 1994. Responses to drought and flooding in tropical forage grasses. I: biomass allocation, leaf growth and mineral nutrients. *Plant and Soil*. Dordrech. pp: 87-96.

Basumatary, B., Saikia R., Bordoloi S., Chandra H. D., and Prasad S. H. 2012. Assessment of potential plant species for phytoremediation of hydrocarboncontaminated areas of upper Assam, India. *Jornal Chemical Technol Biotechnol*. 87: 1329-1334.

Beneduzi, A., Ambrosini A. and Passaglia L.M.P. 2012. Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR): Their potential as antagonists and biocontrol agents. *Genetics and Molecular Biology* 35:1044-1051.

Botello, A.V. 2005. Características, Composición y Propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In: Botello, A.V., J. Rendón-Von Osten., G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnostico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. Universidad Autónoma de México. Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. 696 p.*

Borges, B., Del Carpio E., Caribay U. de N.y N. Ortega. 2014. Caracterización morfológica y espectroscópica de asfaltenos provenientes de diferentes crudos. *Rev. LatinAm. Metal. Mat.* 34: 218-229.

Bouyoucos, G.J. 1962. Hydrometer improved methods for making particles size analysis of soil. *Agron. J.* 54: 464-465.

Brady, C.N. and Weil R.R. 2008. The Nature and Properties of Soil. Fourteenth edition. Pearson Prentice Hall. New Jersey USA. 975 p.

Brevik, E.C., Cerdá A., Mataix-Solera J., Pereg L., Quinton J.N., Six J., and Van Oost K. 2015. Interdisciplinary nature of soil. *Soil* 1:117-129.

Brimecombe M.J., de Leij F.A., and Lynch J.M. 2001. The effect of root exudates on rhizosphere microbial populations. In: R. Pinton, Z. Varanini, and P. Nannipieri (eds). The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface. Marcel Dekker, Inc. New York, USA. 424 p.

Calabrese, E.J. 2012. Hormesis: Improving predictions in the low-dose zone. *In: A. Luch* (eds.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology, Experientia Supplementum*. 101:551-564.

Camacho-Morales R.L., A. Durón-Castellanos, A. Flores-Martínez, y R. Zazueta-Sandoval. 2010. Actividades dihidroxidiol-deshidrogenasa en *Mucor circinelloides* YR-1 aislada de suelo contaminado con petróleo. *Acta Universitaria* 20: 45-50

Carranza, T.G. 2011. Evaluación de los contenidos de Petróleo crudo en suelo restaurado en La Venta Tabasco. Tesis de Licenciatura. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas Tabasco. 36 p.

Castillo R. F., M.D. Roldán R, R. Blasco P., M.J. Huertas R., F.J. Caballero D., C. Moreno V. y M.M. Luque R. 2005. Biotecnología ambiental. Editorial Tébar. Madrid España. 616 p.

Caso, M., Pisanty I., Ezcurra E. 2003. Primera parte: Físico-Química del Golfo de México. Diagnóstico Ambiental del Golfo de México. Secretaria de Medio Ambiente y Recursos Naturales, Instituto Nacional de Ecología, Instituto de Ecología A.C. 626 p.

Chauhan, A., Oakeshott J.G., and Jain R.K. 2008. Bacterial metabolism of polycyclic aromatic strategies for bioremediation. *Indian J. Microbiol.* 48: 95-113

Cheng, S.W., Fu S., Sulfak R.B. and Mitchell R.J. 2005. Measuring tree root respiration using ¹³C natural abundance: rooting medium matters. *New Phytologist.* 167:297-307.

Chirinos, I., Larreal M. y Díaz J. 2010. Biorremediación de lodos petroquímicos mediante el uso de la biota microbiana autóctona en un oxisol del municipio Lagunillas del estado Zulia, Venezuela. *Revista Científica UDO Agrícola* 10: 133-140.

Clarck, R.C. and D. W. Brown. 1977. Petroleum, properties and analices in biotic systems, p 1-89. *In: D.C. Malins (Ed). Effects of Petroleum on Artic and Subartic Marine Environments and Organisms Vol. 1. Academy Press, New York*

CONABIO, 2009. Manglares de México: Extensión y distribución. 2da. ed. Comisión Nacional para el conocimiento y Uso de la Biodiversidad. CONABIO. México. 99 p.

Corrales, R.L.C., Arévalo G.Z.Y. y Moreno B.V.E. 2014. Solubilización de fosfatos: una función microbiana importante en el desarrollo vegetal. *NOVA* 12:67-79.

Cunningham, S.D., T. Anderson A., P. Schwab A, and C. Hsu C.1996. Phytoremediation of soils contaminated with organic pollutants. *Adv. Agron.* 56: 55-114.

Cuanalo, de la C. H. 1981. Manual para la Descripción de Perfiles de Suelo en el Campo. Segunda edición. Centro de Edafología Colegio de Postgraduados Chapingo México. 40 p.

Daubenmire, R. 1959. A Canopy-Coverage Methods of Vegetational Analysis. Northwest Science. 33:43-64

De la Garza, F.R., P. Ortiz Y., A. Macias B., García C. y Coll D. 2008. Actividad biótica del suelo y la contaminación por hidrocarburos. Revista Latinoamericana de Recursos Naturales.4:49-58.

Delgado, R. y Mingrelia E. 1999. Evaluación de la Biomasa microbiana por los métodos de Fumigación-Incubación y Fumigación-Extracción y su relación con la disponibilidad de Nitrógeno en suelos de Venezuela. Agronomía Tropical 50:537-551.

De Farias, V., Maranhão L.T., de Vasconcelos E.C., Carvalho F.M.A.S., Lacerda L.G., Azevedo J.A.M., Pandey A., and Soccol C.R. 2009. Phytodegradation potential of *Erythrina crista-galli* L., Fabaceae in petroleum-contaminated soil. Appl. Biochem. Biotechnol. 157:10-22.

Demidchik, V. 2015. Mechanisms of oxidative stress in plants: From classical chemistry to cell biology. Environmental and Experimental Botany. 109:212-228.

Díaz-Vargas, P., Ferrera-Cerrato R., Almaráz-Suárez J.J. y Alcántar-González G. 2001. Inoculación de Bacterias Promotoras del crecimiento en Lechuga. Terra Latinoamericana 19: 327-335.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2013. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012. Límites Máximos Permisibles de Hidrocarburos en Suelos y Lineamientos para el Muestreo en la Caracterización y Especificaciones para la Remediación. Segunda sección. México, D.F. 10 septiembre 2013. 16 p.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2006. Norma Oficial Mexicana NMX-AA-134-SCFI-2006. Diario Oficial de la Federación. 12/10/2006. Diario Oficial de la Federación. México. 27 p.

DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-RECNAT-2000. Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis. México, D.F. 67 p.

Dorantes, A.R. 2010. Estudio comparativo de tres épocas del año en características químicas, plantas y organismos de suelo contaminado con petróleo en la Venta Tabasco. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. 146 p.

Etchevers, B.J.D. 1992. Manual de métodos para análisis de suelos, plantas agua y fertilizantes. Análisis rutinarios en estudios y programas de fertilidad. Laboratorio de Fertilidad, Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillos. edo. México. 127 p.

Elgawad, A. H., E. R. Farfan V., Dirk V., H. Asard. 2015. Elevated CO₂ mitigates drought and temperature-induced oxidative stress differently in grasses and legumes. *Plant Science*. 231:1-10.

Ekundayo, E. O. and O. Obuekwe. 2000. Effects of an Oil Spill on Soil Physico-Chemical Properties of a Spill Site in a Typical Udipsamment of the Niger Delta Basin of Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*. 60: 235-249.

Erazo-Parga, M. y R. Cárdenas-Romero. 2013. *Ecología: Impacto de la problemática ambiental actual sobre la salud*. 1ª edición. Ediciones Ecoe. Bogotá Colombia. 248 p.

Estrada, L.F., E. Barba M. y R.Ramos R. 2013. Cobertura temporal de los humedales en la cuenca del Usumacinta, Balancan, Tabasco, México. *Universidad y Ciencia*. 29:142-151

FAO 2005. *Leersia hexandra* Sw. Consultado en 2015-8-31. Disponible en: <http://ecocrop.fao.org/ecocrop/srv/en/cropView?id=7200>

Fernández-Linares, L.C., Rojas-Avelizapa N.G., Roldán-Carrillo T.G., Ramírez-Islas M.E., Zagarra-Martínez H.G., Uribe-Hernández R., Reyes-Ávila R.J., Flores-Hernández D. y Arce-Ortega J.M. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. México D.F. 184 p.

Ferrera-Cerrato, R. y A. Alarcón. 2007. Rizosfera: Interacción suelo, planta y microorganismos In: *Ecología de la Raíz*. Fuentes-Davila, G. y R. Ferrera-Cerrato (eds). 2da ed. Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Cd. Obregón, Sonora, México. pp:1-26.

FONAIAP DIVULGA N. 12 (1983): Pasto Alemán. Disponible en: http://www.sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd12/texto/pasto%20aleman.htm

Fuentes, C. R. 2007. *Agrosistemas sostenibles y ecológicos: la reconversión agropecuaria*. Universidad, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico (Eds). Imprenta Universitaria. Santiago de Compostela, España. 247 p.

Furness, H.D. and Breen, C. M. 1985. Interaction between period of exposure, grazing and crop growth rate of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. On seasonally flooded áreas of the Pongolo River floodplain. *Hydrobiologia*. 126:65-73.

García, A. y Rivero, C. (2008). Evaluación del carbono microbiano y la respiración basal en respuesta a la aplicación de lodo papelerero en los suelos de la Cuenca del Lago de Valencia, Venezuela. *Revista Facultad Agronomía (Maracay)*. 34:215-229.

García, C., Hernández T., Roldán, A., Albaladejo, J y Castillo, V. 2000. Organic amendment and mycorrhizal inoculation as a practice in afforestation of soil with *Pinus halepensis* Miller: effect on their microbial activity. *Soil Biology and Biochemistry*. 32: 1173-1181.

García, E., Ferrera R., Almaráz, J.J., Rodríguez R. y García, E. 2013. Biodegradación de Queroseno en la Rizosfera de Gramíneas en Condiciones de Invernadero. *Agronomía Costarricense*. 37:125-134.

García, T.A 1981. Experimentos en Microbiología del suelo. Continental, S.A., México D.F. 75 p.

Gaskin, S.E. and R. Bentham H. 2010. Rhizoremediation of hydrocarbon contaminated soil using Australian native grasses. *Sci. Total Environ*. 408:3683-3688.

Germida, J.J., M. Frick C., and E. Farrel R. 2002. Phytoremediation of oil-contaminated soils. In: *Developments in Soil Science*.: Violante, A., Huang, P.M., Bollag J.M and Gianfreda L. (eds). Elsevier Science B.V. Amsterdam. The Netherlands. pp.169-186.

Gobat, J.M., Aragno M., Matthey W. 2004. *The Living soil. Fundamentals of Soil Science and Soil Biology*. Science Publishers , Inc. NH. USA. 602 p.

González, M.M. 2015. Los surfactantes como pretratamiento a la fitorremediación de un gleysol con petróleo fresco en el trópico húmedo mexicano. Tesis de Maestría en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco, México. 133 p.

Harayama, S., Kishira H., Kasai Y. and Shutsubo K. 1999. Petroleum biodegradation in marine environments. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* 1: 63-70.

Hernández, A.J., Pastor J., Urcelay A. y Estalrich E. 1992. Características radiculares de pastos oligotrofos con *Agrostis*. En: XXXII Reunión Científica de la Sociedad Española para los Estudios de los Pastos. Pamplona. España. pp:140-145.

Hernández-Valencia, I. y Mager, D. 2003. Uso de *P.maximum* y *B.brizantha* para fitorremediar suelos con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro*.15:149-155.

Hopkins W.G. and Hüner N.P.A. 2009. *Introduction to Plant Physiology*. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc. United States of America. 523 p.

Ibañez, C., Palomeque S., y Fonturbel F. 2004. Elementos principales del suelo, geodinámica y dinámica de los principales componentes del suelo. *Publicaciones integrales La Paz. Estudio del Carbono de la Biomasa microbiana en suelos alterados. Lazaroa* 29:117-123.

IBUNAM (Instituto de Biología de la Universidad Autónoma de México). 2015. "*Leersia hexandra* Sw., 1788-IBUNAM: MEXU: PA241467". UNIBIO: Colecciones Biológicas.2008-10-13. Universidad Nacional Autónoma de México.Disponible: <http://unibio.unam.mx/collections/specimens/urn/IBUNAM:MEXU:PA241467>. Consultada 215-8-31.

INEGI-CONABIO-INE. 2005. Conjunto de datos vectoriales de uso de suelo y vegetación, Escala 1:250,000, Serie III (Conjunto Nacional). Instituto Nacional de Geografía y Estadística (INEGI), Aguascalientes, México. 200 p.

INEGI, 2004. Guía para la Interpretación de Cartografía Edafología 2004. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática. 27 p.

INEGI (Instituto Nacional de Estadística y Geografía). 2014. Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa. México D.F. 774 p.

IUSS (Grupo de trabajo WRB). 2007. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos. No. 103. FAO Roma. 130 p.

Jenkinson, D.S., and Powlson D.S. 1976. The effects of biocidal treatment on metabolism in soil. V. A method for measuring soil biomass. *Soil Biol. Biochem.* 8:209-213.

Jenkinson, D. S., and Ladd J.N. 1981. Microbial biomass in soil: Measurement and turnover. In: Paul E.A., Ladd J.N. (eds) *Soil Biochemistry*. vol 5. Marcel Dekker, New York, Basel, pp: 415-47.

Jenkinson, D. 1988. Determination of microbial biomass carbón and nitrogen in soil. In: Wilson, J.K (ed). *Advences in Nitrogen Cycling in Agriculture Ecosystem*. CAB International, Walli-Sford, U.K.

Jimenez, S. J.C. 2013. Atributos fisiológicos de *Brachiaria* spp. en la adaptación a suelos inundados. Tesis de Maestria en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. 86 p.

Johnson, L.F., and Curl, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess Publishing Company. Minneapolis, MN, USA. 247 p.

Kaimi, E., T. Mukaidani, S. Miyoshi, M. Tamaki. 2006. Ryegrass enhancement of biodegradation in diesel-contaminated soil. *Environmental and Experimental Botany* 55: 110-119.

Kechavarzi, C., Pettersson K., Leeds-Harrison P., Ritchie L., and Ledin, S. 2007. Root establishment of perennial ryegrass (*L. perenne*) in diesel contaminated subsurface soil layers. *Environmental Pollution*. 145: 68-74.

Khan, Z. D. S. I. 2008. Characterization of bacterial endophytes of sweet potato plants. *Plant Soil*. 322:197-207.

Kirk, L.J., J. Klironomos N., Lee H. y J. Trevors T. 2005. The effects of perennial ryegrass and alfalfa on microbial abundance and diversity in petroleum contaminated soil. *Environmental Pollution*. 133:455-465.

Labud, V., García C. y Hernández T. 2007. Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.

Lamont, B.B. 2003. Structure, ecology and physiology of root clusters – a review. *Plant and Soil*. 248:1-19.

Li, J.H., Wang E.T., Chen W.F., Chen W.X. 2007. Genetic diversity and potential for promotion of plant growth detected in nodule endophytic bacteria of soybean grown in Heilongjiang province of China. *Soil Biol Biochem* 40:238-246.

Liu, J., Duan C.H, Zhang X., Yinian Z.Y., and Lu X. 2011. Potential of *Leersia hexandra* Swartz for phytoextraction of Cr from soil. J. Hazardous Materials. 188: 85-91.

Liu, X., Li X., Chermaine O., and Chu, Z. 2013. Progress of phytoremediation: focus on new plant and molecular mechanism. Journal Plant Biology Soil Health. 1: 1-5.

Liu, J., Z. Xue-hong, Y. Shao-hong, W. Qing-xin, and Z. Kai-ning. 2015. Function of *Leersia hexandra* Swartz in constructed wetlands for Cr(VI) decontamination: A comparative study of planted and unplanted mesocosms. Ecological Engineering 81:70-75.

Madigan, M. T., J. M. Martinko, P. V. Dunlap y P. D. Clark. 2009. Brock. Biología de los Microorganismos. 12a. ed. Pearson Educación, España. 1259 p.

Maldonado-Chavez, E., M.C. Rivera-Cruz, F. Izquierdo-Reyes, D.J. Palma-López. 2010. Universidad y Ciencia. Efectos de rizosfera, microorganismos y fertilización en la biorremediación y fitorremediación de suelos con petróleos crudo nuevo e intemperizado. 26:121-136.

Manoharachary C. and Mujerky G.K. 2006. Rizosphere biology and overview. In: Microbial Activity in the Rizosphere. Mukerji K.G. y Manoharachary C. J. Singh (Eds.) Springer-Verlag. Berlin Heidelberg Alemania. pp:1-15.

McGill, W.B. 2007. The physiology and biochemistry of soil organisms. In: Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry Paul E.A (Eds). Elsevier, Amsterdam .pp. 231-256.

Mehrasbi, M.R., Haghghi B., Shariat M., Naseri S., and Naddafi K. 2003. Biodegradation of Petroleum Hydrocarbons in Soil. Iranian Journal of Public Health. 32: 28-32.

Merkel N., Schultze-Kraft R. and Infante C. 2005a. Phytoremediation in the tropics- influence of heavy crude oil on root morphological characteristics of graminoids. Environ. Pollut. 138: 86-91.

Merkel N., Schultze-Kraft R. and Infante C. 2005b. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water, Air Soil Pollut. 165, 195-209.

Merkel, N., R. Schultze-Kraft, and M. Arias. 2006. Effect of the tropical grass *Brachiaria brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) Stapf on microbial population and activity in petroleum-contaminated soil. Microbiological Research 161:80-91.

Miranda-Martínez, M. R., J. Delgadillo-Martínez,, A. Alarcón and R. Ferrera-Cerrato. 2007. Degradación de fenantreno por microorganismos en la rizosfera del pasto alemán. Terra Latinoamericana. 25: 25-33.

Mohsenzade, F., Naseri S., Mesdaghinia A., Nabizadeh R., Zafari D., and Chehregani A. 2009. Phytoremediation of petroleum-contaminated soils: pre-screening for suitable plants and rhizospheral fungi. Toxicol. Environ. Chem. 91: 1443-1453

Muratova, Y.A., Dmitrieva T.V., Panchenko L.V., and Turkovskaya V.O. 2008. Phytoremediation of oil-sludge-contaminated soil. Int J. Phytorem. 10: 486-502.

Muratova, Y.A., S. Golubev, N., E. Dubrovskaya, V., N. Pozdnyakova, N., L. Panchenko, V., E. Pleshakova, V., M. Chernyshova, P., and O.Turkovskaya, V. 2012. Remediating abilities of different plant species grown in diesel-fuel-contaminated leached chernozem. *Applied Soil Ecology*. 56: 51-57.

Nihorimbere, V., Ongena M., Smargiassi M. y Thonart P. 2011. Beneficial effect of the rhizosphere microbial community for plant growth and health. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 15:327-337.

Nogueira, L., Inckot, R., Santos G., Sousa L., Bona C. 2011. Phytotoxicity of petroleum contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edullis*. *Rodriguesia*. 62: 459-466.

Njoku, K.L., Akinola M.O., and Taiwo, B.G. 2009. Effect of gasoline diesel fuel mixture on the germination and the growth of *Vigna unguiculata* (Cowpea). *African Journal Environmental Science Technology*. 3: 466-471.

Odum P.E. and Warrett G.E. 2006. *Fundamentos de Ecología*. 5ª. edición. Cabaña C.R. (ed). Thomson Learning. México D.F. 614 p.

Ogbo, E.M. 2009. Effects of diesel fuel contamination on seed germination of four crop plants -*Arachis hypogaea*, *Vigna unguiculata*, *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *African Journal Biotechnology*. 8:250-253.

Olalekan, A. 2014. The Effect of Palm Kernel Oil (PKO) Biodiesel-Contaminated Soil on Morphological and Biochemical Properties of *Zea mays*. *J Plant Biochem Physiol*, 2:4.

Olguín, J.E., Hernández M.E. y Sánchez-Galván G. 2007. Contaminación de Manglares por Hidrocarburos y Estrategias de Biorremediación, Fitorremediación y Restauración. *Rev. Int. Contam. Amb.* 23: 139-154.

Olsen, S.R y Sommers L.E. 1982. Phosphorus. In A.L. Page., R.H. Miller., & D.R. Keeny (Eds.). *Methods of Soil Analysis . Part 2. Chemical and Micro-biological Properties*. (pp. 403-430). (2nd ed). ASA/SSSA. Madison, WI, EEUU.

Omosun, G., Edeoga H.O., Markson, A.A. 2009. Anatomical changes due to crude oil pollution and its heavy metals component in three *Mucuna* species. *Recent Research in Science and Tecnology*. 1: 264-269.

Ortíz, S.C.A. 2010. Edafología. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de suelos. 8a. edición. Texcoco, Edo. de México. 334 p.

Orozco-Soto, M., M. Gutiérrez-Rojas y M. R. Peralta-Pérez. 2014. Efecto de la composición de una mezcla de hidrocarburos en la respuesta fenotípica y la acumulación de azúcares por *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. en cultivo *in vitro*. *Polibotánica*. 38: 159-172.

Pacheco, A.J., Pat C. R. y Cabrera S.A. 2002. Análisis del ciclo del nitrógeno en el medio ambiente con relación al agua subterránea y su efecto en los seres vivos. *Ingeniería* 6:73-81.

Page, A.L., Miller, R.H y Keeney, D.R. 1982. Nitrogen total. In A.L. Page., R.H. Miller & D.R. Keeny (Eds.), *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. (2nd ed), (pp. 595-629). ASA. SSSA. Madison, WI, EEUU.

Palma-López, D.J., Cisneros D.J., Moreno C.E., y Rincón R.J.A. 2006. Plan de uso sustentable de los suelos de Tabasco. 3ra ed. ISPROTAB. Fundación Produce Tabasco. Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México. 196 p.

Paz, F. J. 2006. Propiedades Bioquímicas de Suelos de prado de Galicia. Universidad de Santiago de Compostella. 495 p.

Pedraza, R.O., R.S.Teixeira K., A.Fernández S., I.García S., B.Baca E., Azcón R. D.Valdani V., y Bonilla R. 2010. Microorganismos que mejoran el crecimiento de las plantas y la calidad de los suelos. Revisión. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu.11:155-164.

Peñuela, L., F. Castro, y Ocampo-Peñuela, N. 2011. Las Reservas Naturales del Nodo Orinoquia en su rol de conservación de la biodiversidad. Fundación Horizonte Verde y Renastur. Colombia. 104 p.

Peralta-Pérez, M. del R. y T.L. Volke-Sepúlveda. 2012. La defensa antioxidante en las plantas: una herramienta clave para la fitorremediación. Revista Mexicana de Ingeniería Química. 11: 75-88.

Pérez-Armendáriz, B., D. Martínez-Carrera, M. Calixto-Mosqueda, J. Alba and R. Rodríguez-Vázquez. 2010. Filamentous fungi remove weathered hydrocarbons from polluted soil of tropical México. Rev. Int. Contam. Ambie. 26:193-199.

Pérez, V. M.A., C.Brandán de Weht I., N. Ortiz, D. E.García P. 2014. Carbono de biomasa microbiana (CBM) en suelo rizosférico de pinares colonizados con hongos ectomicorrícicos. Rev. Agron. Noroeste Argent. 34: 43-45.

Philippot, L. and Germon J.C. 2005. Contribution of Bacteria to Initial Input and Cycling of Nitrogen in Soils. In: Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions. (eds) F. Buscot F. and Varma A. Edit. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp:159-176.

Pikovskaya R. 1948. Mobilization of phosphorus in soils in connection with vital activity of some microbial species. Microbiologiya. 17: 362-370.

Pinton, R., Varanini Z. and Nannipieri. P. 2001. The Rhizosphere as a Site of Biochemical Interactions Among Soil Components, Plantas and Microorganisms. *In*: Pinton, R., Varanani Z. and Nannipieri P. (eds). The Rhizosphere Biochemistry and Organix Substances at the Soil-Plant Interface. Marcel Dekker. New York USA. pp: 1-18.

Prince, R.C., y Drake E.N.1999. Transformation and fate of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Soil. In *Biorremediation of Contaminated Soils*. David M Kral, Marian K. Viney (eds). Agronomy A Series of Monographs. Madison Wisconsin USA. pp. 89-110.

Porta C. J., López-Acevedo R.M. y Roquero de L.C. 2003. *Edafología para la Agricultura y el Ambiente*. 3ª. Edición revisada y ampliada. Ediciones Mundi Prensa. México D.F. 929 p.

Pothuluri, V.J., and Cerniglia, E.C. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. In Chaudry R.G (eds). *Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals*. Dioscorides Press. Portland, Oregon. pp. 92-124.

Powlson, D.S., and Jenkinson, D.S., 1981. A comparison of the organic-matter, biomass, adenosine-triphosphate and mineralizable nitrogen contents of ploughed and direct-drilled soils. *Journal of Agricultural Science* 97: 713–721

Pravecek, L.T., R. Christaman F., and F. Pfaender K. 2005. Impact of imposed anaerobic conditions and microbial activity on aqueous-phase solubility of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 24: 286-293.

Quiñones, A. E.E., Ferrera C. R., Gavi R. F., Fernández L. L., Rodríguez V. R. y Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia*. 37: 585-594.

Ramirez-May A. G. 2012. Estados fenológicos tempranos de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], bacterias y actividad enzimática: indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado. Tesis Maestra en Ciencias en Postgrado en Producción Agroalimentaria en el Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco. 126 p.

Rennie, R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Canadian Journal Microbiology*. 27: 8-14

Reyes, Q. C.K. 2003. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo empleando *Jatropha curcas* L., una planta productora de biodiesel. Tesis presentada como requisito para obtener el grado de Maestra en Ciencias. Colegio de Postgraduados Montecillo Texcoco Edo. de México 96 p.

Rivera-Cruz MC., R. Ferrera-Cerrato., V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares, y R. Rodríguez-Vázquez. 2002. Poblaciones microbianas en perfiles de suelos afectados por hidrocarburos del petróleo en el estado de tabasco, México. *Agrociencia*. 36: 149-160.

Rivera-Cruz M.C. y Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleo nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29: 369-376.

Rivera-Cruz M.C., Ferrera-Cerrato R., Sanchez-García P., Volke-Haller V., Fernández-Linares L. y Rodríguez-Vásquez R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia* 38:1-12.

Rivera-Cruz M.C. 2011a. Flora y Microflora Rizósferica del Pantano. *Agroregión* 1:12-15.

Rivera-Cruz, M.C., Trujillo-Narcía A., Miranda de la C. M.A. y Maldonado C. E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia*. 30: 326-331.

Rivera-Cruz, M.C., 2011b. Bacterias y hongos en suelos contaminados con petróleo crudo en Tabasco. In: Recursos Genéticos microbianos en la Zona Golfo-Sureste de México V-1. Gamboa A.M., y Rojas H.R. (eds.). Subsistema Nacional de Recursos Genéticos Microbianos (SUBNARGEM). Morelia Michoacán, México. pp: 77-87.

Rodríguez-Carrasquel, S. 1983. Pasto alemán, para Caribe, Tannagrass, paja de agua, lambedora y Chi Guirera. *Revista de Difusión de Tecnología Agrícola y Pesquera del FONAIAP* No.12. Septiembre-Octubre 1983. Instituto Nacional de investigaciones Agrícolas. Bolivia, Venezuela. 3 p.

Rodríguez-Vázquez, R., Sánchez S., Mena-Espino X., Amezcua-Allieri M.A. 2016. Identification of the medicinal plant species with the potential for remediation of hydrocarbons contaminated soils. *Acta Physiology Plant*. 38:23

Ross, D. J., K.Tare R. Cairns A. and E.A. Pansier. 1980. Microbial biomass estimations in soils from tussock grasslands by three biochemical procedures. *Soil Biol. Biochem*. 12:375-383.

Ross, U., Joergensen, K. and Chandler, K. 2001. Effects of Zn enriched sewage sludge on microbial activities and biomass in soil. *Soil Biol. Bioch*. 33: 633-638.

Ruíz, M y O. Terenti. 2012. Germinación de cuatro pastos bajo condiciones de estrés salino. *Revista Internacional de Botánica Experimental*. 81: 169-176.

Saadoun, I., and Al-Ghazawi, Z. 2010. Toxicity of diesel fuel towards plant seeds as reflected by seed germination outcomes, sprout length and fresh weight. *Am-Euras. Journal Agriculture Environmental Science*. 8: 167–172.

SAS (Statistical Analysis Systems). 2005. User's Guide, Versión 9.1.3. SAS Institute, Inc. Cary, NC. 664 p.

Sarma, H. 2011. Metal hyperacumulación in plants. A review focusing on phytoremediation technology. *Environmental Science Technology*. 4: 118-138.

Sangabriel, W., R. Ferrera-Cerrato, D. Trejo-Aguilar, M. R. Mendoza-López, J. S.Cruz-Sánchez, C. López-Ortiz, J. Delgadillo-Martínez, y A. Alarcón. 2006. Tolerancia y capacidad de fitorremediación de combustóleo en el suelo por seis especies vegetales. *Rev. Int. Contam. Ambient.* 22: 63-73.

Shahsavari, E., Adetutu, M.E., Anderson, A.P. (2013). Tolerance of Selected Plant Species to Petrogenic Hydrocarbons and Effect of Plant Rhizosphere on the Microbial Removal of Hydrocarbons in Contaminated Soil. *Water, Air, & Soil Pollution*. 224: 1495.

Smith, M.J., T.H. Flowers, H.J. Duncan y J. Alder, 2006. "Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on germination and subsequent growth of grasses and legumes in freshly contaminated soil and soil with aged PAHs residues". *Environ. Pollut.* 141: 519-525.

Sparling, G.P., B. Ord G. and Vaughan D. 1981. Microbial biomass and activity in soils amended with glucose. *Soil. Biol. Biochem.* 13: 99-104.

Swift, M.J., Heal O.W. y Anderson J.M. 1979. *Decomposition in Terrestrial Ecosystems*. Blackwell Scientific Publications. Vol 5. (Ed.) Oxford London Edinburgh Boston Melbourne. 372 p.

Tadeo, F.R. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. In: *Fundamentos de Fisiología vegetal*. Azcón-Bieto J. y Talón M (Eds). Mc Graw-Hill/Interamericano. Madrid, España. pp. 481-498.

Taiz L. and E. Zeiger. 2006. Plant physiology. 4th ed. Sinauer Associates, Inc., Publishers (Ed). Massachusetss, USA. 764 p.

Torres-Guerrero, C.A., Etchevers B.J.D., Fuentes.Ponce M.H., Govaerts B., De León-González F. y Herrera J.M. 2013. Influencia de las raíces sobre la agregación del suelo. *Terra Latinoamericana* 3:71-84.

Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M.C., y Maldonado-Chávez E. 2006. Efecto de la restauración de suelo contaminado con petróleo en el suelo y la vegetación en Tabasco, México. 2006. En: *Medio Ambiente en Iberoamérica. Tomo III Visión desde la Física y la Química en los albores del siglo XXI*. Juan F. Gallardo Lancho (Editor y coordinador). Sociedad Iberoamericana de Física y Química Ambiental. pp :353-361.

Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz M.C., Lagunes-Espinoza L.C., Sánchez-Soto S. y Ramírez-Valverde G. 2012. Efecto de la restauración de un fluvisol contaminado con petróleo crudo. *Rev. Int. Contam. Amb.* 28:361-374.

Uren, C. N. 2001. Types, Amounts, and Possible Functions of Compounds Released into the Rhizosphere by Soil-Grown Plants. *In: Pinton, R., Z. Varanani and Nannipieri P. (eds). The Rhizosphere Biochemistry and Organix Substances at the Soil-Plant Interface*. Marcel Dekker. New Your USA. pp: 19-41.

Uribe-Hernández, R., M.A. Montes de Oca-García, J.A. Amezcua-Allieri, L. Zermeño-Eguía, y V.E. Martinez-Martinez. 2012. Ecotoxicity Assessment of Weathered Waste Oil in a Mexican Wetland. *Journal of Petroleum Science Research (JPSR)*. 1: 26-31.

USDA-NRCS (United States Department Agriculture-Natural Resources Conservation Service). 2014. *Keys to Soil Taxonomy*. Twelfth edition. 372 p.

USEPA. 1996. EPA-3540C. Soxhlet extraction organics. SW-846 Test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf>. Accessed 10 enero 2010.

Vásquez-Luna, M., Montiel-Flores A., Vásquez-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* 13:511-523.

Vegetti, A.C. 2002. Caracterización de los sistemas de ramificación en especies de *Oryzae* (Poaceae). *Condollea* 57:251-261.

Vessey, J.K. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255: 571-586.

Walkley, A and Black, I.A. 1934. An examination of Degjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 37: 29-38.

Wang, Y., Feng Y., Lin Q., Lyu X., Wang X., and Wang G. 2013. Effects of crude oil contamination on soil physical and chemical properties in Momoge wetland of China. *Chinese Geographical Science*. 23: 708-715.

Wuaquier, J.P. 2004. El refinado del petróleo. *Petróleo crudo, Productos petrolíferos, Esquemas de fabricación*. Ediciones Díaz de Santos. Madrid España. 467 p.

Xiao-Dong, H., El-Alawi Y., D. Penrose M., B. Glick. R., B. Greenberg M. 2004. Responses of three grass species to creosote during phytoremediation. *Environmental Pollution* 130: 453-463.

Xuliang, Z., C. Jian, S. Hojae and B. Zhihui. 2007. New advances in plant growth-promoting rhizobacteria for bioremediation. *Environmental International*. 33:406-413.

Zamora, A., Ramos J. y Arias M. 2012. Efecto de la Contaminación por hidrocarburos sobre algunas propiedades químicas y microbiológicas de un suelo de sabana. *Bioagro* 24:5-12.

Zavala-Cruz, J., F. Gavi-Reyes, R.H. Adams-Schroeder, R. Ferrera-Cerrato, D.J. Palma-López, H. Vaquera-Huerta, y J.M. Dominguez-Esquivel. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra Latinoamericana*. 3: 293-302.

Zhu, L., Zhao X., Lai L., Wang J., Jiang L., Ding J., Liu N., Yu Y., Li J., Xiao N., Zheng Y., and G. Rimmington, N. 2013. Soil TPH Concentration Estimation Using Vegetation Indices in an Oil Polluted Area of Eastern China. *PLOS ONE* 8.

CAPÍTULO IX

ANEXO

Cuadro 1. Medio de cultivo agar nutritivo

Reactivo	Cantidad
Agar	15 g
Extracto de carne	3 g
Peptona	5 g
NaCl	8 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Difco Manual, 1953 cit. Jhonson y Curl, 1972.

Cuadro 2. Medio de cultivo carbón combinado para bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre (Rennie, 1981)

Solución A

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	0.2 g
K_2HPO_4	0.8 g
NaCl	0.1 g
Fe EDTA	4.9 mL
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet \text{H}_2\text{O}$	0.025 g
Extracto de levadura	0.1 g
Manitol	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Lactato de sodio (60% v/v)	0.5 mL

Agar	15 g
Agua destilada	900 mL

Solución B

Reactivo	Cantidad
MgSO ₄ •7H ₂ O	0.2 g
Ca Cl ₂ •2 H ₂ O	0.6 g
Agua destilada	100 mL

Las soluciones A y B se esterilizan por separado durante 18 minutos a 18 libras de presión. A la solución B se le agregan 5 μL^{-1} de biotina y 10 μL^{-1} de ácido p-aminobenzoico y posteriormente se incorpora a la solución A y se procede al vaciado en las cajas Petri (Rennie, 1981).

Cuadro 3. Medio de cultivo Pikovskaya para bacterias solubilizadoras de fosfatos.

Reactivo	Cantidad
Glucosa	10 g
Ca ₃ PO ₄	5 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	0.1 g
Agar	15 g
KCl	0.2 g
(NH ₄)SO ₄	0.5 g
Extracto de levadura	0.5 g
MnSO ₄	0.002 g
Agua destilada	1000 mL

Fuente: Rao, 1982.

Cuadro 4. Medio de cultivo papa dextrosa para hongos heterótrofos.

Reactivo	Cantidad
Agar	17 g
Papas	200 g
Dextrosa	20 g
Agua	1000 mL
Colorante de rosa de bengala:	
Cloruro de calcio hidratado	0.3g
Solución acuosa de fenol al 5%	100 mL
Rosa de bengala (eritrosina)	1.0 g

Fuente: Riker y Riker, 1936 cits. Johnson y Curl, 1972.