



# **COLEGIO DE POSTGRADUADOS**

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

## **CAMPUS TABASCO**

PROGRAMA PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

***Leersia hexandra* Sw., ESPECIES Y COLONIZACIÓN POR  
MICORRIZAS ARBUSCULARES: ORGANISMOS INDICADORES DE  
TOXICIDAD Y ADAPTACIÓN A PETRÓLEO FRESCO**

**ALEJANDRO ALEJANDRO CÓRDOVA**

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL  
PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS**

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2016

La presente tesis titulada: “*Leersia hexandra Sw.*, especies y colonización por micorrizas arbusculares: organismos indicadores de toxicidad y adaptación a petróleo fresco”, realizada por el alumno Alejandro Alejandro Córdova, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO**

**CONSEJO PARTICULAR**

Consejera de tesis:



---

DRA. MARÍA DEL CARMEN RIVERA CRUZ

Asesor:



---

DR. RUBÉN GARCÍA DE LA CRUZ

Asesor:



---

DR. ALEJANDRO ALARCÓN

H. Cárdenas, Tabasco, México. 22 de enero del 2016

La presente tesis titulada: “***Leersia hexandra Sw.*, especies y colonización por micorrizas arbusculares: organismos indicadores de toxicidad y adaptación a petróleo fresco**”, fue dirigida por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

Este estudio fue financiado con el cargo a las cuentas 40018 y 40019, apoyo para la investigación científica que el Campus Tabasco del Colegio de Postgraduados, asigna a sus profesores investigadores y estudiantes.

***Leersia hexandra* Sw., ESPECIES Y COLONIZACIÓN POR MICORRIZAS  
ARBUSCULARES: ORGANISMOS INDICADORES DE TOXICIDAD Y  
ADAPTACIÓN A PETRÓLEO FRESCO**

Alejandro Alejandro Córdova  
Colegio de Postgraduados, 2016

*Leersia hexandra* y hongos micorrícicos arbusculares (HMA) habitan en suelos contaminados con petróleo de regiones petroleras del sureste de México, pero se desconoce el nivel de tolerancia al petróleo. Durante 180 días se evaluó un bioensayo en microtunel, se utilizó suelo superficial de un Gleysol donde se estableció el pasto *L. hexandra* para evaluar el potencial de HMA como indicadores de la toxicidad del petróleo crudo. Se probaron nueve tratamientos: un testigo [693 mg kg<sup>-1</sup> hidrocarburos totales del petróleo (HTP's) biogénico] y ocho con petróleo crudo fresco mediano (3000, 10000, 30000, 60000, 90000, 120000, 150000 y 180000 mg kg<sup>-1</sup> base seca). Se evaluó el efecto del petróleo en planta y en la colonización micorrícica. La biomasa seca foliar fue mayor estadísticamente en suelo con 3000 a 60000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo, comparada con la biomasa del suelo testigo, pero la exposición a dosis mayores inhibió la biomasa vegetal. La materia seca radical fue mayor a mayor concentración de petróleo, el efecto fitotóxico ocurrió en suelo con 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo. La colonización radical por hifas, vesículas, arbusculos y esporas fue estimulada hasta por 60000 mg kg<sup>-1</sup> petróleo, pero a partir de 90000 mg kg<sup>-1</sup> fue inhibida. Los HMA en suelos a partir de 90000 mg kg<sup>-1</sup> mostraron índices de micotoxicidad menores a uno. Se identificaron nueve morfoespecies de hongos micorrícicos. Las morfoespecies con índices de toxicidad menores a uno, expuestas a 30000 a 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo, fueron *Ambispora* aff. *gerdemannii*, *Claroideoglossum lamellosum*, *Diversispora eburnea*, *Funneliformis* aff. *geosporum*, *Rhizophagus clarus*, *R. fasciculatus* y *R. intraradices* y son sensibles al petróleo, pueden ser utilizados como bioindicadores de la contaminación del suelo con petróleo. *Diversispora* sp. fué estimulada por el petróleo, por lo que se propone para usos en restauración ecológica mediante fitorremediación utilizando a *L. hexandra*.

**Palabras clave:** *Diversispora* sp, espora, toxicidad, micotoxicidad, pasto tropical.

***Leersia hexandra* Sw., SPECIES AND COLONIZATION BY MYCORRHIZAE ARBUSCULAR: ORGANISMS INDICATORS OF TOXICITY AND ADAPTACIÓN TO FRESH OIL.**

Alejandro Alejandro Córdova  
Colegio de Postgraduados, 2016

*Leersia hexandra* and arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) inhabit soils contaminated with oil in the oil regions of southeastern Mexico, but their tolerance to oil is unknown. A bioassay was conducted in a microtunnel for 180 days, planting the grass *L. hexandra* on superficial soil from a Gleysol to evaluate the potential of AMF as indicators of the toxicity of crude oil. Nine treatments were tested; a control (693 mg kg<sup>-1</sup> HTP's biogenic) and eight included fresh medium crude oil (3000, 10000, 30000, 60000, 90000, 120000, 150000 and 180000 mg kg<sup>-1</sup> dry basis). We evaluated the effect of oil on plants and on mycorrhizal colonization. The leaf dry biomass was statistically higher in soil with 3000-60000 mg kg<sup>-1</sup> of oil compared to the biomass of the control soil, but exposure to higher doses inhibited plant biomass production. Root dry matter was greater with higher oil concentrations; the phytotoxic effect occurred in soil with 180000 mg of oil. Root colonization by hyphae, vesicles, arbuscules and spores was stimulated by up to 60000 mg kg<sup>-1</sup> of oil, but more than 90000 mg inhibited it. In soils with oil concentrations equal or higher than 9000 mg kg<sup>-1</sup>, AMF had mycotoxicity index values lower than one. Nine morphospecies of mycorrhizal fungi were identified. The morphospecies that were exposed to 30000 to 180000 mg kg<sup>-1</sup> of oil and that showed toxicity values lower than one, were: *Ambispora* aff. *gerdermanii*, *Claroideoglosum lamellosum*, *Diversispora eburnea*, *Funneliformis* aff. *geosporum*, *Rhizophagus clarus*, *R. fasciculatus* and *R. intraradices*; these morphospecies are sensitive to oil and can be used as bio-indicators of soil pollution with oil. Oil stimulated the growth of *Diversispora* sp; thus, this fungi is proposed for ecological phytoremediation using *L. hexandra*.

**Keywords:** *Diversispora* sp, spore, toxicity, mycotoxicity, tropical grass.

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencia Agrícolas por haberme permitido realizar mis estudios de Maestría en Ciencias en el *Campus* Tabasco.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora Titular del Campus Tabasco, Responsable del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, por brindarme su dedicación, tiempo, esfuerzo, paciencia, gracias por permitir ser su estudiante de tiempo completo y por guiarme en esta investigación de principio hasta el final.

Al Dr. Rubén García de la Cruz Profesor Investigador del Campus Tabasco, por su apoyo y sugerencias realizadas en esta investigación y documentación de la tesis.

Al Dr. Alejandro Alarcón Profesor Investigador del Campus Montecillo Edo. México, por sus aportaciones recibidas en el desarrollo de la investigación y documentación de la tesis.

A la M. en C. Laura Verónica Hernández Cuevas por su tiempo, dedicación, consejos y enseñanzas durante mi estancia académica en el Laboratorio de Micorrizas del Centro de Investigación de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Tlaxcala, Edo. Tlaxcala gracias por sumergirme en ese maravilloso mundo de la taxonomía de esporas micorrícicas.

Al M. en C. Antonio Trujillo Narcía por su valioso apoyo durante los diferentes muestreos realizados, gracias por el entusiasmo desinteresado.

A mis amigos de generación Berenice, Beatriz, Leticia, María del Socorro, Félix y en especial a Nímide y Magín mis compañeros del Laboratorio de Microbiología, *¡gracias a todos por su ayuda y compañía durante esta travesía!*

## DEDICATORIA

A **Jesucristo** *Rey de Reyes y Señor de Señores*, por estar presente en cada etapa de mi vida y ayudarme a cumplir cada meta, a él sea la honra, la gloria y el poder por los siglos de los siglos. **“Amen”**

A mi amada esposa Reyna Góngora Méndez por acompañarme en mi vida, por su paciencia, entrega, dedicación y ser mi apoyo en cada instante (*Mujer virtuosa ¿Quién la hallará? su estima sobrepasa largamente el de la piedras preciosas. Proverbios 31:10*). **“Te amo pequeña”**

A mi madre Leticia Córdova Rodríguez, padre Efraín Alejandro Correa y hermanas Mirna, Vianey Zulema, Ivone Zamara y Paloma por estar siempre pendiente de mí y apoyarme en todo lo que he emprendido. **“Bendita familia, los quiero”**

## CONTENIDO

	Página
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xii
CAPITULO I. INTRODUCCIÓN .....	1
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA .....	4
2.1. Definición y características químicas del petróleo fresco .....	4
2.2. Teoría de la toxicidad .....	8
2.3. Potencial tóxico y cancerígeno de los hidrocarburos del petróleo .....	11
2.4. Organismos del suelo.....	12
2.5. Importancia de la rizosfera en suelos con hidrocarburos.....	13
2.6. Fisiología del estrés en plantas .....	14
2.6.1. Potencial de adaptación de las plantas y microorganismos.....	16
2.7. Importancia de la micorriza arbuscular en el suelo .....	17
2.7.1. Diversidad de hongos micorrícicos .....	20
2.8. Organismos indicadores de estrés a los hidrocarburos .....	22
2.8.1. El uso de los pastos como indicador de estrés por petróleo .....	23
2.8.2. El uso de la micorriza arbuscular como indicadora de estrés .....	24
CAPITULO III. OBJETIVOS.....	25
3.1. Objetivo general .....	25
3.1.1. Objetivo particulares .....	25
CAPITULO IV. HIPÓTESIS.....	26
4.1. Hipótesis general .....	26
4.1.1. Hipótesis particulares.....	26
CAPITULO V. MATERIALES Y MÉTODOS .....	27
5.1. Etapa I. Trabajo de Campo .....	29
5.1.1. Colecta de suelo .....	29
5.1.2. Colecta de <i>Leersia hexandra</i> Sw .....	29
5.1.2.1. Características de <i>Leersia hexandra</i> .....	30
5.1.3. Características del petróleo .....	32
5.2. Etapa II. Trabajo en microtúnel .....	32
5.2.1. Procesado de suelo .....	32
5.2.2. Propagación de <i>L. hexandra</i> .....	33

5.2.3. Establecimiento de experimento .....	34
5.2.4. Seguimiento de variables en planta .....	37
<b>5.3. Etapa III. Trabajo de laboratorio.....</b>	<b>38</b>
5.3.1. Biomasa vegetal seca .....	38
5.3.2. Micorriza versículo arbuscular .....	39
5.3.2.1. Tinción y montaje .....	39
5.3.2.2. Esporas micorrícicas.....	42
5.3.2.2.1. Extracción de esporas micorrícicas del suelo .....	42
5.3.2.2.2. Conteo por contenido citoplasmático .....	44
5.3.2.2.3. Identificación taxonómica de especies.....	45
<b>5.4. Etapa IV. Análisis matemático y estadístico.....</b>	<b>46</b>
5.4.1. Índices relativos absolutos de adaptación y toxicidad biológica.....	46
5.4.2. Análisis estadístico .....	48
<b>CAPITULO VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>6.1. Crecimiento vegetal de <i>Leersia hexandra</i> Sw .....</b>	<b>49</b>
6.1.1. Longitud de estolones (LE) .....	49
6.1.2. Plantas jóvenes (PJ) .....	51
6.1.3. Producción de biomasa vegetal .....	53
6.1.3.1. Biomasa aérea y radical.....	53
6.1.3.2. Biomasa total (BT).....	56
<b>6.2. Análisis de los índices de fitotoxicidad a petróleo crudo de <i>Leersia hexandra</i> Sw.....</b>	<b>60</b>
6.2.1. Parámetros de crecimiento usados como índice relativo de fitotoxicidad (IRF).....	60
6.2.2. Parámetros de producción vegetal de <i>L. hexandra</i> usados como índices relativos de fitotoxicidad.....	62
6.2.3. Índice absoluto de fitotoxicidad al petróleo.....	63
<b>6.3. El petróleo crudo y la colonización micorrícica arbuscular .....</b>	<b>65</b>
6.3.1. Efecto del petróleo en estructuras fúngicas del hongo micorrícico .....	65
6.3.2. Efecto del petróleo en la colonización total .....	67
<b>6.4. Identificación de especies de hongos micorrícico arbusculares .....</b>	<b>69</b>
6.4.1. Descripción de especies de HMA identificadas .....	69
6.4.1.1. <i>Rhizophagus fasciculatus</i> (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	69

6.4.1.2. <i>Rhizophagus clarus</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	71
6.4.1.3. <i>Rhizophagus intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	71
6.4.1.4. <i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	72
6.4.1.5. <i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	73
6.4.1.6. <i>Diversispora eburnea</i> (L.J. Kenn., J.C. Stutz & J.B. Morton) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	73
6.4.1.7. <i>Diversispora</i> sp. ....	74
6.4.1.8. <i>Ambispora</i> aff. <i>gerdemannii</i> (S.L. Rose, B.A. Daniels & Trappe) C. Walker, Vestberg & A. Schüßler, in Walker, Vestberg, Demircik, Stockinger, Saito, Sawaki, Nishmura & Schüßler. ....	74
6.4.1.9. <i>Claroideoglosum amellosum</i> (Dalpé, Koske & Tews) C. Walker & A. Schüßler comb. nov. ....	76
<b>6.5. Efecto del petróleo en las especies de HMA</b> .....	<b>77</b>
<b>6.6. Análisis de los índices de micotoxicidad al petróleo</b> .....	<b>81</b>
6.6.1. Índice relativo de micotoxicidad al petróleo.....	81
6.6.2. Índice absoluto de micotoxicidad al petróleo.....	84
6.6.3. Índices relativos de toxicidad de esporas.....	85
6.6.4. Índice absoluto de toxicidad por esporas al petróleo.....	89
<b>CAPITULO VII. CONCLUSIONES</b> .....	<b>91</b>
<b>7.1 Conclusión General.</b> .....	<b>91</b>
7.1.1. Conclusiones particulares .....	92
<b>CAPITULO VIII. RECOMENDACIONES</b> .....	<b>93</b>
<b>CAPITULO IX. APÉNDICES</b> .....	<b>94</b>
<b>CAPITULO X. LITERATURA CITADA</b> .....	<b>103</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Hidrocarburos del petróleo crudo.....	7
Cuadro 2.	Datos relativos de los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos.	12
Cuadro 3.	Clasificación del Glomeromycota.....	21
Cuadro 4.	Propiedades químicas del suelo.....	35
Cuadro 5.	Efecto del petróleo crudo en la producción de biomasa aérea, radical y total del pasto <i>L. hexandra</i> a los 180 dds.....	58
Cuadro 6.	Correlación de variables.....	59
Cuadro 7.	Porcentaje de la colonización de las diferentes estructuras fúngicas del HMA en simbiosis con <i>L. hexandra</i> y esporas en suelo sin y con petróleo crudo a los 180 días después del trasplante.....	68
Cuadro 8.	Descripción de las morfoespecies de hongos micorrícicos en asociación simbiótica con <i>L. hexandra</i> en un Gleysol contaminado con petróleo crudo.....	70
Cuadro 9.	Especies de hongos micorrícicos arbusculares en suelo y rizosfera de <i>L. hexandra</i> a los 180 días de exposición al petróleo crudo.....	80

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Curva Dosis-Respuesta.....	10
Figura 2.	Secuencia de fases y respuestas inducidas en las planta por el estrés.....	16
Figura 3.	Raíces de trigo cultivado a campo, teñidas con azul de Tripán...	19
Figura 4.	Flujograma de proceso de investigación.....	28
Figura 5.	Localización de sitios de muestreo.....	30
Figura 6.	Morfología de <i>Leersia hexandra</i> Sw.....	31
Figura 7.	Procedimiento del procesado del suelo.....	33
Figura 8.	Colecta y propagación de <i>L. hexandra</i> .....	34
Figura 9.	Procedimiento del establecimiento del experimento.....	36
Figura 10.	Medición del crecimiento vegetal.....	37
Figura 11.	Secado de la biomasa vegetal.....	38
Figura 12.	Proceso de clareo y tinción de raíces.....	41
Figura 13.	Procedimiento de extracción de esporas micorrícicas.....	43
Figura 14.	Montaje de esporas.....	45
Figura 15.	Variación de la longitud de estolones del pasto <i>L. hexandra</i> por efecto del petróleo crudo en cuatro tiempos hasta los 180 dds después del trasplante.....	51
Figura 16.	Variación del crecimiento de plantas jóvenes del pasto <i>L. hexandra</i> por efecto del petróleo crudo en cuatro tiempos hasta 180 dds.....	53
Figura 17.	Índice relativo de fitotoxicidad (IRF) al petróleo crudo de tres parámetros de crecimiento vegetal de <i>L. hexandra</i> , a los 180 dds.....	61
Figura 18.	Índice relativo de fitotoxicidad (IRF) al petróleo crudo usando parámetros de biomasa vegetal de <i>L. hexandra</i> los 180 dds.....	63
Figura 19.	Índice absoluto de fitotoxicidad (IAF) al petróleo crudo de <i>L. hexandra</i> a los 180 dds.....	64
Figura 20.	Índice relativo de micotoxicidad (IRM) del HMA al petróleo crudo a los 180 dds después del trasplante.....	83
Figura 21.	Índice absoluto de micotoxicidad (IAM) al petróleo crudo del HMA a los 180 dds.....	85
Figura 22.	Índice relativo de toxicidad (IRE) de nueve especies de hongos micorrícicos a los 180 dds de exposición a petróleo crudo.....	88
Figura 23.	Índice absoluto de toxicidad (IAE) de nueve especies de hongos micorrícicos arbusculares asociado a <i>Leersia hexandra</i> Sw. a los 180 dds.....	90

## CAPITULO I

### INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos del petróleo son contaminantes persistentes en el suelo cuyos efectos tóxicos han sido documentados desde hace tiempo en diferentes regiones petroleras en el mundo (Rivera-Cruz, 2011; Trujillo-Narcía *et al.*, 2012; Orozco-Soto *et al.*, 2014). Las concentraciones tóxicas de petróleo en el suelo inhiben el crecimiento de las poblaciones y la densidad de diferentes especies de plantas, de mesofauna y de microfauna, e inducen la pérdida de la biodiversidad de comunidades microbianas importantes para los ciclos biogeoquímicos asociados a la rizosfera de los ecosistemas, lo que afecta su productividad (Salanitro *et al.*, 1997).

En el suelo contaminado las plantas participan de dos maneras; por medio de las raíces en la absorción de los contaminantes orgánicos de peso molecular bajos, acumulados, metabolizados o volatizados; y por la otra parte, la microbiota hospedada en la rizosfera de las plantas gracias a los exudados de las raíces, pueden acelerar la biodegradación de los contaminantes (Carpio *et al.*, 2005). Los hongos micorrícicos arbusculares (HMA) se hospedan en la raíz, contribuyen en la adaptación, crecimiento y nutrición de las plantas bajo condiciones ambientales adversas (Carpio *et al.*, 2005; Franco-Ramírez *et al.*, 2007; Nardini *et al.*, 2011).

La toxicidad del petróleo en HMA se manifiesta en la germinación de esporas, disminución del porcentaje de estructuras fúngicas que colonizan a la raíz y la diversidad de especies (Kirk *et al.*, 2005; Nardini *et al.*, 2011; López, 2013;). La

expresión de la toxicidad y la tolerancia causada por los hidrocarburos del petróleo en los HMA depende del género y las especies, estos han sido observados en raíces de pastos *Echinochloa polystachya*, *Leersia hexandra*, así como en *Citrus aurantium* crecidos en suelo con hidrocarburos del petróleo (Franco-Ramírez *et al.*, 2007). En *Echinochloa polystachya* la asociación con el HMA es afectada en el porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas, esporas intrarradicales y esporas en suelo (De la Cruz, 2013).

Los HMA que se establecen en rizosfera de plantas tolerantes a hidrocarburos del petróleo, son usados en bioensayos de fitorremediación para probar su capacidad en la degradación de hidrocarburos (Liao *et al.*, 2003). La fitorremediación es una tecnología que usa plantas verdes, microorganismos rizosféricos y manejo agronómico que favorecen la oxidación de moléculas orgánicas e inorgánicas contaminantes y en el mejor de los casos, los contaminantes son transformados a compuestos inocuos, en particular el CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (Cunningham *et al.*, 1996; Pilon-Smits, 2005).

Para identificar y seleccionar plantas con la capacidad de adaptación y crecimiento en suelo contaminado con petróleo, se utilizan pruebas de germinación y crecimiento en diferentes concentraciones y tipos de hidrocarburos del petróleo (Merkl *et al.*, 2006; Besalatpour *et al.*, 2008; Shirdam *et al.*, 2008; Pérez-Hernandez *et al.*, 2013). Otra área de interés es la identificación de fauna, microfauna y microflora para usar bioindicadores de la toxicidad de un suelo contaminado (Salanitro *et al.*, 1997; Chaineau *et al.*, 2003; Dawson *et al.*, 2007; Verma *et al.*, 2008).

Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, (2004); Rivera-Cruz *et al.* (2005); Vásquez-Luna *et al.* (2010); Pérez-Hernández *et al.* (2013) en México se a generado bioindicadores de la toxicidad al petróleo, basados en dosis-respuesta. Estos investigadores han utilizado parámetros relacionado con el comportamiento fisiológico de plantas y microorganismos rizosféricos que pueden ser usadas para establecer dentro de la legislación ambiental vigente protocolos de toxicidad que integren la parte biológica dentro de la evaluación y recuperación de sitios contaminados por hidrocarburos.

El pasto *Leersia hexandra* es una especie nativa del trópico húmedo del sureste de México, y denominado como japonesa, fue seleccionado por su adaptación, producción y productividad en suelos contaminados con petróleo y utilizado para la alimentación del ganado bovino en el estado de Tabasco, México (Rivera-Cruz, 2011). *Leersia hexandra* y las especies de HMA que resulten adaptadas a la toxicidad del petróleo se podrán utilizar en estudios de fitorremediación de suelos del trópico húmedo y usarse para incrementar la productividad de las praderas contaminadas con petróleo, las cuales han sido caracterizadas como improductivas.

## CAPITULO II

### REVISIÓN DE LITERATURA

#### 2.1. Definición y características químicas del petróleo fresco

El petróleo crudo es una mezcla extremadamente compleja y variable de compuestos orgánicos, donde la mayoría de los ellos son hidrocarburos, que varían en peso molecular desde el gas metano hasta los altos pesos moleculares de alquitranes y bitúmenes. Estos hidrocarburos pueden presentarse en un amplio rango de estructuras moleculares: cadenas lineales y ramificadas, anillos sencillos, condensados o aromáticos (Vargas *et al.*, 2004).

Se constituye por el 80-87 % de carbono y el 10-15 % de hidrógeno que son los principales y más abundantes elementos en el petróleo, puede presentar 0-10 % de azufre, de 0-1 % de nitrógeno y del 0-5 % de oxígeno, estos están presentes en cantidades menores ya sea en su forma elemental o bien como constituyentes heterocíclicos y grupos funcionales. También se reportan algunos metales traza como Vanadio, Níquel, Hierro, Aluminio y Cobre, cuya concentración depende del tipo de petróleo crudo y la región en donde se formó (Botello *et al.*, 2005).

Las propiedades que caracterizan al petróleo fresco son; es un aceite mineral natural, combustible, de color oscuro y olor característico, también este asume los tres estados físicos de la materia: sólido, líquido y gaseoso, según su composición, la temperatura y la presión a la que se encuentre (Marroquín, 2007).

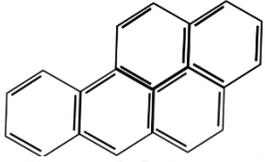
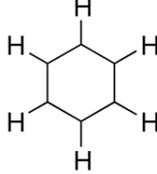
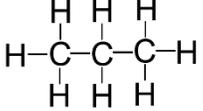
De acuerdo con Delgado (2006) el petróleo se constituye por cuatro principales grupos orgánicos; a) saturados, b) aromáticos, c) resinas y d) asfáltenos (Cuadro 1).

- a) Saturados: Pueden ser saturados de cadena lineal o isoalcanos de cadena ramificada con la formula general  $(C_nH_{2n+2})$  y con átomos de carbono desde C1 hasta C40 y en ocasiones se han reportado cadenas con más de 60 átomos de carbono, los alcanos cíclicos consisten de compuestos en los cuales todos o algunos de los átomos de carbono están arreglados molecularmente formando anillos. La gran mayoría de estos compuestos cíclicos contienen una serie de constituyentes de importancia menor y que a semejanza de los isoprenoides también están formados por precursores específicos ya sea de plantas o animales (Botello, 2005).
- b) Aromáticos: Estos tienen uno o más anillos bencénicos íntimamente ligados o conectados en su estructura molecular, estos pueden presentarse como no-substituidos o presentar una substitución en un átomo de hidrógeno por grupos metilo, denominándose a este proceso alquilación, esta última muy común en los hidrocarburos aromáticos de dos (naftalenos) o tres (antraceno y fenantreno) anillos bencénicos. El grupo de los hidrocarburos aromáticos policíclicos lo conforman aquellos compuestos cuya estructura molecular se origina por la unión de tres o más anillos bencénicos, siendo ejemplos de estos: pireno, criseno, benzo[a]antraceno, benzo[a]pireno, benzoflureno, benzo[b]fluoroanteno y pireno (Botello, 2005).
- c) Resinas: Son sustancias semilíquidas (algunas veces casi sólidas) café oscuro a negro, tienen una gravedad específica alrededor de 1.0 y peso

molecular de 500 a 2000 (Marroquín, 2007). Y son agregados con una gran cantidad de estructuras policíclicas de alto peso molecular, tales como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos, amidas, HAP, sulfuros, ácidos nafténicos, ácidos grasos, metaloporfirinas y fenoles polihidratados (Leahy y Colwell, 1990; Howe-Grant, 1996).

d) **Asfáltenos:** Es una fracción de crudo soluble en tolueno (ó benceno) e insoluble en un exceso de n–alcano (pentano o heptano). Los asfáltenos están constituidos principalmente por anillos aromáticos ligados con cadenas alquílicas y cicloalcanos, además de compuestos heterocíclicos que poseen N, S y O. Algunos estudios muestran que la relación C/H en los asfaltenos está por el orden de 1: 1.1, así mismo aproximadamente el 40% del carbono presente, es aromático (Heinemann, 1994; Groenzin y Mullins, 1999; Yarranto *et al.*, 2000).

Cuadro 1. Hidrocarburos del petróleo crudo

<b>Petróleo</b>	Hidrocarburos	Aromáticos	HAPs	 <b>Benzo[a]pireno</b>
			Monocíclicos	 <b>Benceno</b>
		Saturados	Cíclicos	 <b>Cicloparafinas</b>
			Alcanos	 <b>Propano</b>
		Fracción polar	Nitrógeno Azufre Oxígeno	Resinas y Asfáltenos

Fuente; (Groenzin, 1999; Huesenmann, 1994)

## 2.2. Teoría de la toxicidad

La toxicología estudia los mecanismos de ingreso, transformación y excreción de los tóxicos a nivel molecular y celular de los procesos de producción de daños y de desintoxicación (Peña *et al.*, 2001). Actualmente se conoce como xenobiótico a una sustancia que puede producir algún efecto nocivo sobre un ser vivo, es una continua sucesión de equilibrios dinámicos, estos tóxicos son agentes químicos o físicos que alteraran alguno de estos equilibrios (Repetto y Repetto, 2009).

Se definen grados de exposición y toxicidad de las sustancias estimando el curso o evolución del efecto sobre el tiempo; 1) Exposición aguda cuando la exposición de una sustancia se da en un periodo menor de 24 horas y con una sola absorción de esta, puede haber muerte o recuperación total o parcial del organismo con presencia de secuelas o lesiones persistentes, 2) Exposición repetida se subdivide en tres:

- a) Exposición subaguda: Es la exposición repetida de una sustancia durante el periodo de un mes o menos.
- b) Exposición subcrónica: Es exposición a la sustancia en un periodo de uno a tres meses en la cual los organismos está sometido al agente contaminante durante un tiempo inferior al 10 % de la vida media de la especie.
- c) Exposición crónica: Se da en un tiempo de exposición mayor a tres meses en la cual hay absorción de un toxico repetidas veces, por lo cual que puede ser acumulativa en los tejidos del organismos (Eaton y Klaassen, 2005; Repetto y Repetto, 2009).

Los efectos tóxicos sirven para clasificar las sustancias químicas de una manera general pero útil, por ejemplo agentes cancerígenos, no cancerígenos, mutagénicos, teratogénicos (Jaramillo-Juárez *et al.*, 2009). La dosis-respuesta de un contaminante con respecto a un ser vivo se presenta como una curva sigmoideal y se observa en la Figura 1, en la cual se analiza cuantitativamente los efectos críticos de la sustancia sobre un organismo. El efecto nocivo crítico biológico adverso se observa con el menor nivel de exposición al contaminante, para ello se identifica el NOAEL (Nivel sin efecto anverso observable) y el LOAEL (Nivel de mínimo efecto observable), así como el umbral que es el límite por el cual debajo de este no hay un incremento adicional a la respuesta (Faustman y Omenm, 2005).

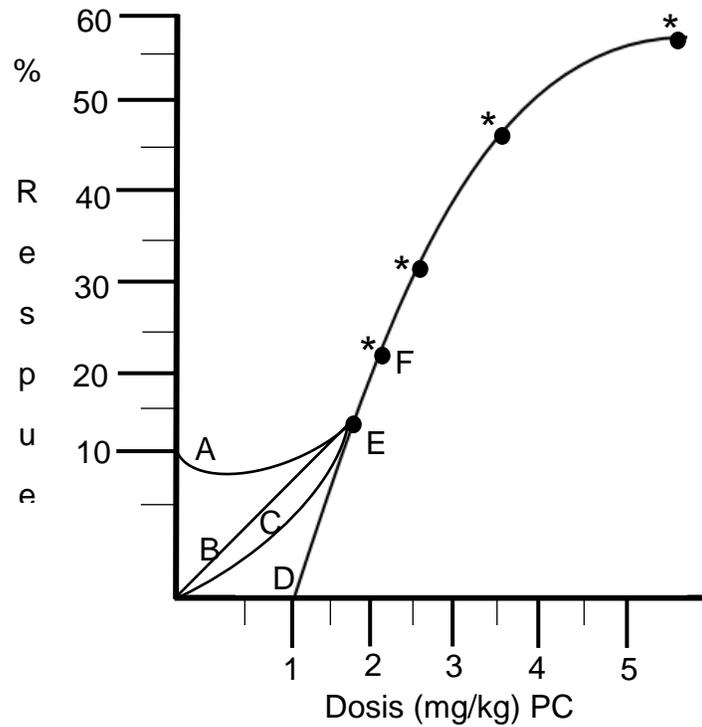


Figura 1. Curva Dosis-Respuesta. La T es la dosis umbral, aquella por debajo de la cual no se produce una respuesta biológica. El punto E representa el punto más alto de respuesta sin significancia estadística [nivel sin efecto adverso observable (NOAEL)]. El punto F es el nivel mínimo de efecto adverso observado (LOAEL). Las curvas A, B, C y D muestran las alternativas de la extrapolación de la relación entre dosis y respuesta por debajo del punto inferior de datos biológicos observables, el punto E. Los puntos representan las respuestas biológicas detectadas y La significación estadística de estas respuestas se indica con el símbolo \* (Faustman y Omenn, 2005).

### **2.3. Potencial tóxico y cancerígeno de los hidrocarburos del petróleo**

La contaminación efectuada durante los trabajos de extracción, conducción y transporte del petróleo crudo según Rivera-Cruz *et al.* (2002); Rivera-Cruz *et al.* (2005); Cuevas-Díaz *et al.* (2012) han generado un impacto negativo en el ambiente, y los ambientes contaminados con hidrocarburos del petróleo son reportados que contienen niveles de toxicidad que afectan de manera significativa las propiedades del suelo, las plantas, la microfauna y microflora del suelo (Rivera-Cruz *et al.*, 2002; Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Cuevas-Díaz *et al.*, 2012).

Los derivados del petróleo como el benceno, los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs), aceites minerales sin procesar y ligeramente procesados inducen padecimiento en humanos como cáncer en piel, leucemia y cerebro (Armstrong y Boffetta, 1998). Algunos de los HAPs pueden desarrollar también efectos cancerígenos (cutáneo, broncogénico en vías respiratorias, de vejiga, leucemia y linfoma, pulmón y efecto negativo en el sistema inmunológico), genotóxicos y/o mutagénicos, al combinarse con otros compuestos y/o generar metabolitos secundarios en el proceso de degradación. En el Cuadro 2, se observa 12 HTP's con diferente potencial de efecto carcinogenicidad, genotoxicidad y mutagenocidad (WHO, 1998; Armstrong *et al.*, 2004; Mastandrea *et al.*, 2005; Bosetti *et al.*, 2007)

Cuadro 2. Datos relativos de los efectos carcinogénicos, genotóxicos y mutagénicos de algunos hidrocarburos policíclicos aromáticos

PAHs	Carcinogenicidad	Genotoxicidad	Mutagenocidad
Fenantreno	I	L	+
Antraceno	N	N	-
Pireno	N	L	+
Benzofluorenos	I	I	?
Benzo[a]antraceno	S	S	+
Benzo[e]pireno	I	L	+
Benzo[a]pireno	S	S	+
Dibez[a]antraceno	S	S	+
Benzo[ghi]pireno	I	I	+
Dibenzopirenos	S	I	+
2-Nitronaftaleno	N	L	-
1-Nitropireno	I	S	+

S= Suficiente; I= Insuficiente; N= No cancerígeno; L= Limitado Mutagenocidad (Test de ames); + Positivo; - Negativo; ? Inconcluso Fuente; Mastandrea *et al.*, 2005.

## 2.4. Organismos del suelo

Los organismos que habitan en el suelo se dividen en: macrofauna (6 a 200 mm) e incluye a los vertebrados como ratones, topes y otros que viven parcial o totalmente en el suelo; macroflora que está constituida por las raíces primarias de las plantas vasculares. Mesofauna (0.1-2 mm) aquí encontramos pequeños invertebrados como artrópodos y anélidos; microfauna (<0.1mm) principalmente nematodos, rotíferos, protozoarios. La microflora (<0.1mm) está constituida por los pelos radicales de plantas vasculares, algas, hongos, bacterias, cianobacterias, actinomicetos (Porta *et al.*, 2003; Navarro y Navarro, 2003; Brady y Weil, 2008).

Los organismos tienen una función esencial en los suelos, dentro de esas funciones tenemos: 1) Macrofauna; pulverización, granulación, aireación, drenado, incorporación de materia orgánica por medio de su ciclo vital y transporte de grandes cantidades de suelo. 2) Mesofauna; inician el proceso de descomposición en la cadena trófica al alimentarse de materia vegetal semidescompuesta. 3) Microfauna; se encargan de la descomposición de la materia orgánica. 4) Macroflora: proporcionar un hábitat favorable para los organismos que se alojan en la rizosfera de estas. 5) Microflora; transforman los constituyentes del suelo, degradan compuestos altamente resistentes como celulosa o lignina y son muy importantes para formación de humus (hongos), degradación de materia orgánica y la liberación de nutrientes por reducción de compuestos resistentes (actinomicetos), participan en todas las transformaciones orgánicas vitales como la nitrificación, oxidación del azufre, fijación de nitrógeno atmosférico (bacterias) (Navarro y Navarro, 2003).

## **2.5. Importancia de la rizosfera en suelos con hidrocarburos**

Se define a la rizosfera como la capa de suelo que rodea las raíces, es llamada ectorizosfera, mientras que la capa de raíz colonizada o potencialmente colonizable por microorganismos es conocida como endorizosfera, las dos zonas están separadas por la superficie de la raíz a la que se le denomina rizoplano. El término micorrizosfera se utiliza para indicar el suelo que rodea una raíz infectada por un hongo micorrízico (Gobat *et al.*, 2003). El tamaño de estas depende de la particular estructura del sistema radical y la zona de contacto suelo raíz puede ser grande pero depende de este último. La cantidad de microorganismos son mayor en la rizosfera y rizoplano que en los lugares alejados de la raíz y se debe a que las raíces excretan

cantidades significativas de azúcares, aminoácidos, hormonas y vitaminas que sirven como fuente de carbono y energía (Pinton *et al.*, 2001; Atlas y Barta, 2002; Madigan *et al.*, 2009).

Las raíces de las plantas vasculares juegan un papel importante en los ambientes contaminados ya que en su rizosfera se establece el microambiente para los organismos, donde hay procesos relacionados con el agua, nutrición mineral, intercambio de cationes, producción de exudados, degradación de compuestos orgánicos, remoción de contaminantes, entre muchos otros, que la hacen diferente del resto del suelo en sus propiedades físicas, químicas y biológicas, es en ella donde la poblaciones de microorganismos está condicionada tanto cualitativa y cuantitativamente (Walton y Anderson, 1990; Porta *et al.*, 2003; Reyes-Jaramillo, 2011).

## **2.6. Fisiología del estrés en plantas**

La rizosfera es la base de la planta para soportar el estrés inducido por factores, físicos, químicos o biológicos. El estrés es una situación en la que algún factor ambiental actúa de manera desfavorable para la planta lo que afecta su desarrollo óptimo, la imposibilidad de movimiento a voluntad de estas las obliga a que se adapten a los cambios que se presentan en su medio para poder sobrevivir (Tadeo, 2000; Taiz y Zeiger, 2006). Existen factores bióticos y abióticos que influyen en el estrés de las plantas: Los factores bióticos (animales grandes y pequeños, otras plantas, insectos, nematodos, bacterias, hongos, virus y viroides) y abióticos (sequía, exceso de sales, temperaturas extremas, anegación, contaminantes ambientales,

deficiencia de elementos, viento, compactación del suelo y lesiones o heridas). La respuesta de las plantas a los factores bióticos y abióticos causantes de estrés es diversa, algunas tienen la capacidad de tolerar y se consideran como resistentes, otras plantas no se adaptan y mueren (Hopkins y Hüner, 2008; Escaso-Santos *et al.*, 2010).

El estrés en plantas vasculares sucede en cuatro fases (Figura 2). 1) Fase de alarma: Las plantas que no poseen mecanismos de defensa o respuesta al estrés tienen daños irreversibles y mueren. Esto se debe a que se supera la capacidad de resistencia y disminución de la vitalidad y los procesos catabólicos exceden a los anabólicos. 2) Fase de restitución: La planta alcanza un nuevo estado fisiológico con un grado máximo de resistencia, pero si el estrés continúa la capacidad de resistencia se agota, aquí se dan procesos de adaptación, procesos de reparación, endurecimiento o reactivación. 3) Fase agotamiento: En esta fase si el estrés no desaparece puede ocasionar muerte celular, se da en el estrés de larga duración y puede haber intensidad del estrés demasiado alta, sobrecarga de la capacidad de adaptación, daño crónico o la muerte celular. 4) Fase de regeneración: En esta fase la planta puede alcanzar un estado fisiológico óptimo y los ciclos de estrés/repuesta se dan de manera rutinaria a lo largo de la vida de las plantas regeneración parcial o completa del funcionamiento fisiológico, cuando el agente estresante es eliminado y el daño no ha sido muy intenso (Lichtenthaler, 1996; Tadeo, 2000).

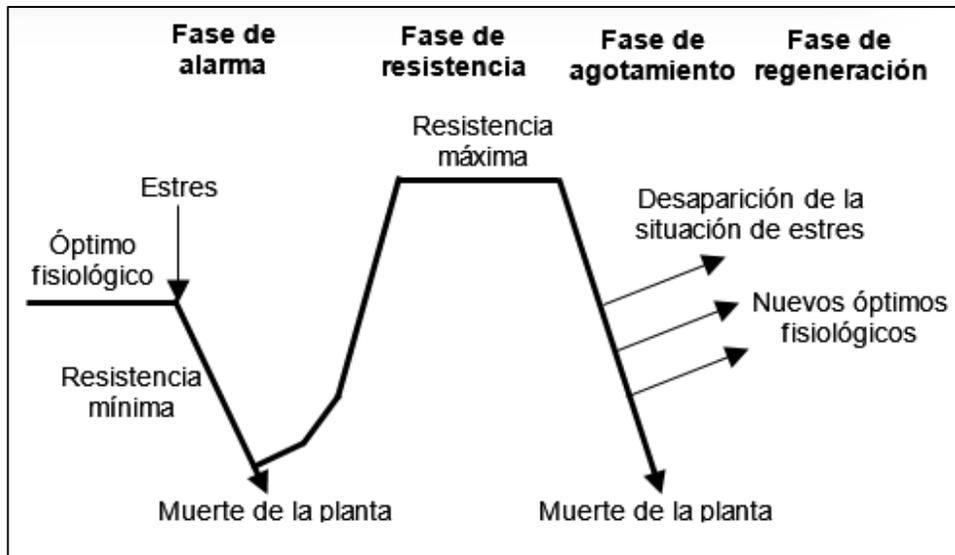


Figura 2. Secuencia de fases y respuestas inducidas en las plantas por el estrés (Tadeo, 2000).

### 2.6.1. Potencial de adaptación de las plantas y microorganismos

La presencia de los HTP's ocasiona efectos adversos sobre los distintos grupos de organismos del suelo. El primer síntoma que se manifiesta al entrar en contacto el petróleo con la planta es clorosis y muerte (Olguín *et al.*, 2007). Sin embargo, también se ha encontrado que algunas plantas vasculares como; *Brachiaria mutica*, *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Triticum aestivum* y *Zea mays* (Maldonado-Chávez, *et al.*, 2010; Atlas y Bartha, 2002; García *et al.* 2013) tienen tolerancia al efecto fitotóxico del petróleo. La tolerancia y adaptación al petróleo de las gramíneas en particular los pastos se le atribuye según April y Sims, (1990); Walton *et al.*, (1994); Gould y Shaw, (1992) a que poseen defensas bioquímicas y fisiológicas a sustancias orgánicas derivadas del petróleo, y sobre todo producen raicillas fibrosas abundantes con alta densidad que logran explorar hasta 2.7 metros de profundidad del suelo.

Los microorganismos del suelo al igual que las plantas vasculares, han demostrado ser tolerantes al petróleo, en una primera fase la diversidad de bacterias y hongos disminuye. Las poblaciones de microorganismos que logran sobrevivir de manera natural son resistentes al contaminante, debido a que desarrollan la habilidad de utilizar como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos del petróleo (Muñoz-Castellanos *et al.*, 2010). Esta habilidad le permite al microorganismo realizar procesos metabólicos y fisiológicos en ambientes contaminados y formar parte de una microflora resistente y adaptada a las nuevas condiciones del ecosistema (Atlas *et al.*, 1991). Ejemplos de estos organismos los mencionan Hernández-Acosta *et al.* (2000) donde las especies de *Pseudomonas* sp., *Agrobacterium* sp., *Trichoderma* sp., *Aspergillus* sp. y *Mucor* sp, presentes en la rizosfera fueron capaces de degradar hidrocarburos en un suelo contaminado. De igual manera los hongos micorrícicos arbusculares de las especies; *Glomus verisiforme*, *Glomus intrarradices*, *Glomus aggregatum*, *Glomus mosseae* han sido reportados como tolerantes a fenantreno, antraceno, petróleo crudo y metales pesados (Cabello, 1997; García *et al.*, 2000; Liu y Dalpe, 2009).

## **2.7. Importancia de la micorriza arbuscular en el suelo**

Se llama micorriza a la asociación simbiótica que existe entre las raíces de las plantas con las hifas de ciertos tipos de hongos del suelo, estas últimas son consideradas como la principal estructura del hongo involucrada en la captación de nutrientes para la mayoría de las plantas terrestres y dentro de las micorrizas podemos encontrar a las ectendomicorrizas, ericoides, arbutoides, monotropoides, orquideoide, ectomicorriza, y arbuscular, esta última se encuentra presente en más

del 80 % de las familias de plantas de la tierra (Atlas y Bartha, 2002; Gobat *et al.*, 2003; Giri *et al.*, 2005; Madigan *et al.*, 2009; Camarena-Gutiérrez, 2012).

El hongo micorrízico arbuscular (HMA), desde el punto de vista funcional, es una estructura especializada relacionada con la absorción nutrimental de la planta especialmente del fósforo, y es una asociación entre la raíz de una planta con hongos del phylum *Glomeromycota*, clase *Glomeromycetes*, órdenes [*Glomerales*, *Diversisporales*, *Paraglomerales*, *Archaeosporales*] (Schüßler *et al.*, 2001; Redecker *et al.*, 2013). El HMA crece en el interior de la raíz hospedera, en el apoplasto de las células corticales y otra en el exterior, estas se comunican con un micelio externo que explora gran parte del suelo (Reyes-Jaramillo, 2011).

En esta asociación mutualista ocurre un intercambio nutricional en donde las hifas de los HMA son capaces de absorber los fosfatos hasta 1000 veces más rápido que por la difusión mediante la solución del suelo. También permiten estabilizar al suelo por los agregados por medio de la glomalina (Guerra-Sierra, 2007), proporciona resistencia al estrés por sequía, estabilización de metales pesados y acidez del suelo, mejoran la captación de otros iones del suelo como zinc, sulfatos o amonio todo hasta en la zonas donde las raíces no tienen influencia (Atlas y Bartha, 2002).

Las estructuras típicas de HMA son los arbuscúlos (Figura 3a, 3b) que poseen forma de árbol y constituyen ramificaciones de las hifas dentro de las células vegetales, su función radica en el intercambio de nutrientes. Las vesículas (Figura 3c, 3e) son de forma ovoide y pueden formarse inter o extracelularmente, aquí es donde se

almacenan las sustancias de reserva y polifosfatos. Las esporas (Figura 3d, 3e) son de forma globosa, extracelulares, su función principal es almacenamiento y propagación dentro del cual cuando las esporas germinan sus hifas recorren el suelo en busca de la raíz y cuando la encuentran se da el proceso de infección por medio de un apresorio (Figura 3f), cuando la simbiosis queda establecida el potencial de exploración del hongo es mayor (Nardini *et al.*, 2011).

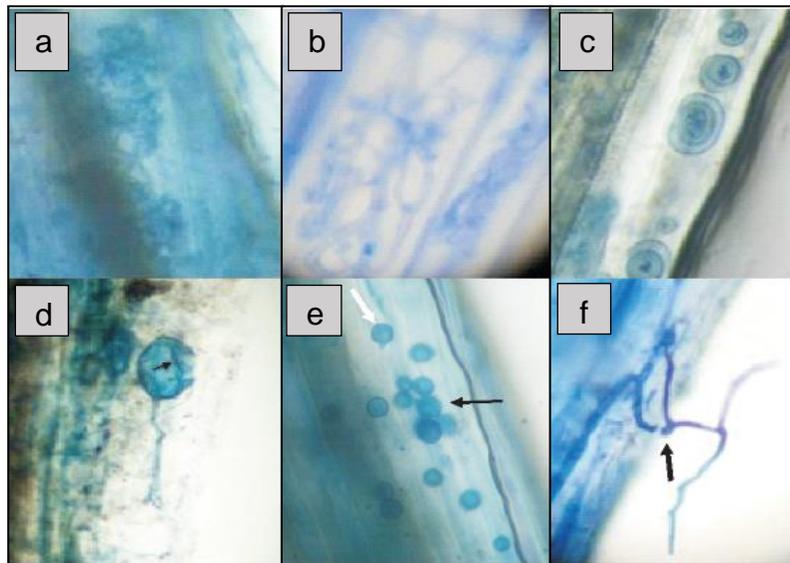


Figura 3. Raíces de trigo cultivado a campo, teñidas con azul de Tripán. a: Arbúsculos en tejido cortical a 100x. b: Arbúsculos dentro de célula vegetal a 1000x. c: Vesículas a 400x. d: Espora germinada cuya hifa ha penetrado la raíz 100x. e: Vesículas (flecha negra) y esporas (flecha blanca) en tejido cortical. f: Hifas y apresorio (flecha) sobre células de la raíz (400x) (Nardini *et al.*, 2011).

La colonización de la planta por el HMA, puede regular sus mecanismos de defensa y localizarlos a nivel celular para controlar la colonización y formación de arbusculos de acuerdo con sus necesidades, de tal forma que aparentemente es la planta quien controla la simbiosis. El HMA para garantizar su supervivencia debe colonizar a la planta por lo cual es posible que emita señales para debilitar las defensas de la planta, aunque hasta el momento no se ha podido evidenciar la existencia de este mecanismo (Alarcón *et al.*, 2007; Ramírez-Gómez y Rodríguez-Villate, 2011).

### **2.7.1. Diversidad de hongos micorrícicos**

La diversidad de los HMA en el ambiente es numerosa, actualmente se clasifica según Redecker *et al.*, (2013) en 4 ordenes, 11 familias y 25 géneros (Cuadro 3). La identificación de los géneros y especies del HMA, es de gran importancia por la función que estos desempeñan en el suministro de nutrientes y su nivel de resistencia a factores ambientales. Al respecto Schüßler (2015); Blaszkowski (2015); INVAM (2015); consideran que las características morfológicas para clasificarlas a nivel de género y especie son; pared y estratos de pared (número, tipo, grosor, arreglo, ornamentaciones); hifas de origen (forma, pared, zona de oclusión); citoplasma (en esporas maduras, en esporas jóvenes); estructuras especializadas para la germinación (cámaras, escudos, estratos germinales).

Cuadro 3. Clasificación del Glomeromycota

<b>Orden</b>	<b>Familia</b>	<b>Género</b>	<b>Tipo Genérico</b>
Paraglomerales	Paraglomeraceae	<i>Paraglomus</i>	<i>P. occultum</i>
Archaeosporales	Archaeosporaceae	<i>Archaeospora</i>	<i>A. trappei</i>
	Geosiphonaceae	<i>Geosiphon</i>	<i>G. pyriformis</i>
	Ambisporaceae	<i>Ambispora</i>	<i>A. Fennica</i>
Glomerales	Glomeraceae	<i>Sclerocystis</i>	<i>S. coremioides</i>
		<i>Rhizophagus</i>	<i>R. populinus</i>
		<i>Septoglomus</i>	<i>S. constrictum</i>
		<i>Funneliformis</i>	<i>F. mosseae</i>
		<i>Glomus</i>	<i>G. macrocarpum</i>
	Claroideoglomeraceae	<i>Claroideoglomus</i>	<i>C. claroideum</i>
Diversisporales	Gigasporaceae	<i>Scutellospora</i>	<i>S. calospora</i>
		<i>Racocetra</i>	<i>R. coralloidea</i>
		<i>Cetraspora</i>	<i>C. gilmorei</i>
		<i>Detiscutata</i>	<i>D. nigra</i>
		<i>Gigaspora</i>	<i>G. gigantea</i>
		<i>Intraornatospora</i> <sup>¶</sup>	
		<i>Parandentiscutata</i> <sup>¶</sup>	
		Pacisporaceae	<i>Pacispora</i>
	Saculosporaceae <sup>¶</sup>	<i>Saculospora</i> <sup>¶</sup>	
	Acaulosporaceae	<i>Acaulospora</i>	<i>A. laevis</i>
	Diversisporaceae	<i>Redeckera</i>	<i>R. megalocarpa</i>
		<i>Corymbiglomus</i> <sup>¶</sup>	
		<i>Diversispora</i>	<i>D. spurca</i>
<i>Otophora</i> <sup>¶</sup>			
<i>Tricispora</i> <sup>¶</sup>			

<sup>¶</sup> Género o familia con evidencia taxonómica insuficiente. Fuente; Redecker *et al.*, 2013

## 2.8. Organismos indicadores de estrés a los hidrocarburos

Se han realizado diversos estudios que presentan indicadores de estrés por medio de la toxicidad que inducen los hidrocarburos del petróleo en el crecimiento de un organismo. Los parámetros que se utilizan para obtener indicadores de estrés en planta son; altura, biomasa foliar y raíz, número de nódulos y presencia de leghemoglobina en nódulos (Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Vázquez-Luna *et al.*, 2010; Pérez-Hernández *et al.*, 2013). Algunas plantas tropicales que han demostrado que son indicadoras de estrés a petróleo crudo e intemperizado se encuentran; leguminosas (*Crotalaria* sp, *Leucaena* sp, *Mimosa* sp y *Mimosa pigra*) (Rivera-Cruz *et al.*, 2005). *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam (Vázquez-Luna *et al.*, 2010), y *Leucaena leucocephala* (López-Ortiz *et al.*, 2012).

En cuanto a especies forestales han demostrado un efecto estimulador en una situación de estrés, debido a que las especies de *Cedrela odorata*, *Swietenia macrophylla* la germinación fue estimulada gracias a la presencia de petróleo crudo pesado, sin embargo en la variable de altura y biomasa de plántulas las especies estudiadas (*Cedrela odorata*, *Haematoxylum campechianum*, *Swietenia macrophylla* y *Tabebuia rosea*) sufrieron un efecto negativo por la presencia del petróleo (Pérez-Hernández, 2013).

Las plantas de marisma *Salicornia fragilis* Ball y *Tutin* mostraron alta sensibilidad a la toxicidad de aceite combustible pesado, debido a que presento alta tasa de mortalidad, trastornos en el crecimiento y desarrollo (Meudec *et al.*, 2007). Así mismo

en cultivos comerciales de *Triticum aestivum* L., *Hordeum vulgare*, *Glycine hyspida* fueron afectados por los HTP's y los HAPs en la densidad de plantas y el rendimiento de cultivos de manera fuerte (Kisic *et al.*, 2009). Tang *et al.* (2010) encontraron que la germinación de *Gossypium hirsutum* y *Euchlaena mexicana* fue completamente inhibida por la acción de los HTP's.

### **2.8.1. El uso de los pastos como indicador de estrés por petróleo**

Se han realizado estudios de pastos (Poaceae) que pueden funcionar como indicadores del estrés por medio de la toxicidad establecida sobre ellas por los HTP's o sus derivados. Rivera-Cruz y Trujillo-Narcia (2004) determinaron que *Brachiaria mutica* y *Echinochloa Polystachya* tuvieron una disminución en la germinación, altura, longitud de raíz, biomasa total a nivel de plántulas a los 32 día de exposición al petróleo fresco e intemperizado, y disminución en altura y biomasa total a los 150 días. Zavala-Cruz *et al.*, (2005) describió que *Brachiaria humidicola*, *Echinochloa polystachya* y *Brachiaria mutica* tuvieron un rendimiento negativo en la materia seca total al ser sembrados en tres tipos de suelos contaminados con petróleo provenientes de derrames. Sangabriel *et al.*, (2006) demostraron que en presencia de combustóleo los pastos *Brachiaria híbrido*, *Brachiaria bizantha* y *Panicum maximum*, tuvieron un efecto negativo en la altura de planta, volumen radical, peso seco y parte aérea de la raíz. Mezzari *et al.* (2011) encontró que en los pastos *Brachiara decumbens* y *Paspalum notatum* su biomasa sufrió una disminución significativa por la toxicidad ocasionada por el diésel.

### 2.8.2. El uso de la micorriza arbuscular como indicadora de estrés

La micorriza arbuscular aún no ha sido usada como indicadora de estrés, pero si se ha evaluado el efecto de los hidrocarburos sobre sus estructuras fúngicas y colonización, al respecto Franco-Ramírez *et al.* (2007) determinó que *Glomus Ambisporum* tuvo baja germinación y disminución de la longitud de la hifa en presencia con hidrocarburos totales del petróleo, de igual manera con *Glomus mosse* encontró que hubo una disminución en la longitud hifal.

En HAPs se ha encontrado que en *Glomus intrarradices* la densidad de hifas intraradicales, la esporulación y la colonización en raíz se ve afectada en presencia de antraceno y fenantreno (Debiane *et al.*, 2008; Villegas-Vásquez, 2011). En presencia de antraceno y benzo[a]pireno en *Glomus irregulare* la longitud de la hifas intraradicales y la producción de esporas se restringieron y en *Rhizophagus irregularis* tienen un efecto perjudicial sobre su crecimiento en raíz, aunado a esto la combinación de ambos HAPs aumentaron su toxicidad y se afectó el transporte de fósforo del hongo a la raíz y la actividad enzimática fosfatasa en raíz (Debiane, *et al.*, 2011; Calonne *et al.*, 2014).

## CAPITULO III

### OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo general

Analizar el efecto del petróleo crudo en el crecimiento y producción de *Leersia hexandra*, en la asociación de la micorriza arbuscular e identificar la cantidad de morfoesporas en el suelo para seleccionar su potencial de adaptación e indicadores de la toxicidad a suelos contaminado, para contribuir en la generación de parámetros biológicos base de la evaluación de la sustentabilidad de fincas ganaderas impactadas por la actividad petrolera en el sureste de México.

##### 3.1.1. Objetivo particulares

1. Determinar el efecto del petróleo crudo en el crecimiento y producción de *L. hexandra*, para seleccionar indicadores de fitotoxicidad.
2. Cuantificar estructuras fúngicas del hongo micorrícico arbuscular (HMA) en la raíz de *L. hexandra* expuesta a diferentes dosis de petróleo crudo, que sirvan de base en la selección de indicadores de micotoxicidad.
3. Identificar a nivel de especies a los hongos micorrícicos que se establecen en suelo contaminado con petróleo crudo y asociado a *Leersia hexandra*.
4. Seleccionar las especies de HMA que presenten respuestas tóxicas y de adaptación a las diferentes dosis de petróleo crudo, para proponerlos como índices de toxicidad.

## CAPITULO IV

### HIPÓTESIS

#### 4.1. Hipótesis general

Mientras mayor sea la concentración de petróleo crudo vertida en el suelo, mayor serán los efectos tóxicos en el crecimiento y producción de *Leersia hexandra*, especies y colonización del hongo micorrízico arbuscular intrarradicales, parámetros que permitirán la selección de indicadores de toxicidad y adaptación al petróleo de estos organismos que son base de la sustentabilidad de fincas forrajeras.

##### 4.1.1. Hipótesis particulares

1. La longitud de estolones, plantas jóvenes, biomasa vegetal de *L. hexandra* son parámetros que se afectan al aumentar la concentración de petróleo en el suelo, y son de utilidad para obtener indicadores de fitotoxicidad.
2. El porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas y esporas intrarradicales en *L. hexandra* son parámetros que muestran niveles de sensibilidad a la concentración de petróleo crudo en el suelo y se pueden proponer como indicadores micotóxicos.
3. La raíz de *L. hexandra* y los diferentes contenidos de petróleo en el suelo no afectan el establecimiento de la diversidad de especies de HMA.
4. Las especies de HMA son afectadas por las diferentes dosis de petróleo crudo por lo que se puede generar índices de toxicidad, pero al menos una de estas sobrevive en concentraciones altas gracias a su adaptación al medio.

## CAPITULO V

### MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados *Campus Tabasco* ubicado en Periférico Carlos A. Molina s/n, km. 3.5, Huimanguillo, Tabasco y Laboratorio de Micorrizas, del Centro de Investigación de Ciencias Biológicas (CICB), Universidad Autónoma de Tlaxcala (UATx). San Felipe Ixtacuixtla, Tlaxcala, México. El proceso de investigación consistió de cuatro etapas secuenciales: Etapa I. Trabajo en campo. Etapa II. Trabajo en microtúnel. Etapa III. Trabajo en laboratorio. Etapa IV. Análisis matemática y estadísticos (Figura 4).

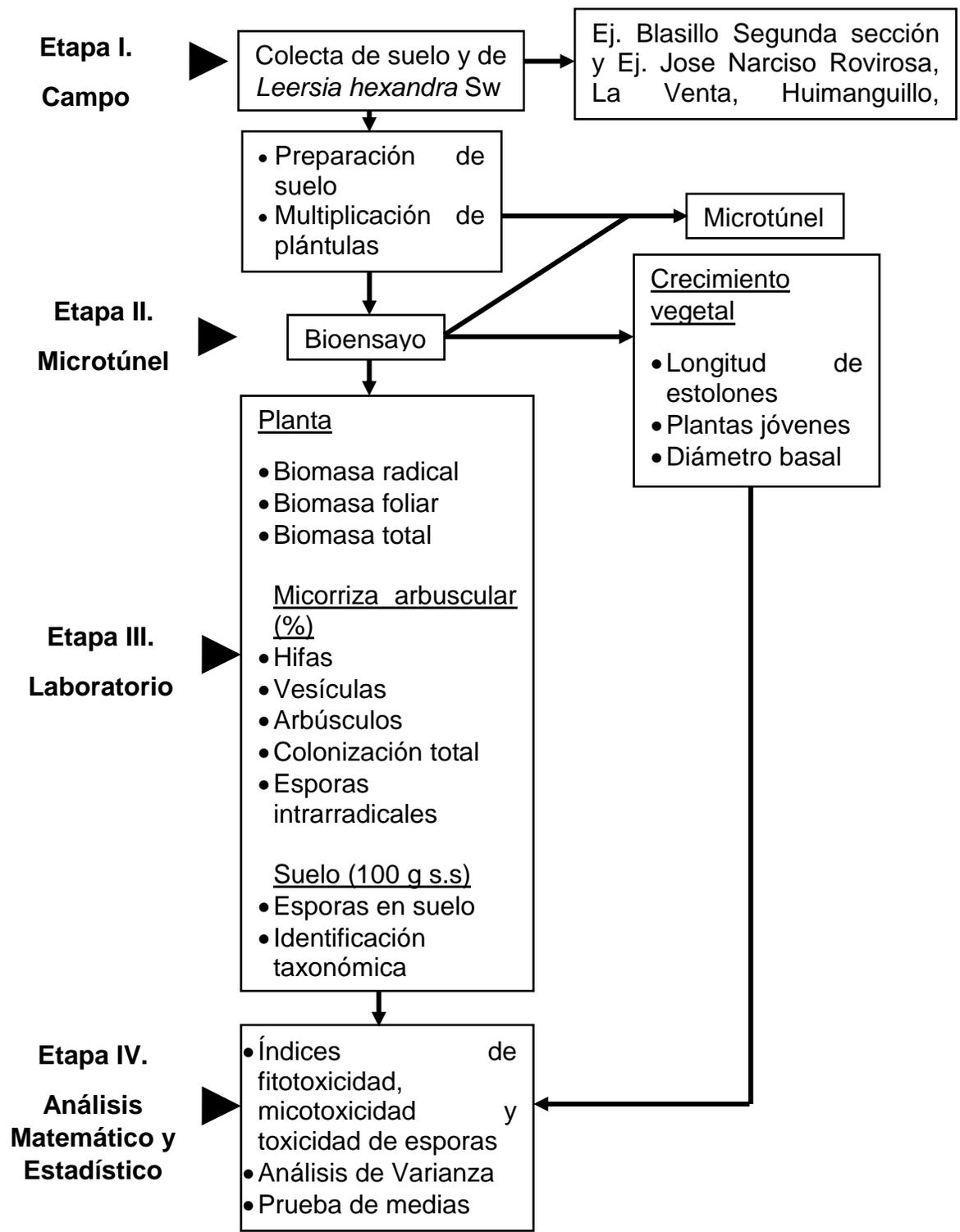


Figura 4. Flujograma de proceso de investigación.

## **5.1. Etapa I. Trabajo de Campo**

### **5.1.1. Colecta de suelo**

Se colectó suelo del horizonte superficial (0-30 cm) de un Gleysol, ubicado en el Ej. Blasillo segunda sección, Huimanguillo, Tabasco, con coordenadas geográficas; 18° 03' 08.0 latitud Norte y 93° 56' 06.3 latitud Oeste (Figura 5a). Se colectó 50 kg de suelo, el cual se introdujo en bolsas de plástico y se trasladó a las instalaciones del Laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental del Colegio de Postgraduados, *Campus* Tabasco.

### **5.1.2. Colecta de *Leersia hexandra* Sw**

La colecta de *L. hexandra* se realizó en una pradera que se utiliza para el pastoreo de animales en el ejido José Narciso Rovirosa, Huimanguillo, Tabasco, a 2 Km al suroeste del Complejo Petroquímico Procesador de Gas de la Villa La Venta, Tabasco, con coordenadas geográficas 18° 4' 37.05" latitud Norte y 94° 2' 28.28" longitud Oeste (Figura 5b). Se cortaron tallos con yemas maduras de *L. hexandra* se sumergidas en agua para su traslado al invernadero.

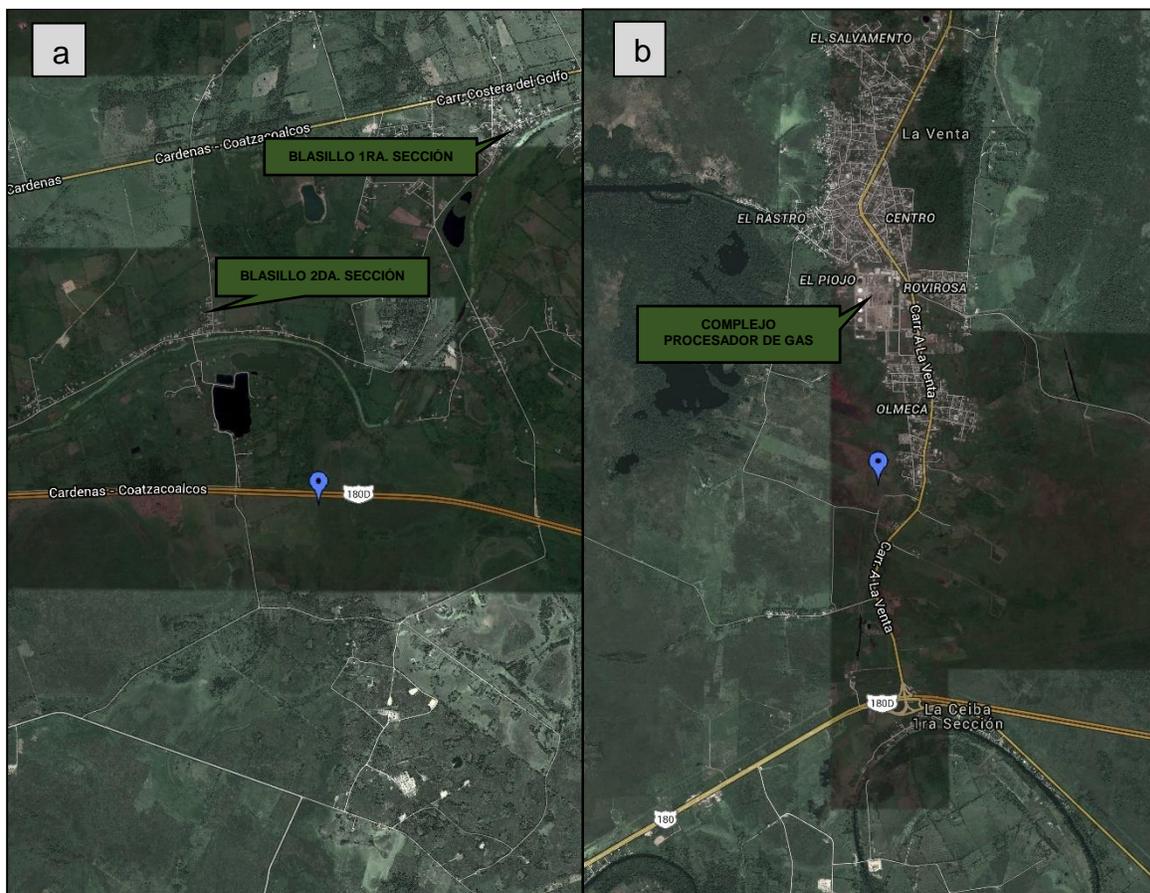


Figura 5. Localización de sitios de muestreo. a) Suelo Gleysol, Ej. Blasillo Segunda Sección, Huimanguillo, Tabasco b) Sitio de muestreo de *L. hexandra* Ej. Jose Narciso Rovirosa, Huimanguillo, Tabasco (Google maps, 2015).

#### 5.1.2.1. Características de *Leersia hexandra*

*Leersia hexandra* Swartz es una planta perenne, amacollada, hierba alta, que se reproduce vegetativamente por rizomas rastreros y por semillas pero este último es muy raro (Figura 6). Se encuentra generalmente en lugares de mucha humedad (acequias, arroyos, curso de agua, matorrales húmedos, estanques, arrozales

inundados, tierras cultivables húmedas y pantanos, por lo general en agua dulce (CABI, 2015).



Figura 6. Morfología de *Leersia hexandra* Sw. (DWAF, 2008; STDF, 2015)

Dominio: Eukaryota

Reino: Plantae

Phylum: Espermatophyta

Clase: Monocotyledonae

Orden: Cyperales

Familia: *Poaceae*

Género: *Leersia*

Especie: *Leersia hexandra* Swartz

*L. hexandra* es muy parecida a las plantas del género *Oryza* y puede ser distinguida debido a que la aurícula en el cruce de la vaina, la cuchilla y la gluma inferior y carece de la superior. Las hojas de *Leersia* son muy ásperas al tacto, tiene pelos en el envés en la parte inferior de la nervadura central, aunque se han encontrado especímenes con las hojas glabras, rizomas alargados; cañas 25-150 cm de largo, decumbentes, con enraizamiento en los nudos, nudos expuestos, densamente

retorse-pubescentes a casi glabras, a menudo algo encogidos especialmente al secarse; vainas toscamente escabrosa-híspidas a glabra, márgenes ciliados a menudo visibles, lígula truncada, 1-6 mm de largo, aurículasdas; cuchillas de 5-15 cm de largo, 3-5 mm de ancho, escabrosas a casi glabras por encima y por debajo; panículas 5-25 cm de largo, exertos, ramas 3-13 cm de largo, filiformes, ascendentes, espiguillas 3-4.4 (5.0) mm de largo, inmbricados, lema agudo a acuminada, ciliadas 0.6 mm de largo en la quilla y en los márgenes; cortos hispidas a glabras lateralmente; la subpalea es igual a la lema, ciliadas en la quilla; seis estambres, anteras de 2-3 mm de largo; pistilo aproximadamente de 2.5 mm; El fruto en forma de cariósipide por lo general no se desarrolla (Pyrah, 1969; CABI, 2015).

### **5.1.3. Características del petróleo**

El petróleo que se utilizó fue colectado en la batería No.5 campo petrolero Cinco Presidentes, Agua Dulce, Veracruz. Es un petróleo crudo Ismo, clasificado como mediano del Golfo de México y la composición químicas es: saturados 56.4 % peso, aromáticos de 23.7 % peso y de polares / NHC de 44.1 % peso (Dorn *et al.*, 1998).

## **5.2. Etapa II. Trabajo en microtúnel**

### **5.2.1. Procesado de suelo**

El suelo colectado (Figura 7a) es un Gleysol y fue extendido bajo sombra a temperatura ambiente sobre lona de vinilo (Figura 7b), al estar seco el suelo se

removió manualmente las raíces y restos orgánicos grandes, posteriormente se molió (Figura 7c) y tamizó en malla de acero inoxidable con abertura de 5 mm (Figura 7d).



Figura 7. Procedimiento del procesado del suelo. a) Colecta de suelo Ej. Blasillo, segunda sección, Huimanguillo, Tabasco; b) Tendido y secado bajo sombra; c) Molido de suelo d) Tamizado en maya de acero inoxidable de 5 mm de abertura.

### 5.2.2. Propagación de *L. hexandra*

Con las yemas que se se sumergieron en agua (Figura 8a) en microtúnel se estableció un almácigo de *L. hexandra* con yemas maduras de cuatro cm de longitud. Las yemas se sembraron en charola de poliestireno (52 cm de largo X 27 cm de ancho) (Figura 8b) y se cubrieron con materia vegetal por un periodo de ocho días para conservar la temperatura y humedad. Se aseguró el brote de las yemas (Figuras 8c, 8d). Al día 50 las plántulas alcanzaron una altura de  $11.81 \pm 3.01$  (Figura 8e).



Figura 8. Colecta y propagación de *L. hexandra*. a) Colecta de *L. hexandra* en Ej. José Narciso Roviroso, Huimanguillo, Tabasco; b) Siembra de yemas maduras en charolas de poliestireno (200 plántulas); c) Guardado de humedad al colocar una cama de materia vegetal sobrante; d) Plántulas a los 15 dds; e) Plántulas a los 50 dds.

### 5.2.3. Establecimiento de experimento

Para simular un vertido de petróleo fresco en el suelo, se integró un diseño experimental con ocho concentraciones de petróleo fresco y un suelo sin petróleo (testigo), y cuatro repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron nueve, T0: 693 mg kg<sup>-1</sup> de HTP's (biogénico), T1: 3000, T2: 10000, T3: 30000, T4: 60000, T5: 90000, T6: 120000, T7: 150000 y T8: 180000 mg kg<sup>-1</sup> base seca de HTP's. El suelo de los nueve tratamientos tiene fertilidad alta, textura arcillosa (método hidrométrico), pH moderadamente ácido (potenciometría), cantidades altas de CO (Walkley y Black,

1934), alta cantidad de  $N_{total}$  (Page *et al.*, 1982), bajos contenidos de  $P_{disponible}$  (Olsen y Somer, 1982) y niveles altos de sulfato ( $S-SO_4$ ) (Etchevers, 1992) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Propiedades químicas del suelo

HTP's (mg kg <sup>-1</sup> )	pH	OM (%)	N (%)	P (mg kg <sup>-1</sup> )	S-SO <sub>4</sub> (mg kg <sup>-1</sup> )
693 <sup>†</sup>	6.1	26.40	0.35	5.794	28.67
3 000	6.1	26.34	0.51	6.0574	25.33
10 000	6.3	26.94	0.52	5.5307	33.67
30 000	6.0	27.54	0.49	5.2673	32.00
60 000	6.1	28.88	0.49	5.2673	48.67
90 000	6.0	30.10	0.52	6.3208	83.67
120 000	5.7	30.48	0.54	8.4277	92.00
150 000	5.5	31.76	0.52	8.6911	73.67
180 000	5.5	32.94	0.51	8.43	105.33

<sup>†</sup>Biogenico.

La unidad experimental fue de vidrio con capacidad de 1500 g (18 cm de altura y 13 cm de diámetro). En cada unidad experimental se adicionó 1200 g de suelo seco (Figura 9a, 9b) y la respectiva concentración de petróleo fresco (mg kg<sup>-1</sup>) (Figura 9c) del tratamiento correspondiente (3.6, 12, 36, 72, 108, 144, 180, 216 g), se homogenizo y se llevó a una humedad del 28 % (Figura 9d). Se trasplantaron dos plántulas de *L. hexandra* (altura de 11.81 ± 3.01) en cada unidades experimental (Figura 9e). A los 12 dds se deshijo una planta y se aleatorizaron las UE (Figura 9f). A los 30 dds se le colocó un soporte de metal a cada unidad experimental (Figura 9g) con el objetivo de conducir el crecimiento de la planta. Las 36 unidades

experimentales se distribuyeron completamente al azar en las mesas ubicadas en el microtúnel las cuales permanecieron durante 180 dds.

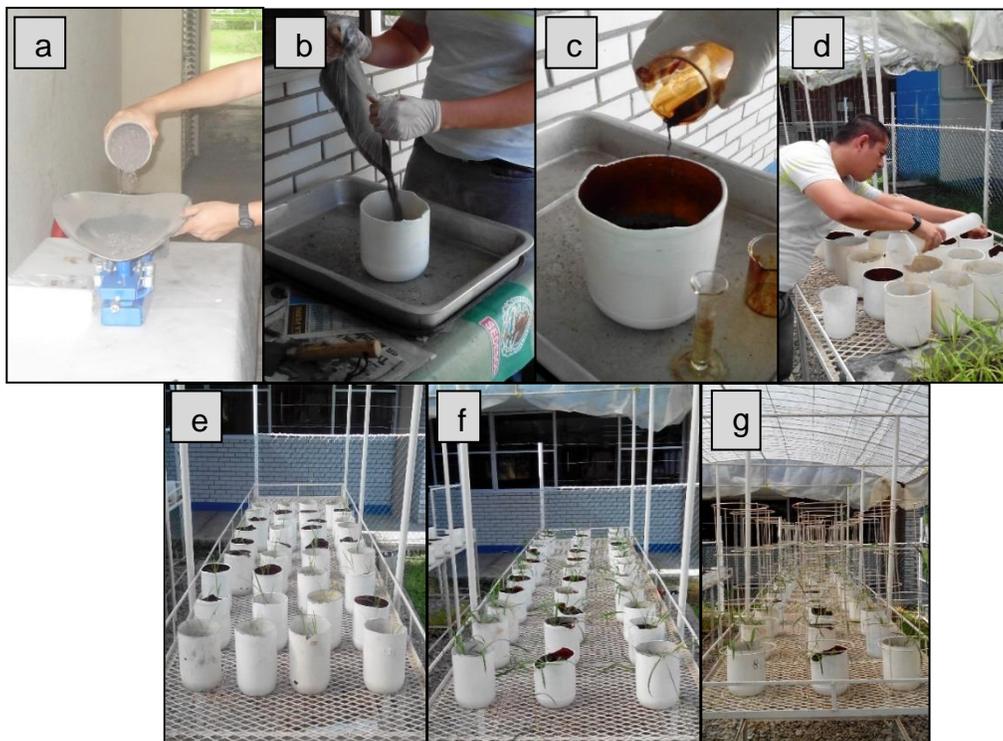


Figura 9. Procedimiento del establecimiento del experimento. a) Pesado de 1200 g de suelo seco y tamizado; b) Colocado del suelo en la maceta de vidrio; c) Contaminación de suelo por tratamiento; d) Regado de suelo a humedad aprovechable; e) Sembrado de dos plántulas de *L. hexandra*; f) Deshijado de una planta y aleatorización de UE a los 12 dds; g) Colocación de soportes de metal a los 30 dds.

#### 5.2.4. Seguimiento de variables en planta

El crecimiento de *L. hexandra* se evaluó en términos de la longitud de estolones (LE), plantas jóvenes (PJ) y diámetro basal del estolón principal (DB). Las dos primeras variables se midieron en siete tiempos secuenciales; 1, 60, 120 y 180 dds, y el DB al día 180 dds.

La LE se midió con una regla graduada (cm) desde la base del tallo del estolón principal hasta el ápice de este en cada unidad experimental (Figura 10a). Las PJ por conteo directo (Figura 10b). El DB se tomó a los 180 días de establecido el experimento y se realizó en la parte basal del estolón principal con un vernier digital marca Multutoya (Figura 10c).



Figura 10. Medición del crecimiento vegetal. a) Medición de longitud de estolón principal con regla graduada; b) Conteo directo de plantas jóvenes; c) Medición de diámetro de estolón principal con vernier digital.

### 5.3. Etapa III. Trabajo de laboratorio

#### 5.3.1. Biomasa vegetal seca

La biomasa aérea (BA), biomasa radical (BR) y biomasa total (BT) fue colectada a los 180 dds, y las 36 unidades experimentales fueron procesadas; el suelo y la planta fueron separados (Figura 11a) y se cortó el follaje (Figura 11b). Las raíces se removieron del suelo de cada unidad experimental (Figura 11c), se lavaron, escurrieron, y se colocaron en bolsas de papel estraza por separado para su secado (Figura 11d). El secado se realizó de acuerdo a las recomendaciones de Alcántar *et al.*, (1992) a temperatura de 65 °C, por 8 dds en horno (Figura 11e), finalmente se pesó en balanza semianalítica marca OHAUS Scout Pro SP202.



Figura 11. Secado de la biomasa vegetal. a) Suelo y planta contenido en la unidad experimental; b) Corte de follaje; c) Remoción de raíces del suelo; d) Follaje y raíz en bolsas de papel estraza; e) Follaje y raíz en horno (temperatura 65 ° C) por 8 dds.

### 5.3.2. Micorriza versículo arbuscular

El hongo micorrízico arbuscular en raíz de *L. hexandra* se realizó a los 180 dds. La colonización de raíces fue realizada a través de la técnica de clareo y tinción (modificada) de Phillips y Hayman, (1970), y montadas en portaobjetos, para obtener por medio de la frecuencia el porcentaje de colonización a través de la siguiente fórmula:

$$\% CM = \frac{NRC}{NRO} \times 100 \quad (1)$$

*Donde:*

*% CM:* Porcentaje de colonización micorrízica.

*NRC:* Número de raíces colonizadas.

*NRO:* Número de raíces observadas.

#### 5.3.2.1. Tinción y montaje

Las raíces de *L. hexandra* de las 36 unidades experimental se lavaron con agua de la llave hasta dejarlas sin suelo. Se seleccionaron raíces secundarias y terciarias por (Figura 12a), estas fueron puestas sobre un trozo de gasa para ser colocadas en un capsula de plástico (Figuras 12b, 12c), seguidamente fueron sumergidas en KOH al 10 % durante 72 horas (Figura 12d), al finalizar este tiempo las capsulas fueron lavadas con agua corriente y fueron sumergidas en peróxido de hidrogeno comercial

al 3 % durante 10 minutos (Figura 12e), posteriormente fueron lavadas nuevamente con agua corriente y se sumergieron en HCl al 10 % durante 5 minutos(Figura 12f), fueron lavadas una última vez con agua corriente (Figura 12g) y se sumergieron en azul de tripano al 0.05 % durante 72 horas (Figura 12h), pasado el tiempo de la tinción se desechó el azul de tripano y se sumergieron en lactoglicerol para eliminar el exceso de colorante (Figura 12i).

Las raíces tenidas se fijaron en portaobjeto, para esto se tomaban las raíces y con la ayuda de unas tijeras se cortaban las raíces a lo ancho del portaobjeto (Figura 12j), 15 raíces fueron montadas por portaobjetos y fueron 3 portaobjetos por cada unidad experimental (Figura 12k), se esperó un tiempo a que secaran y se observó en microscopio compuesto (Motic Digital microscope, DMB3-223, NTSC System) a 40 X (Figura 12l).



Figura 12. Proceso de clareo y tinción de raíces. a) Selección de raíces; b) Raíces sobre gasa; c) Colocado en capsula para tinción; d) Sumergido en KOH 10 % 72 hrs.; e) Sumergido en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% [comercial] 10 min.; f) Sumergido en HCl al 10% 5 min.; g) Lavado con agua corriente, h) Teñido con azul de tripano al 0.05 % 72 hrs.; i) Eliminado de exceso de colorante en Lactoglicerol; j) Cortado de raíces para montar; k) Montado de raíces sobre portaobjeto; l) observación en microscopio óptico a 40 X.

### **5.3.2.2. Esporas micorrícicas**

#### **5.3.2.2.1. Extracción de esporas micorrícicas del suelo**

La extracción de esporas micorrícicas fue realizada bajo la metodología de tamizado y decantación modificada de Gerdemann y Nicolson (1963) modificada por Daniels y Skipper (1982). Los pasos fueron los siguientes: 1) De cada uno de las 36 unidades experimentales se tomó 100 g de suelo fresco, se colocó en el vaso de un esquiadero (Figura 13a). 2) Se le agregó un litro de agua y 3 gotas de jabón líquido, se agitó en esquiadero durante 3 minutos (Figura 13b). 3) se dejó reposar durante 10 min (Figura 13c). 4) Se vertió en tamices de 500  $\mu\text{m}$  y 44  $\mu\text{m}$  (Figura 13d) [este proceso se realizó 5 veces para cada una de las muestras experimentales]. 5) Se deja correr agua corriente sobre el tamiz para quitar restos de suelo menores a 44  $\mu\text{m}$  (Figura 13e). 6) En un tubo para centrifuga de 12 ml se colocaron 6 ml de sacarosa al 20 %, seguidamente se colocó sacarosa al 60 % con una pipeta desde el fondo del tubo (Figura 13f) soltando la sacarosa de manera lenta para que no se mezclara con la sacarosa al 20 %, esta última subió a medida que se soltó la sacarosa de 60 % y así obtener el gradiente de sacarosa (Figura 13g). 7) El contenido retenido en el tamiz de 44  $\mu\text{m}$  se vertió sobre el gradiente de sacarosa (figura 13h) para centrifugarlo a 2500 rpm durante tres minutos (Figura 13i). 8) El sobrenadante obtenido se vertió a un tamiz pequeño de 44  $\mu\text{m}$  (Figura 13j y k) y se lavó con abundante agua corriente para eliminar el exceso de sacarosa. 9) Finalmente se colocó en caja Petri con agua destilada para su revisión (Figura 13l).



Figura 13. Procedimiento de extracción de esporas micorrícicas. a) pesado de suelo; b) Agitado en esquimero por 3 minutos; c) Reposado por 10 minutos; d) Tamizado en tamiz de 500 y 44  $\mu\text{m}$ ; e) Lavado con agua corriente; f) 6 ml de sacarosa al 20 %; g) Gradiente de sacarosa; h) Colocado de tamizado en tubos con gradiente de sacarosa; i) centrifugado por 3 minutos a 2500 rpm; j) Tubo con esporas atrapadas en el gradiente después de centrifugado; k) Eliminación de exceso de sacarosa de las esporas en tamiz de 44  $\mu\text{m}$ ; l) Colocado de esporas sobre caja Petri para su montaje.

#### **5.3.2.2.2. conteo por contenido citoplasmático**

Las esporas del extracto de agua destilada fueron observadas a través del estereoscopio y separadas de manera manual (Figura 14a). Para tomar las esporas del extracto, se aglomeraron las esporas y la materia orgánica en el centro de la caja (Figura 14b) con un movimiento oscilatorio y con una aguja de disección se apartaron las esporas de la materia orgánica, se tomaron con una pipeta Pasteur (modificada) y se colocaron sobre un papel filtro Marca Macherey-Nagel 12.5 cm Ø MN 615 (Figura 14c). Las esporas con una aguja humedecida se colocaron en un portaobjeto suspendidas en una gota de PVLG + Melzer (1g de yodo, 3 g de yoduro de potasio y 5 g de hidrato cloral) (Figura 14d) y se cubrieron con un cubreobjetos. Las lamillas con esporas se colocaron en una plancha de secado de muestras histológicas a 49 °C (Figura 14e) para su posterior observación en el microscopio óptico.

El conteo de esporas por contenido citoplasmático se realizó en microscopio óptico Nikon-Optiphot II Plus a 40 x y solo se consideró las esporas con pared intacta y con el contenido citoplasmático completo.

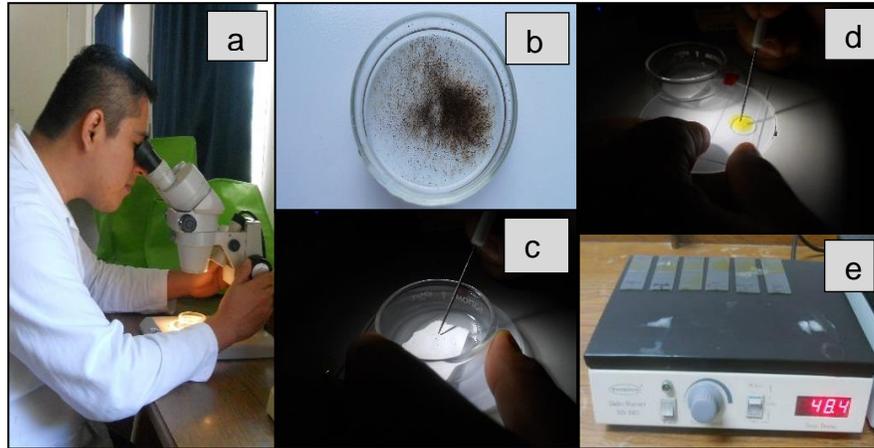


Figura 14. Montaje de esporas. a) Observación microscopio estereoscópico; b) Extracto con materia orgánica, esporas y micelio; c) Tomado de esporas del papel filtro; d) Montaje de esporas con aguja sobre reactivo Melzer. e) Secado de laminilla en estufa de secado de muestras histológicas.

#### 5.3.2.2.3. Identificación taxonómica de especies

La nomenclatura sigue la clasificación de Schuëler & Walker (2010) y la referencia de la clasificación de los HMA *Glomeromycota* hecha por Redecker *et al.* (2013). Para la identificación taxonómica de especies las esporas montadas en PVLG más reactivo Melzer se observaron en microscopio óptico con contraste de interferencia de Nomarski, (Nikon-Optiphot II Plus) a 40x y 100x, midiendo con reglilla micrométrica acoplada al ocular, se consideró la morfología de cada uno de los morfotipos, tomando en cuenta: tipo de esporas (Glomoides, Acaulosporoides, Gigasporoides), diámetro de esporas e hifas, pared y estratos de pared (número, tipo, arreglo, ornamentaciones); hifas de origen (forma, pared, zona de oclusión); citoplasma (en

esporas maduras, en esporas jóvenes) así como la reacción de los estratos con reactivo de Melzer, la morfología de estas se compararon con las descripciones del Internacional Vesicular Arbuscular Culture Collection (INVAM, 2015) y de Blaszkowski de la Universidad de Agronomía de la Universidad de Szczecin, Polonia (Blaszkowski, 2015), tomando en cuenta la filogenia y taxonomía de *Glomeromycota* (Schüßler, 2015). Las esporas se fotografiaron en Microscopio óptico Iroscope NOC58TNOR con CIN, cámara digital Toupcam UCMOS02000KPB, software de digitalización de imágenes ToupTek ToupView versión x64.3.7.1460.

#### **5.4. Etapa IV. Analisis matemático y estadístico**

##### **5.4.1. Índices relativos y absolutos de adaptación y toxicidad biológica**

Los índices de toxicidad se calcularon con la finalidad de saber cuál es la respuesta fisiológica a los hidrocarburos totales del petróleo de *L. hexandra*, el hongo micorrízico arbuscular en simbiosis con esta última y las esporas micorrízicas en un suelo. Para determinar estos índices se basó en las ecuaciones propuestas por diversos investigadores (Porta *et al.*, 1999; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Vazquez-Luna *et al.*, 2010; Pérez-Hernández *et al.*, 2013). Estos índices comprenden índices relativo y absoluto de fitotoxicidad (Ec.2,3) de *L. hexandra* al petróleo. Los índices relativo y absoluto de micotoxicidad (Ec.4,5) del hongo micorrízico en simbiosis al petróleo, y los índices relativo y absoluto de toxicidad de esporas micorrízicas al petróleo (Ec.6,7).

$$IRF(x) = \frac{TpR1}{Tt} \quad (2)$$

$$IAF = \frac{\sum_{i=1}^n IRF(x)}{n} \quad i = 1,2,3 \dots t \quad (3)$$

$$IRM(x) = \frac{TpR1}{Tt} \quad (4)$$

$$IAM = \frac{\sum_{i=1}^n IRM(x)}{n} \quad i = 1,2,3 \dots t \quad (5)$$

$$IRE = \frac{TpR1}{Tt} \quad (6)$$

$$IAE = \frac{\sum_{i=1}^n IRE(x)}{n} \quad i = 1,2,3 \dots t \quad (7)$$

Donde:

$IRF(x)$ : Índice relativo de fitotoxicidad para la variable (x).

$IAF$ : Índice absoluto de fitotoxicidad.

$IRM(x)$ : Índice relativo de micotoxicidad para la variable (x).

$IAM$ : Índice absoluto de micotoxicidad.

$IRE(x)$ : Índice relativo de toxicidad de esporas para la especie (x).

$IAE$ : Índice absoluto de toxicidad de esporas.

$Tp$ : Tratamiento con petróleo.

$Tt$ : Tratamiento testigo.

$R1$ : Repetición 1...  $n$

$n$ : Número de variables.

La interpretación de los resultados se hizo de la siguiente manera:

>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable)

= 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo (No se afecta a la variable)

< 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable)

#### 5.4.2. Análisis estadístico

El programa Statistical Analysis Software (SAS) 9.0 se usó para el análisis de varianza (ANOVA) de cada una de las variables evaluadas en esta investigación. El modelo usado fue lineal, (Ec. 8). La comparación de medias a las variables y a los índices de toxicidad se realizó de acuerdo con la prueba de Tukey, ( $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ) así como la correlación de Pearson.

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij} \quad i = 1, \dots, n \quad j = 1, \dots, t. \quad (8)$$

Los términos en la ecuación representan:

$Y_{ij}$ : Respuesta en  $j$ -ésima unidad experimental con el tratamiento  $i$ -ésimo

$\mu$ : Media general, común a todas las unidades antes de aplicar los tratamientos.

$\tau_i$  : Efecto del  $i$ -ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$ : Error experimental en la  $j$ -ésima repetición del  $i$ -ésimo tratamiento.

## CAPITULO VI

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 6.1. Crecimiento vegetal de *Leersia hexandra* Sw

##### 6.1.1. Longitud de estolones (LE)

La media de la LE al día uno, 60 y 180 dds presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto de la dosis de petróleo crudo (PC) y sin diferencias al día 120 (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Figura 15; Apéndice, Cuadro 1). El crecimiento de la LE en los nueve tratamientos (T) fue ascendente a través del tiempo. Al día 180 ocho tratamientos son estadísticamente iguales, sobresale que el T5 (60000 mg kg<sup>-1</sup> HTP's) fue mayor la LE (508.75 cm), con un 16.70% mayor respecto al T0 (testigo) el cual alcanzo 423.75 cm. La menor LE (363.5 cm) se observa en suelo con 3000 mg kg<sup>-1</sup> (T1) y disminuye 14.21 % respecto al suelo testigo.

El efecto positivo del PC en la LE de *L. hexandra* encontrado en esta investigación, es diferente al reportado en otras especies vegetales; por ejemplo *Cyperius brevifolius* disminuye cuando se expone a 80000 mg kg<sup>-1</sup> de PC en suelo a los 180 y 360 días (Basumatary *et al.*, 2012). *Zea mayz* expuestos a 35000 mg kg<sup>-1</sup> de PC no indujo efecto alguno en la altura (Quiñonez-Aguilar *et al.*, 2003). *Brachiaria brizantha*, *Brachiaria decumens*, *Paspalum nonatum* expuestos a diésel (0, 2500, 5000, 10000 mg kg<sup>-1</sup>) no tuvieron diferencias significativas entre tratamientos en cuanto altura de planta a los 85 días, esto debido a la tolerancia que tienen estas especies a estas

dosis (Mezzari *et al.*, 2011). La respuesta positiva de *L. hexandra* a dosis de 180000 mg kg<sup>-1</sup> de PC posiblemente se debe que es un pasto que de manera natural habita en suelos contaminados con petróleo en el sureste de México (Rivera-Cruz, 2011). La permanencia de *L. hexandra* a la exposición prolongada al PC genera adaptación a estas condiciones, pero principalmente a desarrollar un sistema rizosférico en donde los microorganismos que habitan este espacio utilizan como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos derivados del petróleo, la llamada biodegradación (Labud *et al.*, 2007), que sin este proceso los hidrocarburos conservan su toxicidad y mutagenocidad para los seres vivos (WHO, 1998; Mastandrea *et al.*, 2005).

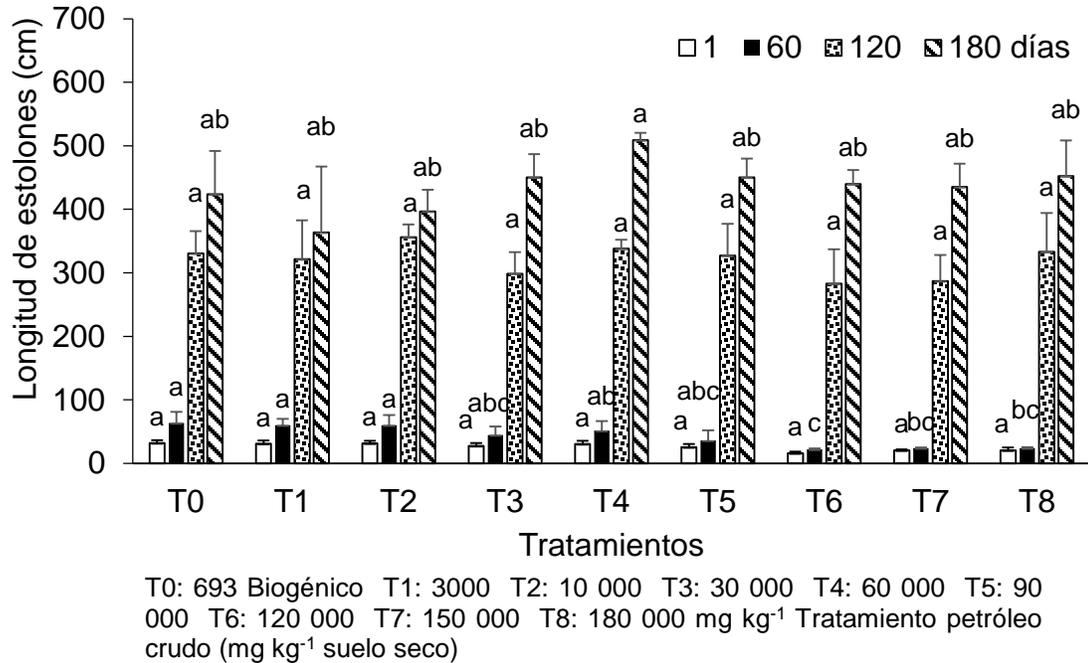


Figura 15. Variación de la longitud de estolones del pasto *L. hexandra* por efecto del petróleo crudo en cuatro tiempos hasta los 180 dds después del trasplante. Barras con diferentes letras en cada uno de los tiempos son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

### 6.1.2. Plantas jóvenes (PJ)

La media del número plantas jóvenes de *L. hexandra* al día uno, 60, 120 y 180 fueron estadísticamente diferentes por efecto de la dosis del petróleo crudo en el suelo (Tukey  $p \leq 0.05$ ), con una tendencia a incrementar respecto al tiempo (Figura 16; Apéndice, Cuadro 2). Al día 180 el mayor número de PJ (29.75) fue en T7 con 150000 mg kg<sup>-1</sup> petróleo crudo, con un incremento de 33.16% respecto al suelo testigo (T0). Destaca que las PJ son estimuladas a incrementar con presencia del petróleo en el suelo, con una relación positiva ( $r = 0.458^{**}$ ) (Cuadro 6) hasta dosis de

150000 mg kg<sup>-1</sup> (T7), pero a partir de 180000 mg kg<sup>-1</sup> (T8) el número de PJ disminuye.

El efecto positivo del petróleo crudo en el número de PJ en esta investigación fue similar a los reportados por Arias *et al.* (2012) al exponer a *L. hexandra* a dosis de 6000, 10000, 30000, 60000, 90000, 120000, 150000 y 180000 mg kg<sup>-1</sup> por un periodo de 180 días, sin embargo el *Echinochloa polystachya* presentó respuestas diferentes al exponerlos a 100000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo, redujo un 42% el número de PJ con respecto al testigo (Rivera-Cruz, 2001).

Una explicación de la estimulación del petróleo en el desarrollo de mayor cantidad de plantas jóvenes en el macollo de *L. hexandra*, posiblemente fue promovido por los altos contenidos de N total, P disponible y sulfato que fueron promovidos en los suelos de los nueve tratamientos evaluados en esta investigación (Cuadro 4), los cuales se incrementaron al adicionar dosis altas de petróleo. Esta estimulación se corroboró en la relación positiva de los HTP's en el suelo respecto al N ( $r=0.470^{**}$ ); S-SO<sub>4</sub> ( $0.938^{**}$ ); P ( $r=0.872^{**}$ ) y PJ ( $r=0.458^{**}$ ) (Cuadro 6). La importancia del N, S y P para la planta radica en que son macronutrientes esenciales para el crecimiento debido a que forman parte importante de la materia viva vegetal, están presentes en aminoácidos y otras biomoléculas (Escaso *et al.*, 2010). Así mismo estos macronutrientes forman parte de la proteína más abundante en las hojas de los pastos; la rubisco, dicha proteína compone los polipéptidos presente en las membranas tilacoidales, así como en los pigmentos de la clorofila a, b, necesarios para la asimilación del carbono orgánico y por lo tanto la inducción de retoños

(Hopkins y Hüner, 2008), al respecto Latiffe *et al.* (2001) encontró en plantas de maíz que el primer síntoma de deficiencia de N es el menor crecimiento en vástagos.

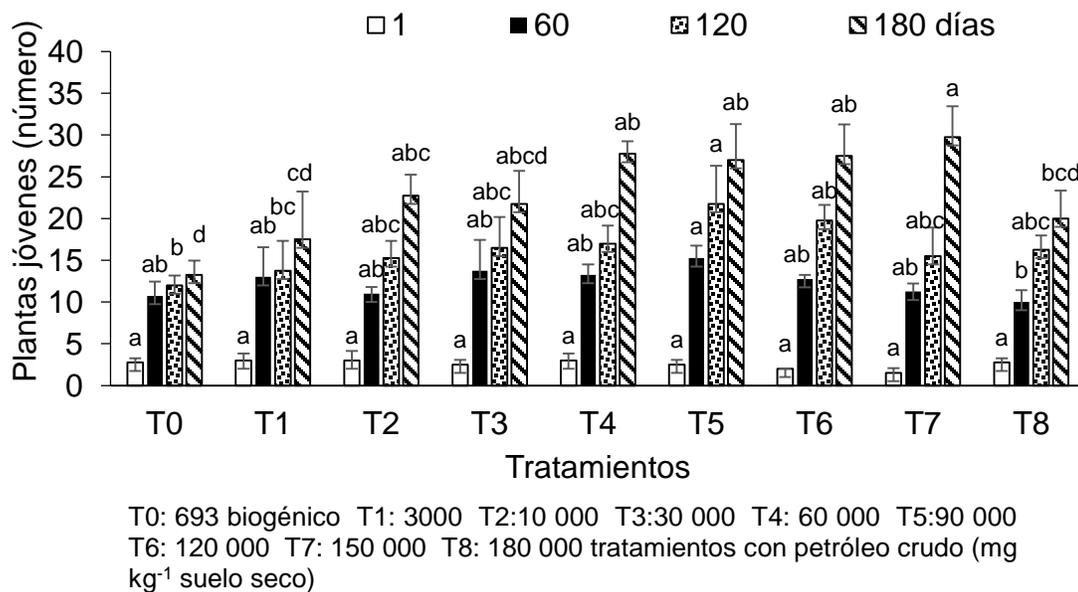


Figura 16. Variación del crecimiento de plantas jóvenes del pasto *L. hexandra* por efecto del petróleo crudo en cuatro tiempos hasta 180 dds. Barras con diferentes letras en cada uno de los tiempos son estadísticamente diferentes (Tukey,  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

### 6.1.3. Producción de biomasa vegetal

#### 6.1.3.1. Biomasa aérea y radical

La biomasa aérea y biomasa radical al día 180 presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto de las dosis de petróleo en el suelo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 5; Apéndice, Cuadro 3). La biomasa aérea en los tratamientos 1, 2, 3, 4 y 5 fue superior e igual al tratamiento testigo (T0), pero a partir de 120000 mg kg<sup>-1</sup> PC (T6)

disminuye conforme la dosis se incrementa (Tabla 5). La mayor biomasa aérea (43.98 y 41.05 g) se presentó en los tratamientos con 10000 (T2) y 30000 (T3) mg kg<sup>-1</sup> respectivamente, siendo la menor (18.35 g) en 180000 mg kg<sup>-1</sup> (T8) (Cuadro 5; Apéndice, Cuadro 3).

El efecto negativo de 120000, 150000 y 180000 en la biomasa aérea fue de 26, 37.86 y 45.7% menos respecto al testigo. Otras plantas como *Brachiaria brizantha*, *Cyperus aggregatus* y *Eleusine indica* muestran un efecto negativo del petróleo crudo en la biomasa aérea pero en concentraciones de 5000 mg kg<sup>-1</sup> (Merkl et al., 2005).

Destaca en esta investigación que en los suelo con 90000 mg kg<sup>-1</sup> petróleo *L. hexandra* desarrolla mejor su crecimiento, respecto al suelo sin petróleo (T0), resultados contrarios reporta Quiñones-Aguilar *et al.* (2003) en *Zea mays*, respuesta negativa de la planta atribuida que el aceite altera las propiedades físicas y químicas originales del suelo limitando la difusión de agua, agregación y baja disponibilidad de nutrientes para la planta.

La biomasa radical de *L. hexandra* fue estimulada conforme se incrementa la dosis de petróleo crudo en el suelo, con relación directamente proporcional y positiva (Cuadro 5; Apéndice, Cuadro 3). La BR mayor (11.96 g) se observa en suelo con 150000 mg kg<sup>-1</sup> y la menor (2.01 g) en suelo testigo. La estimulación de la BR a la exposición de las ocho dosis de petróleo evaluadas en esta investigación fue de 56.74, 62.10, 66.6, 73.28, 77.63, 83.11 y 76.94% en T2, T3, T4; T5, T6, T7 y T8 respectivamente. Similares resultados son reportados por San Gabriel *et al.* (2006)

en dosis de 50000 mg kg<sup>-1</sup> de combustóleo que estimulan un 17% la biomasa radical de *Brachiaria híbrido*. Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004) encontraron una ligera estimulación de la biomasa radical de *Echinochloa polystachya* en dosis de 50000 y 100000 mg kg<sup>-1</sup> con respecto al testigo (150 mg kg<sup>-1</sup>), así mismos Rivera-Cruz *et al.* (2012) registra en dosis de 78000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo una tolerancia de *Brachiaria mutica*, con similar respuesta en suelo testigo (150 mg kg<sup>-1</sup> de hidrocarburo biogénico). Otras especies se comportan diferente a *L. hexandra*, por ejemplo; *Brachiaria brizantha*, *Panicum máximum* reducen la biomasa radical un 50% y 71% en dosis de 50 000 mg kg<sup>-1</sup> de combustóleo (San Gabriel *et al.*, 2006), *Brachiaria brizantha* y *Panicum* reducen un 81.37 % y 98 % al exponerlos a 30000 mg kg<sup>-1</sup> de PC (Hernández-Valencia y Mager, 2003).

Otros factores inducidos en los suelos con petróleo fue el incremento de los nutrimentos esenciales primarios para la planta (Cuadro 4), factor nutrimental que favoreció el desarrollo radicular de *L. hexandra*, al respecto las relaciones de N total con biomasa radical fue positiva ( $r=0.569^{**}$ ), P disponible ( $r=0.760^{**}$ ) y S-SO<sub>4</sub> ( $r=0.756^{**}$ ) (Cuadro 6).

La relación biomasa aérea con biomasa radical de *L. hexandra* disminuye conforme la dosis de petróleo en el suelo se incrementa (Cuadro 5), esto significa que el sistema radical fue mayor con respecto al sistema aérea de la planta, el pasto bajo condiciones de estrés inducido por el petróleo, posiblemente canaliza la mayor cantidad de energía para desarrollar el sistema radical. La menor relación con 1.76

fue en el suelo con 150000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo (T7) y la mayor en suelo testigo (16.73).

Relaciones de biomasa aérea y radical bajas estimuladas por el petróleo crudo como las encontrada en *L. hexandra* para el trópico húmedo mexicano fueron reportadas para este mismo pasto por Arias (2012), pero en otros pastos tropicales su respuesta a la exposición al petróleo crudo ha sido a incrementar esta relación, por ejemplo *Brachiaria mutica* (Rivera *et al.*, 2012). Esta repuesta es atribuida según SEMARNAT (1996) al estrés abiótico inducido por el déficit de agua, falta de oxígeno y baja disponibilidad de nutrientes que induce el petróleo en el suelo.

La adaptación al estrés de *L. hexandra* al petróleo, posiblemente se debe a lo que han demostrado diversos investigadores e indican que los mecanismos de defensa de la planta para protegerse del daño, es la inducción de moléculas reactivas de oxígeno (MRA) en sus células; como son O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y radicales OH<sup>-</sup> que provocan daños en la membrana celular e inhiben el crecimiento vegetal, pero la inducción de altos niveles de estos antioxidantes en la célula vegetal tienen mejor resistencia al daño (Liu *et al.*, 2009).

#### **6.1.3.2. Biomasa total (BT)**

La biomasa total presento diferencias estadísticas significativas por efecto de las diferentes concentraciones de petróleo evaluada en esta investigación (Cuadro 5; Apéndice, Cuadro 3). La mayor biomasa total (48.64 y 46.38 g) fue en 30000 y 60000

mg kg<sup>-1</sup> y la menor con 27.11 g en T8 con 180000 mg kg<sup>-1</sup>. El efecto del petróleo crudo en la biomasa total mostró una estimulación positiva en las primeras cinco concentraciones (3000, 10000, 30000, 60000, 90000 mg kg<sup>-1</sup>), pero en los tres tratamientos en donde la concentración es  $\leq$  120000 mg kg<sup>-1</sup> (T6) es menor que en suelo sin petróleo (T0).

La estimulación de la producción de biomasa total por dosis de hasta 90000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo no han sido reportadas hasta la fecha en pastos tropicales nativos, al respecto Rivera-Cruz *et al.*, (2003); Rivera-Cruz *et al.* (2012) encontró que el pasto *Brachiaria mutica* y *Echinochloa polistachya* acumula biomasa total en suelo con 50000 y 78000 mg kg<sup>-1</sup> petróleo similar al que produce en suelo sin petróleo.

La acumulación de la biomasa total vegetal de *L. hexandra* en suelo desde 3000 hasta 90000 mg kg<sup>-1</sup>, puede ser atribuido a que las raíces fibrosas fasciculadas de los pastos poseen rizosfera extendida con potencial para tolerar, romper la tensión superficial que genera el aceite y hospedar bacterias reguladoras del crecimiento vegetal (PGPR) y con tolerancia a los hidrocarburos recalcitrantes (Merkl *et al.* 2005; Maldonado-Chávez *et al.* 2010). La participación de las PGPR en la detoxificación, mineralización y humificación de hidrocarburos aún no ha sido probada *in situ*, sin embargo diversos autores (Pothuluri y Cerniglia 1994; Chaudhry *et al.* 2005) sugieren que las bacterias *Pseudomonas putida*, *Mycobacterium* sp y *Rhodococcus* sp. Hacen esta función por la vía hidroxilación de anillos bencénicos, pero además fijan N atmosférico para que lo aprovechen las plantas.

Cuadro 5. Efecto del petróleo crudo en la producción de biomasa aérea, radical y total del pasto *L. hexandra* a los 180 dds.

Tratamiento/ petróleo crudo (mg kg <sup>-1</sup> )	Biomasa aérea (g)	Biomasa radical (g)	Relación biomasas aérea/radical	Biomasa total (g)
T0: 693	33.8±7.12abc	2.02±0.74f	16.73	35.82±7.69ab
T1:3 000	38.82±12.34ab	2.91±1.34ef	13.33	41.73±13.64ab
T2:10 000	43.98±4.32 <sup>a</sup>	4.67±0.76def	9.41	48.65±5.05 <sup>a</sup>
T3:30 000	41.06±7.64 <sup>a</sup>	5.33±1.09de	7.70	46.38±8.25 <sup>a</sup>
T4:60 000	35.70±3.50ab	6.06±1.31cde	5.89	41.77±4.74ab
T5:90 000	33.82±4.04abc	7.56±2.08bcd	4.47	41.38±2.51ab
T6:120 000	25.07±2.45bcd	9.30±1.01ab	2.77	34.37±2.19ab
T7:150 000	21.14±1.61dc	11.96±1.16 <sup>a</sup>	1.76	33.11±2.23ab
T8:180 000	18.35±2.93c	8.76±2.03abc	2.09	27.11±4.81b
CV:	18.55	20.89		17.13

Valores con diferentes letras entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, P≤ 0.05, n=4)

Cuadro 6. Correlación de variables

	HTP's	MO	N	SO <sub>4</sub>	P	AL	PJ	BA	BR	HF	AR	VE	EI	ES
HTP's	1	.996**	.470**	.938**	.872**	.269	.458**	-.776**	.846**	-.831**	-.756**	-.751**	-.831**	-.489**
CO		1	.473**	.942**	.829**	.299	.481**	-.753**	.844**	-.821**	-.745**	-.748**	-.817**	-.517**
N			1	.476**	.384**	.001	.600**	-.140	.569**	-.143	-.010	-.041	-.115	-.734**
SO <sub>4</sub>				1	.810**	.254	.430**	-.710**	.760**	-.842**	-.756**	-.743**	-.845**	-.367*
P					1	.009	.298	-.787**	.756**	-.839**	-.713**	-.642**	-.839**	-.267
AL						1	.328	-.068	.326	-.178	-.231	-.344*	-.149	-.157
PJ							1	-.065	.743**	-.259	-.248	-.299	-.278	-.531**
BF								1	-.528**	.793**	.741**	.705**	.802**	.190
BA									1	-.654**	-.575**	-.591**	-.658**	-.588**
HF										1	.846**	.776**	.952**	.139
AR											1	.918**	.913**	.022
VE												1	.863**	.085
EI													1	.119
ES														1

HTP's: hidrocarburos totales del petróleo; MO: materia orgánica; N: nitrógeno; SO<sub>4</sub>: sulfatos; P: fósforo; AL: altura; PJ: plantas jóvenes; BA: biomasa aérea; BR: biomasa radical; HF: % hifas; AR: % arbusculos; VE: % vesículas; EI: % esporas intraradicales; ES: esporas en el suelo.

## **6.2. Análisis de los índices de fitotoxicidad a petróleo crudo de *Leersia hexandra* Sw.**

### **6.2.1. Parámetros de crecimiento usados como índice relativo de fitotoxicidad (IRF).**

En la Figura 17 se observan que las medias de los IRF obtenidos con las variables longitud de estolones (LE), plantas jóvenes (PJ) y diámetro basal (DB) de *L. hexandra* presentan diferencias estadísticas significativas por efecto de las dosis de petróleo crudo en el suelo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Figura 17, Apéndice, Cuadro 4).

Los parámetros de crecimiento evaluados en *L. hexandra* como indicadores de toxicidad reflejan que solo el diámetro basal en las dosis de 120000, 150000 y 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo presentan IRF menores a 1.0 (0.93, 0.84 y 0.96), por lo que es de utilidad como indicador biológico para estas dosis de petróleo.

Longitud de estolones y plantas jóvenes muestran IRF iguales o mayores a uno en las ocho concentraciones de petróleo. Esta respuesta indica que tolera las condiciones de estrés que el petróleo genera en el suelo, es una planta adaptada. El parámetro que mejor manifiesta su adaptación es la producción de plantas jóvenes que alcanza IRF de hasta 2.2 en suelo con 150000 mg kg<sup>-1</sup> (Figura 17). Estos resultados son diferentes a los reportados por Arias, 2012; Maldonado (2006) e indican que *Leersia sp.* Y *Brachiaria mutica* son pastos que a través de la longitud de estolones y altura indica toxicidad a 150000, 50000 y 78000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo

crudo, pero también existen plantas más sensibles como es *Zea mayz* que manifiesta la toxicidad a dosis de 1 700, 3 500, 7 000, 12 000 y 25 000 mg kg<sup>-1</sup> (Ramírez-García, 2013).

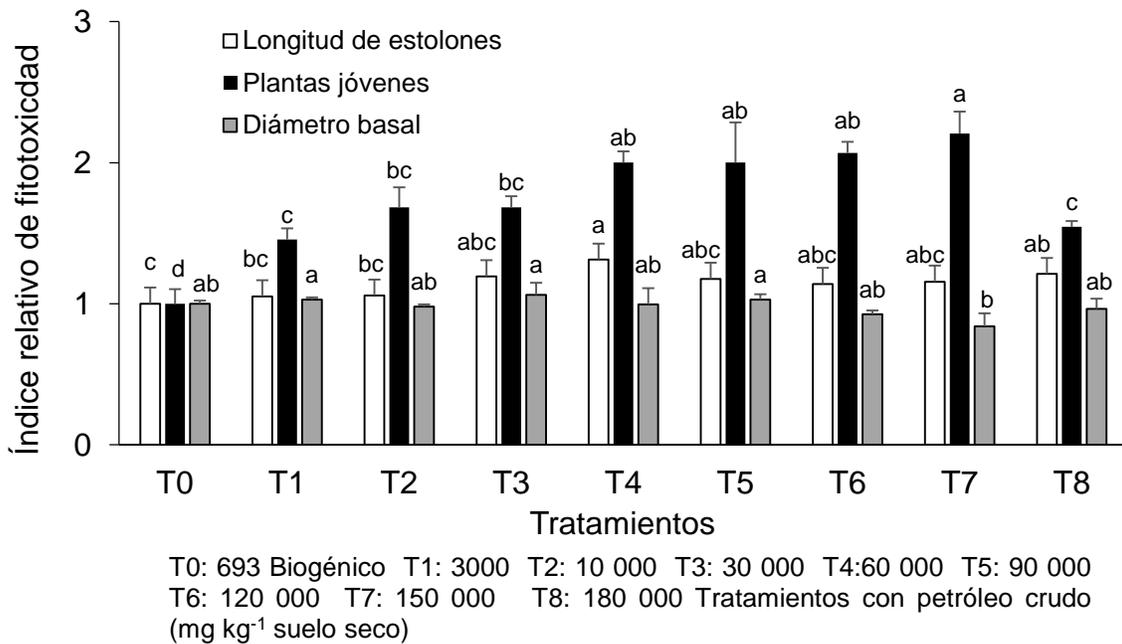


Figura 17. Índice relativo de fitotoxicidad (IRF) al petróleo crudo de tres parámetros de crecimiento vegetal de *L. hexandra*, a los 180 dds. IRF>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4).

### **6.2.2. Parámetros de producción vegetal de *L. hexandra* usados como índices relativos de fitotoxicidad**

Las medias de los IRF obtenidos de biomasa foliar, radical y total de *L. hexandra*, presentan cada uno de ellos diferencias estadísticas significativas por efecto de la dosis de petróleo crudo en el suelo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Figura 18; Apéndice, Cuadro 4). De los tres parámetros de producción utilizados para evaluar los niveles de toxicidad del suelo con petróleo, la biomasa foliar manifestó IRF menores 1.0 (0.8, 0.7 y 0.6) en 120000, 150000 y 180000 mg kg<sup>-1</sup> respectivamente. Esto permite sugerir a la biomasa foliar como indicador de toxicidad al petróleo en estas dosis (Figura 18).

Destaca en esta investigación IRF mayores a 1.0, obtenidos a partir de la biomasa aérea en dosis de petróleo entre 3000 y 90000; biomasa radical en 3000 a 180000 y biomasa total en 3000 hasta 150000 mg kg<sup>-1</sup>. IRF que inducen a proponer que el petróleo induce hormesis a *L. hexandra* es un pasto adaptado a las condiciones de estrés.

Los IRF superiores a dos (1.9, 2.7, 2.7, 3, 3.7, 4.9, 6.3 y 4.4) en las ocho dosis de petróleo se obtuvieron a través de la biomasa radical. Estos índices que indican hormesis y adaptación al petróleo crudo manifestado por el incremento del sistema radical sugiere que *L. hexandra* posiblemente tiene la habilidad de desarrollar raíces amorfas y no funcionales, ya que la parte aérea no crece con la misma magnitud, lo cual sugiere que el transporte de nutrimentos es restringido por algún efecto físico dentro del sistema vascular.

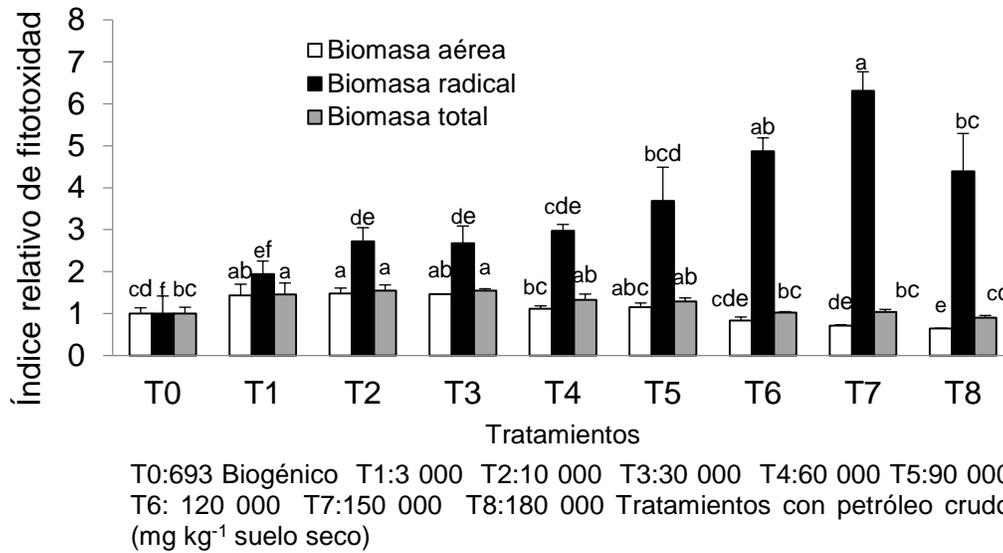


Figura 18. Índice relativo de fitotoxicidad (IRF) al petróleo crudo usando parámetros de biomasa vegetal de *L. hexandra* los 180 dds. IRF>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

### 6.2.3. Índice absoluto de fitotoxicidad al petróleo

El índice absoluto de fitotoxicidad es un número, obtenido con parámetros de crecimiento y producción de *L. hexandra* que reflejan el nivel de utilidad de este pasto para usarlo como indicador de toxicidad de suelos con petróleo. La media de los IAF muestran diferencias estadísticas significativas entre tratamientos por efecto de las ocho dosis de petróleo (Figura 19; Apéndice, Cuadro 4). Los ocho IAF de la respuesta de *L. hexandra* a las dosis de petróleo, son mayores a uno e indica que el crecimiento y producción es estimulado por el petróleo. El mayor IAF (1.9) se obtuvo

en suelo con 150000 mg kg<sup>-1</sup> (T7), esto indica un incremento de 90% respecto al testigo (T0), y el menor 1.3 en 3000 mg kg<sup>-1</sup> con un incremento del 30%. Similares resultados fueron obtenidos por Arias (2012) en el pasto *Leersia sp*, e indica que soporta las condiciones de estrés inducido por el petróleo, por lo que sugiere que no es un buen indicador de la toxicidad del petróleo crudo, debido a que dosis de 150000 mg kg<sup>-1</sup> estimula un 28% su crecimiento y producción.

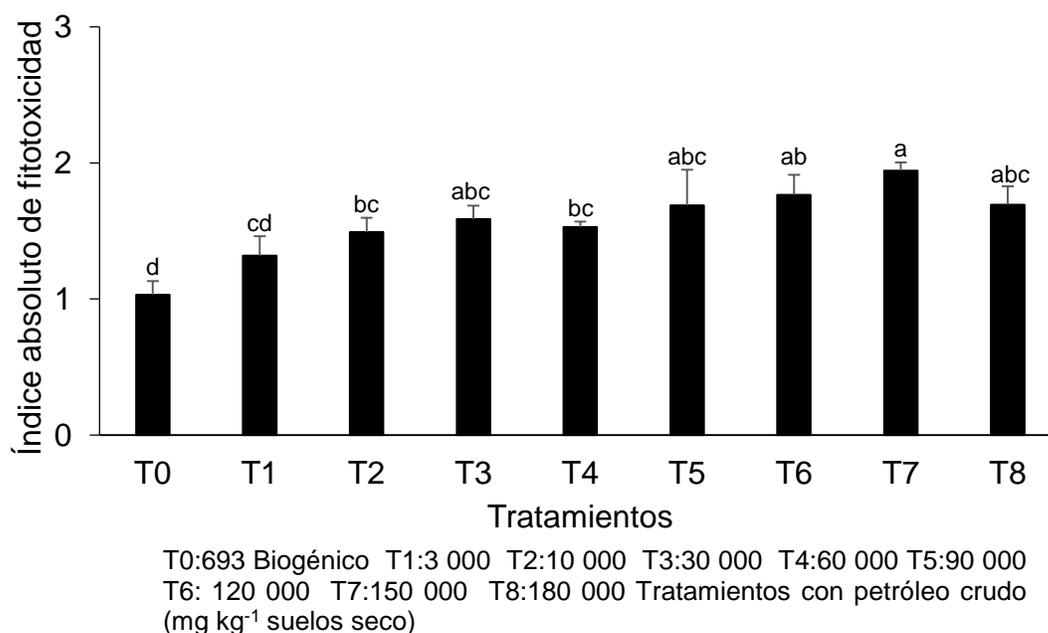


Figura 19. Índice absoluto de fitotoxicidad (IAF) al petróleo crudo de *L. hexandra* a los 180 dds. IAF>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4).

### 6.3. El petróleo crudo y la colonización micorrícica arbuscular

#### 6.3.1. Efecto del petróleo en estructuras fúngicas del hongo micorrícico

Las observaciones de hifas (HF), arbusculos (AR), vesículas (VE), esporas intrarradicales (ER) de HMA en el interior de las células corticales de la raíz y entre las células de la epidermis corroboró que en suelo sin y con petróleo se establece la asociación simbiótica de la micorriza con *L. hexandra*. El análisis de varianza muestra diferencias significativas de hifas, arbusculos, vesículas, esporas intrarradicales entre tratamientos por efecto de las dosis de petróleo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 7, Apéndices, Cuadro 5), las medias mayores de hifas con 74 % se observan en 30000 mg kg<sup>-1</sup> de PC (T3), pero arbusculos (39 %), vesículas (29 %) y esporas intrarradicales (60 %) en suelo con 10000 mg kg<sup>-1</sup> (T2). Las tres estructuras fúngicas (hifas, arbusculos y esporas intrarradicales) son menores al testigo a partir de 90000 mg kg<sup>-1</sup> PC (T5), pero las vesículas en 60000 mgkg<sup>-1</sup> (T4).

El efecto positivo del petróleo crudo en la asociación del HMA con *L. hexandra* se observa en los primeros cuatro tratamientos (T1, T2, T3 y T4), el porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas y esporas se incrementan respecto al testigo, pero es inhibida la colonización en dosis de petróleo de 90000 (T5), 120000(T6), 150000 (T7) y 180000 (T8) (Cuadro 2). Al respecto Debiane *et al.* (2009) encontró un efecto de reducción en el porcentaje de hifas a medida que aumentaban las concentraciones de 35, 70, 140, 280  $\mu$ M de benzo [a] pireno en *C. intybus*. García *et al.* (2000) menciona que el porcentaje de arbusculos y vesículas fue inhibida con una

concentración de 2 000 mg kg<sup>-1</sup> de keroseno en *avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Chloris gayana* y *Triticum vulgare*.

La inhibición del HMA puede ser por las condiciones de estrés que induce el petróleo en la rizosfera que le afectan, como son; intensidad de luz, agua, concentración de CO<sub>2</sub>, carbono y nutrición (Stover *et al.*, 2012) y el menor sistema radical que se desarrolla (Rivera-Cruz, 2011). Sin embargo, los contenidos muy altos de carbono orgánico, N total y P disponible en el suelo de los ocho tratamientos de esta investigación, no fue una limitante, pero puede ser que los altos contenidos de nutrientes afecta la colonización. En el Cuadro 6, se observa una correlación positiva de HTP's en el suelo con el carbono orgánico (CO), el N total y P disponible, así mismo, los cuatro parámetros resultaron que afectan de manera significativa y negativa a los porcentajes de estructuras fúngicas del HMA.

Sobresale la alta acumulación de raíz conforme se incrementa los contenidos de petróleo en el suelo, con una correlación negativa de la biomasa seca radical con el porcentaje de hifas (-0.654\*\*), arbusculos (-0.575\*\*), vesículas (-0.591\*\*), esporas intraradicales (-0.658\*\*) y esporas en suelo (-0.588\*\*). Una explicación del bajo porcentaje de colonización y la mayor cantidad de biomasa radical de *L. hexandra*, puede ser a que el sistema radical abundante que predomina en estos ambientes con petróleo contiene en las células corticales bajas cantidades de azúcar del cual el HMA depende para realizar sus procesos metabólicos, las bajas cantidades es una desventaja de supervivencia de asociación con la planta, pero también a la planta le

representa un costo de energía entre 5 a 30% de la producción de los fotosintatos para sostener al hongo (Brady y Well, 2008).

### **6.3.2. Efecto del petróleo en la colonización total**

La colonización total integra las variables (hifas, arbusculos, vesículas y esporas intrarradicales). Las medias de la colonización total indica diferencias estadísticas significativas por efecto de la dosis de petróleo en el suelo (Cuadro 7; Apéndice, Cuadro 5). La mayor colonización total se encontró en T2 con 48% y la menor en T8 con cero colonizaciones. El efecto inhibitorio del petróleo en la colonización total es a partir de la dosis de 90000 mg kg<sup>-1</sup> (T5), alcanza solo un 8%. Al respecto Debiante *et al.* (2008) indica que el porcentaje de colonización del HMA tuvo un descenso (6.06 %) hasta un (11.47 %) en concentraciones de 6.25, 12.5, 25 y 50 mg L<sup>-1</sup> de antraceno, así mismo Franco-Ramírez *et al.* (2007) reporta una colonización en *Echinochloa polystachya* de 77.5% en suelo con 61990 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo, y García *et al.* (2000) indica que la colonización total del HMA se redujo en adición de keroseno (2000 mg kg<sup>-1</sup>) en *Avena sativa*, *Hordeum vulgare*, *Chloris gayana* y *Triticum vulgare*.

Cuadro 7. Porcentaje de la colonización de las diferentes estructuras fúngicas del HMA en simbiosis con *L. hexandra* y esporas en suelo sin y con petróleo crudo a los 180 días después del trasplante.

HTP´s (mg kg <sup>-1</sup> )	Hifas %	Arbus %	Ves %	Esp. Intra. %	Col. Total %	Esp. Suelo Número.
693 (Biogenico)	33±8de	10±3cd	8±3c	24±4d	19±2c	2032±890 <sup>a</sup>
3 000	54±8bc	25±5b	17±1b	47±12bc	36±5b	909±721.57ab
10 000	64±3ab	39±8a	29±6 <sup>a</sup>	60±5 <sup>a</sup>	48±3 <sup>a</sup>	481±328.39b
30 000	74±13 <sup>a</sup>	22±8b	11±1c	54±7ab	40±6b	572±221.57b
60 000	43±2cd	15±6cb	7±2c	37±3cd	26±2c	932±1205.50ab
90 000	18±2ef	4±2cd	1±1d	11±2e	8±2d	555±280.64b
120 000	11±11f	0±1d	0±1d	2±3e	4±3de	1157±496.48ab
150 000	4±1fg	0±0d	0±0d	0±0e	1±0e	142±151.96b
180 000	0±0g	0±0d	0±0d	0±0e	0±0e	452±191.03b

HTP's: hidrocarburos totales de petróleo. Arb: Arbusculos; Ves: Vesículas; Esp. Intra: Esporas intraradicales; Col. Total: Colonización total; Esp. Suelo: Esporas en el suelo. Valores con diferentes letras entre columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, P≤ 0.05, n=4)

## 6.4. Identificación de especies de hongos micorrízico arbusculares

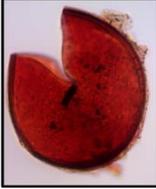
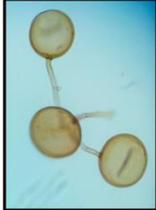
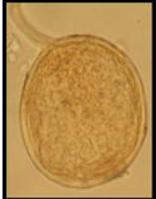
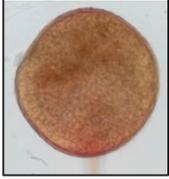
Se identificaron nueve morfoespecies de HMA en suelo sin y con petróleo plantado con *Leersia hexandra*. Las morfoespecies encontradas fueron *Ambispora* aff. *gerdemannii*, *Claroideoglobus lamellosus*, *Diversispora ebúrnea*, *Diversispora* sp, *Funneliformis* aff. *Geosporum*, *Funneliformis mosseae*, *Rhizophagus clarus*, *Rhizophagus fasciculatus* y *Rhizophagus intrarradices* (Cuadro 8).

### 6.4.1. Descripción de especies de HMA identificadas

#### 6.4.1.1. *Rhizophagus fasciculatus* (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.

Esta especie presenta esporas encontradas individualmente en el suelo o en agregados de 2-20 esporas, sin peridio, color amarillo pálido; globosas o subglobosas de entre (50-) 150 (-130)  $\mu$  de diámetro, con una sola hifa de sostén. La pared de la espota está constituida por tres capas (L1, L2 y L3): L1 es hialina, (0.5-) 1.0 (-1.8)  $\mu$  de espesor, con una tinción al reactivo melzer color blanco rojizo, L2 es un estrato laminado, liso de color amarillo pálido, (2.0-) 8.5 (-16.0)  $\mu$  de espesor, con reactivo Melzer se tiñe de rojo granate, L3 es una capa flexible, de 0.5  $\mu$  d espesor, la hifa de sostén es de color amarillo pálido, recto o ligeramente recurvada, cilíndrica de (5.0) 12.5 (-16.0)  $\mu$  de ancho en la zona de unión con la espota (Cuadro 8) (Blaszkowski, 2015).

Cuadro 8. Descripción de las morfoespecies de hongos micorrícicos en asociación con *L. hexandra* en un Gleysol contaminado con petróleo crudo.

Especie	Descripción morfológica	Especie	Descripción morfológica
	Color amarillo pálido; globosas o subglobosas de entre (50-) 150 (-130) $\mu$ de diámetro, con tres capas (L1, L2 y L3) con reacción rojo granate en L2, la hifa de sostén es de color amarillo pálido, recto o ligeramente		Esporas globosas a subglobosa, color blanco brillante a color crema, tiene un tamaño (40-) 82 (-120) $\mu$ , posee dos capas muy unidas (L1,L2): la hifa de sostén es cilíndrica o ligeramente curva en la unión de la hifa y la espora tiene < 1 $\mu$ de ancho.
<i>Rhizophagus fasciculatus</i> (Thaxt.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.		<i>Diversispora eburnea</i> (L.J. Kenn., J.C. Stutz & J.B. Morton) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.	
	Color va desde hialino hasta el amarillo pálido; globosa a subglobosa de (70-) 106 (-150) $\mu$ de, está compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L1 con coloración rosada con el reactivo de Melzer, la hifa de sostén es de color hialina a amarillo pálido, es recta o recurvada, cilíndrica.		Esporas de 49.47 $\mu$ con 2 capas (L1,L2): L1 evanescente, L2 laminado y con reacción al reactivo de Melzer color de rosa, hifa cilíndrica y muy frágil.
<i>Rhizophagus clarus</i> (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.		<i>Diversispora</i> sp.	
	Esporas de color hialino (inmaduras), amarillo pálido a amarillo grisáceo, puede tener un tinte verdoso (maduras), su forma es globosa o subglobosa de espesor de (30-) 92 (-120) $\mu$ , está constituida por tres capas (L1, L2, L3) la hifa de sostén es de color amarillo pálido o amarillo grisáceo, de forma curva o recta; cilíndrica la base de la hifa es de (13.7-) 15.5 (-18.4) $\mu$ de ancho.		Está compuesta por tres capas (L1,L2,L3): tiene 2 paredes germinales en L1, L2 con reacción al Melzer con manchas de color rojo naranja con color rojo pastel. El pedicelo es de 10 a 15 $\mu$ de largo y 15 a 27 $\mu$ de ancho, el sáculo esporífero es de hialino a blanco, La capa del sáculo esporífero es semiflexible el cuello del sáculo es blanco amarillento La cicatriz de la espora es ligeramente elevada.
<i>Rhizophagus intraradices</i> (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.		<i>Ambispora</i> aff. <i>gerdemannii</i> (S.L. Rose, B.A. Daniels & Trappe) C. Walker, Vestberg & A. Schüßler, in Walker, Vestberg, Demircik, Stockinger, Saito, Sawaki, Nishimura & Schüßler.	
	Esporas están constituidas por tres capas (L1,L2, L3): L1 coloración blanco rojizo con el reactivo de melzer, L2, la hifa de sostén es color amarillo pálido a amarillo dorado, tiene forma de embudo con un (12.5) 25 (-30) $\mu$ de ancho en la base que se une a la espora.		Esporas de color amarillo pálido, globosa a subglobosas, con un diámetro de (60-) 100 (-140) $\mu$ , están compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L3 con coloración blanco rosado a rojo pastel con reactivo Melzer, la hifa es de color amarillo claro, recta o recurvada en la base de la hifa tiene (8.3-) 13 (-8.3) $\mu$ de ancho.
<i>Funneliformis mosseae</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.		<i>Glomus lamellosum</i> Dalpé, Koske y Tews sp nov.	
			Esporas son de color amarillo marrón a naranja marrón, globosa o subglobosa, (120-) 176 (240) $\mu$ de diámetro, está compuesta por tres capas (L1, L2, L3): la hifa de sostén tienen forma recurvada de ancho en la unión de la espora de (16-) 24 (-32)
<i>Funneliformis</i> aff. <i>geosporum</i> (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.			

**6.4.1.2. *Rhizophagus clarus*** (T.H. Nicolson & N.C. Schenck) C. Walker & A. Schüßler  
comb. nov.

En esta especie las esporas se encuentran solas en el suelo, su color va desde hialino hasta el amarillo pálido; globosa a subglobosa de (70-) 106 (-150)  $\mu$  de espesor, con una sola hifa de sostén, está compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L1 es una capa mucilaginosa, hialina, de (0.3-) 0,6 (-0.9)  $\mu$  de espesor, presenta coloración rosada con el reactivo de Melzer y generalmente no se encuentra en las esporas maduras, L2 es una capa laminada, suave, hialina, con espesor de (2.5-) 5.8 (-11)  $\mu$ , L3 es una capa laminada, suave, su color va desde hialina hasta amarillo pálido, su espesor es de (2.9-) 5.9 (-10)  $\mu$ , la hifa de sostén es de color hialina a amarillo pálido, es recta o recurvada, cilíndrica con forma de embudo con un ancho a la altura de la unión con la espora de (11.3-) 13.3 (-15.7)  $\mu$  (Cuadro 8) (Błaszowski, 2015).

**6.4.1.3. *Rhizophagus intraradices*** (N.C. Schenck & G.S. Sm.) C. Walker & A.  
Schüßler comb. nov.

En esta especie las esporas en el suelo se producen en agregados o por separado y con frecuencia se forman en el interior de las raíces, estos agregados son de color amarillo pálido o amarillo grisáceo, generalmente son ovoides 0.3-1.8 x 1.0-3.0  $\mu$  y pueden tener de 2 a 100 esporas, las esporas son de color hialino (inmaduras), amarillo pálido a amarillo grisáceo, puede tener un tinte verdoso (maduras), su forma es globosa o subglobosa de espesor de (30-) 92 (-120)  $\mu$ , ocasionalmente puede ser

ovoide con 46 a 90 x 62 a 120 $\mu$ , está constituida por tres capas (L1, L2, L3): L1 esta capa siempre se encuentra muy deteriorado o desprendida de las esporas maduras y tiene un espesor de (0.7-) 1.4 (-2.5)  $\mu$ , L2 es una capa semiflexible, hialina con un espesor de (2.2-) 3.0 (-3.9)  $\mu$ , deteriorada en esporas maduras o con estructura granular, L3 es una capa laminada de color amarillo pálido o amarillo grisáceo con espesor de (2.0-) 6.7 (-11)  $\mu$ , en esporas inmaduras esta capa está compuesta por 20 subcapas (laminadas) de aproximadamente de 0.5 a 1  $\mu$ , la hifa de sostén es de color amarillo pálido o amarillo grisáceo, de forma curva o recta; cilíndrica la base de la hifa es de (13.7-) 15.5 (-18.4)  $\mu$  de ancho (Cuadro 8) (Blaszkowski, 2015).

**6.4.1.4. *Funneliformis mosseae*** (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler  
comb. nov.

En esta especie las esporas se encuentran individuales en el suelo, también se pueden encontrar en agregados sueltos o esporocarpos compactos de color amarillo pálido al amarillo dorado, globosos o subglobosa de (80-) 185 (-280)  $\mu$  de diámetro, puede ser irregular de 80-140 x 195-280  $\mu$  con una sola hifa de sostén, estos esporocarpos pueden tener 2 a 5 esporas rodeadas por un Peridio hifal, las esporas están constituidas por tres capas (L1,L2, L3): L1 es una capa mucilaginosa, hialina de (0.5-) 1.1 (-2.0)  $\mu$  de espesor, esta capa tiene una coloración blanco rojizo con el reactivo de melzer, normalmente es esporas jóvenes, L2 es una capa semiflexible, hialina de (0.8) 1.2 (-1.8)  $\mu$  de espesor, es suave y gruesa, que raramente se observa en esporas maduras en las que se encuentran fragmentos descompuestos, L3 es una capa laminada de color amarillo pálido a amarillo dorado con un espesor de

(2.8-) 4.5 (-7.2)  $\mu$  de espesor, la hifa de sostén es color amarillo pálido a amarillo dorado, tiene forma de embudo con un (12.5) 25 (-30)  $\mu$  de ancho en la base que se une a la espora (Cuadro 8) (Blaszkowski, 2015).

**6.4.1.5.** *Funneliformis* aff. *geosporum* (T.H. Nicolson & Gerd.) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.

En esta especie las esporas son de color amarillo marrón (más frecuente) a naranja marrón, son de forma globosa o subglobosa, en algunos casos irregular su tamaño (120-) 176 (240)  $\mu$ , está compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L1 esta capa es hialina, con < 1  $\mu$  de espesor, no existe reacción al reactivo de Melzer y se degrada formando una capa granular con desprendimientos, L2 es una capa rígida y laminada, color amarillo marrón a naranja marrón con un espesor de 6.14  $\mu$ , L3 es una capa semirrígida de entre 1 y 2.5  $\mu$  de espesor, muy adherida a L2 pero diferenciadas por el color de amarillo al naranja marrón, la hifa de sostén tienen forma recurvada de ancho en la unión de la espora de (16-) 24 (-32) (Cuadro 8) (INVAM, 2015).

**6.4.1.6.** *Diversispora eburnea* (L.J. Kenn., J.C. Stutz & J.B. Morton) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.

En esta especie las esporas poseen una forma globosa a subglobosa y a menudo presenta forma de lagrima, con un color blanco brillante a color crema, tiene un tamaño (40-) 82 (-120)  $\mu$ , posee dos capas normalmente muy unidas (L1,L2): L1

hialina de 0.5 a 1.2  $\mu$  de espesor, semi-flexible cuando se separa de L2 (raro), a veces esta capa puede estar cubierta de restos orgánicos, L2 es una capa tiene subcapas una hialina delgada seguida de una subhialina, tiene un espesor de (1.2-) 2.3 (-4), la hifa de sostén es cilíndrica o ligeramente curva en la unión de la hifa y la espora tiene < 1  $\mu$  de ancho (Cuadro 8) (INVAM, 2015).

#### **6.4.1.7. *Diversispora* sp.**

Las especies de este género son hongos hipogeos o parcialmente epigeos, que forman micorrizas arbusculares con o sin vesículas, con o sin células hipogeos auxiliares, se forman en sáculos esporígeos (esporas acaulosporoides), también pueden tener una formación en el que hay una base bulbosa en un a hifa esporígeas (espora gigasporoide) o esporas glomoides, se diferencia de otras familias de las diversisporales ya que posee esporas glomoides, y la germinación no está acompañada de un escudo de germinación, también porque sus esporas glomoides tiene una estructura de pared exterior delgada y de estructura laminada y una interior que no reacciona con el reactivo de melzer (Cuadro 8) (Schüßler y Walker, 2010).

**6.4.1.8. *Ambispora* aff. *gerdemannii*** (S.L. Rose, B.A. Daniels & Trappe) C. Walker, Vestberg & A. Schüßler, in Walker, Vestberg, Demircik, Stockinger, Saito, Sawaki, Nishmura & Schüßler.

La esporas de esta especie se forman por separado, se origina en un péndulo de un saco esporíferos, está compuesta por tres capas (L1,L2,L3): L1 es evanescente y de

color amarillo pálido a color amarillo maíz con un espesor de (1.7-) 3.3 (-5.6)  $\mu$  de espesor cuando está completa, por lo general se desprende con la edad, L2 es una capa semiflexible de un espesor de (1.2-) 2.5 (-3.7)  $\mu$  es grueso y continuo con la pared del pedicelo, L3 es una capa semiflexible, hialina de 0.5 a 1  $\mu$  de espesor, por lo general está adherida fuertemente a la L 2, la pared germinal 1 comprende 2 capas frágiles, lisas, hialinas, gw 1/1 con un espesor de (0.5-) 1.1 (-1.6)  $\mu$  y la gw 1/2 (0.6-) 1.4 (-2.1)  $\mu$ , por lo general están adheridas entre si La pared germinal 2 consiste en tres capas lisas y hialinas gw 2/1-3, L1 Flexible a semiflexible, 0.5 a 0.8  $\mu$  de espesor, muy adherido a la L2, L2 es una capa semiflexible, coriáceas, finamente laminados, hialina (1.7-) 2.8 (-4.1)  $\mu$  de espesor, L3 es una capa flexible o semiflexible de 0.5 a 0.8  $\mu$  de espesor, muy raro que este separada de la L2, con reactivo de Melzer, la única capa que tiene reacción es la 1 con manchas de color rojo naranja con colore rojo pastel. El pedicelo es de 10 a 15  $\mu$  de largo y 15 a 27  $\mu$  de ancho, de la base de las esporas hasta la base del sáculo esporífero mide 80 a 120  $\mu$ , consta de una pared hialina continua de la pared dl cuello del sáculo, la pared de la espora y la L1 con un poro abierto. El sáculo esporífero es de hialino a blanco, globoso a subgloboso de (185-) 200 (-275)  $\mu$  de diámetro, puede ser ovoide 160-200 x 210-260  $\mu$ , formada en el extremo del cuello con forma de embudo. La capa del sáculo esporífero es semiflexible, semipermanente, hialina con color blanco amarillento con 3.5 a 8.8  $\mu$  de espesor, es lisa en esporas jóvenes y rugosa en maduras. El cuello del sáculo es blanco amarillento de 200 a 250  $\mu$  de largo y 30 a 45  $\mu$  de ancho en la base de este, 2.5 – 25  $\mu$  de ancho en la base de la espora y disminuye gradualmente hasta 8.1  $\mu$  de ancho. La cicatriz de la espora es

ligeramente elevada y se puede observar en una vista transversal, circular y tiene de diámetro 9.5 a 12.0 x 12.0 a 14.0  $\mu$  (Cuadro 8) (Blaszkowski, 2015; INVAM, 2015).

**6.4.1.9.** *Claroideoglopus lamellosus* (Dalpé, Koske & Tews) C. Walker & A. Schüßler comb. nov.

Las esporas de esta especie se forman en el suelo, son de color amarillo pálido, blanco amarillento amarillo claro, su forma es globosa a subglobosas, con un diámetro de (60-) 100 (-140)  $\mu$ , a veces ovoides d 80-110 x 120-160  $\mu$ , con una sola hifa de sostén, están compuesta por tres capas (L1, L2, L3): L1 es una capa hialina de (2.2-) 5.3 (-10.5)  $\mu$  de espesor, forma un aro de luz cuando esta se refleja y no está deteriorada, está presente en las esporas maduras, L2 es una capa laminada de color blanco amarillento a amarillo claro con un espesor d (2.0-) 8.5 (-16.0)  $\mu$ , L3 es una capa flexible, hialina de 0.2 - 0.5  $\mu$  de espesor a veces se separa de la capa 2 cuando son trituradas muy fuertemente, por lo general unido a la superficie del lumen de la hifa de sostén, con el reactivo de melzer tiene una coloración blanco rosado a rojo pastel, cuando hay esporas jóvenes la mayoría tiene solo una capa, la capa 2 y 3 se forman sucesivamente con la maduración de las esporas, la hifa es de color amarillo claro, recta o recurvada en la base de la hifa tiene (8.3-) 13 (-8.3)  $\mu$  de ancho (Cuadro 8) (Blaszkowski, 2015).

## 6.5. Efecto del petróleo en las especies de HMA

El orden de abundancia de las morfoesporas por género y especie en suelo sin y con petróleo fue: *Rhizophagus fasciculatus* (1200) en T0 > *Diversispora* sp. (1056) en T6 > *Rhizophagus intrarradices* (753) en T0 > *Diversispora eburnea* (126) en T0 > *Claroideoglossum lamellosum* (54) en T1 > *Ambispora* aff. *gerdemannii* (36) en T0 > *Rhizophagus clarus* (25) en T0 > *Funneliformis mosse* (10) en T6 (Cuadro 9). La media del número de esporas por especies fueron estadísticas diferentes por efecto de dosis de petróleo (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) (Cuadro 9; Apéndice, Cuadro 7). *Rhizophagus fasciculatus* fue reducida 12.9 veces su población en 180000 mg kg<sup>-1</sup> (T8) respecto a suelo sin petróleo (T0). *R. clarus* 2.5 veces por 90000 (T5), 120000 (T6), 150000 (T7) y 180000 (T8). *R. intrarradices*, *F. aff. Geosporum* y *D. eburnea* 50.2, 3.6 y 7.87 veces por 150000 (T6). *A. aff. gerdemannii* y *C. lamellosum* 2.4 y 0.93 veces por 60000 (T4). Una especie de HMA fue estimulada por la presencia de petróleo en el suelo; *Diversispora* sp (Cuadro 9), lo que llevaría a pensar que esta especie está asociada a la raíz de *L. hexandra* pero con dosis de hasta 90000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo.

La diversidad de esporas viables por su contenido citoplasmático encontradas en el suelo cercano a la raíz de *L. hexandra*, indica que la planta tiene el potencial de sostener las necesidades energéticas del HMA, y beneficiarse de él en ambientes con estrés. Se identificaron nueve morfoespecies y ocho especies de ellas, se han localizado asociadas a diversas plantas en suelo no contaminado con petróleo y se comprueban que las plantas se benefician de esta asociación al incrementar su

crecimiento (Verma *et al.*, 2008; Ortas, 2015). El género *Diversispora* ha sido reportada en otros ambientes, pero no la especie que se identificó en esta investigación.

El efecto de las diferentes dosis de petróleo se observa en las nueve especies de HMA encontradas en esta investigación, pero en cinco de ellas (*R. fasciculatus*, *R. intrarradices*, *F. geosporum*, *D. eburnea* y *A. gerdemannii*) la tendencia inversamente proporcional a la dosis de petróleo utilizadas en los tratamientos; T1, T2, T3, T4, T5 y T6, pero esta relación cambia en T7:150000 mg kg<sup>-1</sup>, *R. clarus* y *C. 78amellosun* son especies que no manifiestan tendencia alguna a la dosis de petróleo crudo. *Funneliformis mosse* solo se establece en T6, pero *Diversispora* sp. Alcanzó la mayor cantidad de esporas viables (1056 en 100g de suelo) en T6 (120000 mg kg<sup>-1</sup>) (Cuadro 9). Respuestas diversas como las encontradas en esta investigación han sido reportadas por otros investigadores, ya que esto depende según Volante *et al.* (2005) de la concentración de hidrocarburos y tipo de planta, por ejemplo: *R. intraradices* en suelo 3000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo no afecta el porcentaje de germinación (Kirk *et al.*, 2005), pero 35, 70, 140, 280 µM de benzo[a]pireno inhibió el número total de esporas (Debiane *et al.*, 2009), así mismo Liu y Dalpé (2009) encontraron efecto inhibitorio en un 75 a 35% en suelo con fenatreno (0, 3500, 7000, 10500 mg kg<sup>-1</sup>) y antraceno en las mismas concentraciones del 75 al 54 %.

*Funneliformis mosse* en presencia de antraceno (6.25, 12.5, 25, 50 mg L<sup>-1</sup>) el número de esporas descendió de 559 a 248 lo que indica que el número de esporas es afectada por la presencia de los hidrocarburos (Debiane *et al.*, 2008). *R. custos* es

resistente al antraceno debido a que no afecto su colonización (Aranda *et al.* 2013). *Rhizophagus irregularis* fue afectada por bezo[a]pireno (Calonne *et al.* 2014). *G. mosse* sobrevive y coloniza hasta un 54% en presencia de benceno, etilbenceno, tolueno y xileno y en la combinación de BTEX hasta un 51% (Volante *et al.*, 2005). *Glomus llamellosun*, *G. sinuasum*, *Acaulospora laevis* y *Ambispora gerdermanni* fue encontrada asociadas a *Echinochloa polystachya* en suelo con 62 990 mg kg<sup>-1</sup> HTP's (Franco-Ramírez *et al.*, 2007).

Cuadro 9. Especies de hongos micorrícicos arbusculares en suelo y rizosfera de *Leersia hexandra* a los 180 días de exposición a petróleo crudo.

Especies	Petróleo crudo (mg kg <sup>-1</sup> suelo seco)								
	693	3000	10000	30000	60000	90000	120000	150000	180000
	Número de esporas (100 g de suelo)								
<i>Rhizophagus fasciculatus</i>	1200 <sup>a</sup>	373 <sup>b</sup>	103 <sup>b</sup>	106 <sup>b</sup>	143 <sup>b</sup>	17 <sup>b</sup>	93 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<i>Rhizophagus clarus</i>	25 <sup>a</sup>	23 <sup>a</sup>	20 <sup>ab</sup>	33 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>b</sup>	10 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<i>Rhizophagus intraradices</i>	753 <sup>a</sup>	384 <sup>ab</sup>	310 <sup>b</sup>	343 <sup>ab</sup>	270 <sup>b</sup>	86	15 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<i>Funneliformis mosseae</i>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<i>Funneliformis aff. geosporum</i>	90 <sup>a</sup>	93 <sup>a</sup>	16 <sup>ab</sup>	15 <sup>ab</sup>	30 <sup>ab</sup>	15 <sup>ab</sup>	25 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<i>Diversispora ebúrnea</i>	126 <sup>a</sup>	108 <sup>a</sup>	45 <sup>a</sup>	13 <sup>a</sup>	60 <sup>a</sup>	30 <sup>a</sup>	16 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
<i>Diversispora sp.</i>	200 <sup>b</sup>	120 <sup>b</sup>	53 <sup>b</sup>	216 <sup>b</sup>	96 <sup>b</sup>	466 <sup>ab</sup>	1056 <sup>a</sup>	125 <sup>b</sup>	1026 <sup>a</sup>
<i>Ambispora aff. gerdemannii</i>	36 <sup>a</sup>	30 <sup>ab</sup>	20 <sup>ab</sup>	6.67 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	15 <sup>ab</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
<i>Claroideoglossum lamellosum</i>	40 <sup>a</sup>	54 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	43 <sup>a</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>

Valores con diferentes letras entre filas son estadísticamente diferentes (Tukey, P ≤ 0.05, n=4)

## **6.6. Análisis de los índices de micotoxicidad al petróleo**

Los índices de toxicidad integran los efectos causados por el petróleo en los organismos vivos del suelo. Un índice de micotoxicidad (IRM) y toxicidad (IRE) es el efecto en estructuras fúngicas del HMA en raíz de *L. hexandra* y en las nueve especies identificadas en esta investigación. Este índice proporciona un valor numérico de todas las variables evaluadas. Este valor sirve para determinar de una manera holística el comportamiento de un organismo en suelos contaminados con petróleo fresco.

### **6.6.1. Índice relativo de micotoxicidad al petróleo**

En la Figura 20, se observa los IRM del porcentaje de hifas, vesículas, arbuscúlos y esporas intraradicales. En cada uno de ellos con diferencias estadísticas significativas por efecto de las dosis de petróleo crudo (Tukey  $p \leq 0.05$ ) (Figura 20 Apéndice, Cuadro 6), y sugieren que estos parámetros son indicadores de adaptación y toxicidad al petróleo.

El porcentaje de hifas, vesículas, arbuscúlos y esporas intraradicales responden al petróleo con IRM menor a uno e indica un efecto negativo en las dosis de 90000 (T5), 120000 (T6), 150000 (T7), 180000 (T8), sin embargo los IRM mayores a uno se observan en 3000 (T1), 10000 (T2), 30000 (T3) y 60000 (T4)  $\text{mg kg}^{-1}$  petróleo, con un estímulo positivo en la colonización de *L. hexandra*. A partir de concentraciones  $\geq 60\ 000$   $\text{mg kg}^{-1}$  de petróleo pueden ser considerados como

IRM, lo que indica que el umbral de tolerancia fue alto para esta asociación, y es posible que se desarrollen adecuadamente en pruebas de fitorremediación de suelos en dosis de 60000 mg kg<sup>-1</sup>.

De las estructuras fúngicas evaluadas en esta investigación, solamente el número de esporas totales reflejan el efecto tóxico del petróleo de acuerdo con la concentración evaluada, por lo tanto es un parámetro útil para obtener el IRM en los tratamientos T1 hasta T8 (Cuadro 9). La productividad vegetal de *L. hexandra* estimulada por el petróleo y los IRM basados en el porcentaje de hifas, arbuscúlos, vesículas y esporas intrarradicales en concentraciones  $\geq 60000$  mg kg<sup>-1</sup> petróleo crudo, indican que es una asociación micorrícica que se establece en suelos con estrés inducido por la contaminación, esto sugiere que la micorriza arbuscular mostró sensibilidad a la presencia del petróleo en el suelo y se propone a esta simbiosis como indicadores de la toxicidad en Gleysoles contaminados con petróleo crudo en el trópico húmedo mexicano.

Diferentes investigadores reportan lo contrario a la respuesta de los HMA encontrada en esta investigación, e indican que el porcentaje de hifas, arbuscúlos, se inhibe en suelo con una concentración de 2000, 4000 y 8000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo (Nwoko, 2014), pero dosis de 0, 50, 100, 150 mg kg<sup>-1</sup> el hidrocarburo policíclico antraceno no induce inhibición alguna en hifas, arbuscúlos y vesículas (Cheung *et al.*, 2008).

Una explicación de la respuesta del HMA asociado a *L. hexandra* en suelos estresados por el petróleo, posiblemente se debe a que se utilizó un Gleysol como sustrato, con altos contenidos de carbono orgánico, N total y un pasto nativo de zonas tropicales húmedas adaptado a la presencia del petróleo en el suelo y con un sistema radical fibroso. Posiblemente este pasto hasta dosis de 60000 mg kg<sup>-1</sup> logra suministrar el carbono que requiere el hongo como fuente de carbono y energía.

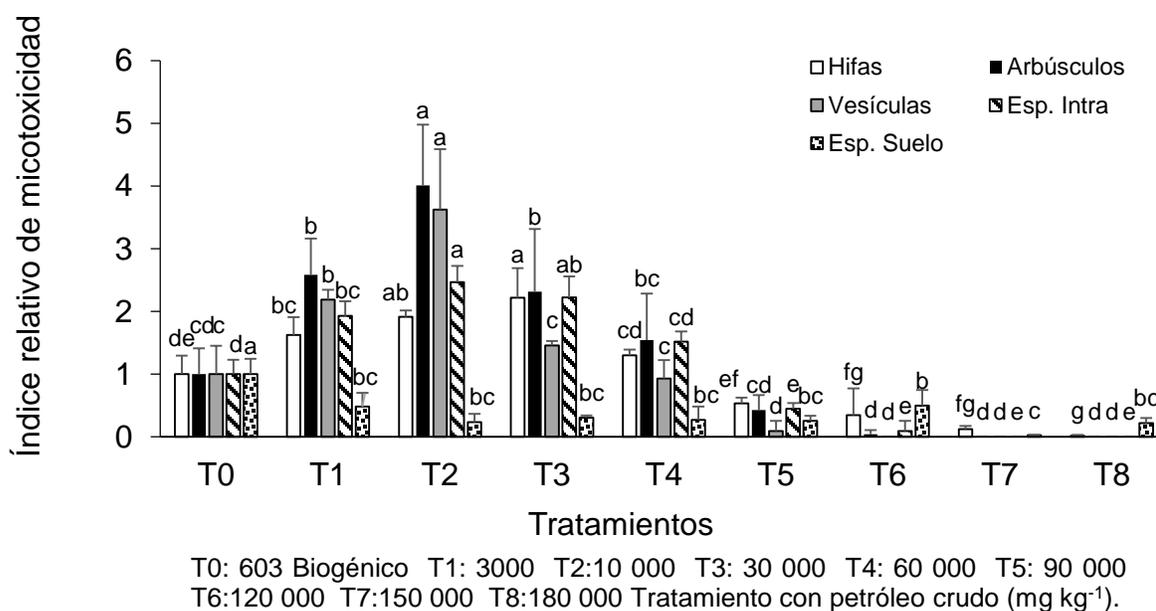
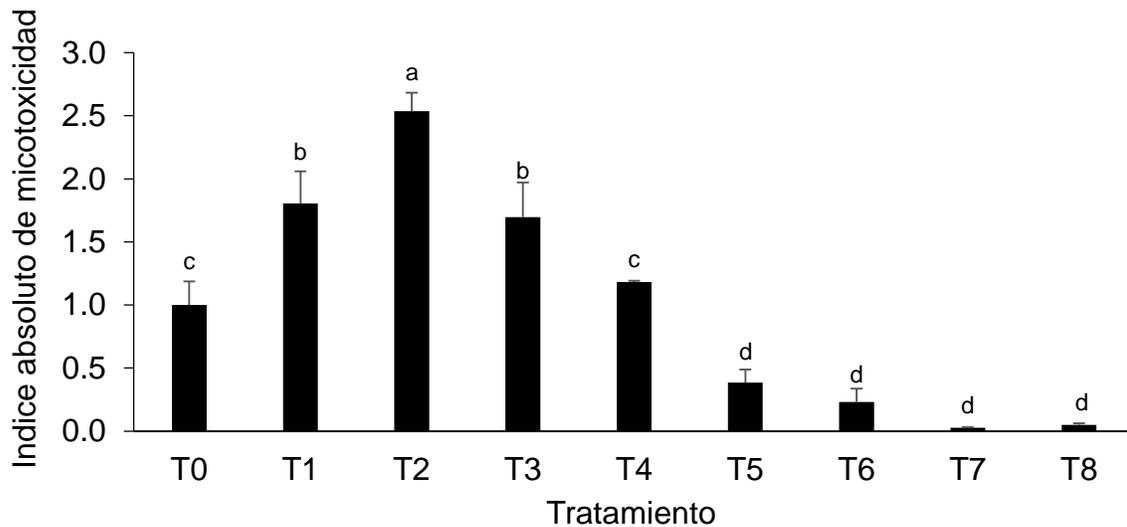


Figura 20. Índice relativo de micotoxidad (IRM) del HMA al petróleo crudo a los 180 dds después del trasplante. IRM>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4).

### 6.6.2. Índice absoluto de micotoxicidad al petróleo

Los índices absolutos de micotoxicidad que representa la respuesta del HMA de manera global al petróleo, estos IAM fueron diferentes y significativos por efecto de la dosis de petróleo (Tukey  $\leq 0.05$ ) (Figura 21, Apéndice, Cuadro 6), el mayor índice (2.9) se observa en 10 000 (T2) y el menor en 180 000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo (T8). Los IAM mayores a uno se obtuvieron en los primeros cuatro tratamientos con petróleo 3000 (T1), 10000 (T2), 30000 (T3) y 60000 (T4) mg kg<sup>-1</sup> e indican estimulación positiva para la asociación simbiótica con *L. hexandra* en condiciones de niveles que alcanzan los 60000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo. Sin embargo, los IAM menores a uno se observan a partir de 90000 mg kg<sup>-1</sup> e indican inhibición en la colonización.



T0: 603 Biogénico T1: 3000 T2:10 000 T3: 30 000 T4: 60 000 T5: 90 000  
T6:120 000 T7:150 000 T8:180 000 Tratamiento con petróleo crudo (mg kg<sup>-1</sup> suelo seco)

Figura 21. Índice absoluto de micotoxidad (IAM) al petróleo crudo del HMA a los 180 dds. IRM>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

### 6.6.3. Índices relativos de toxicidad de esporas

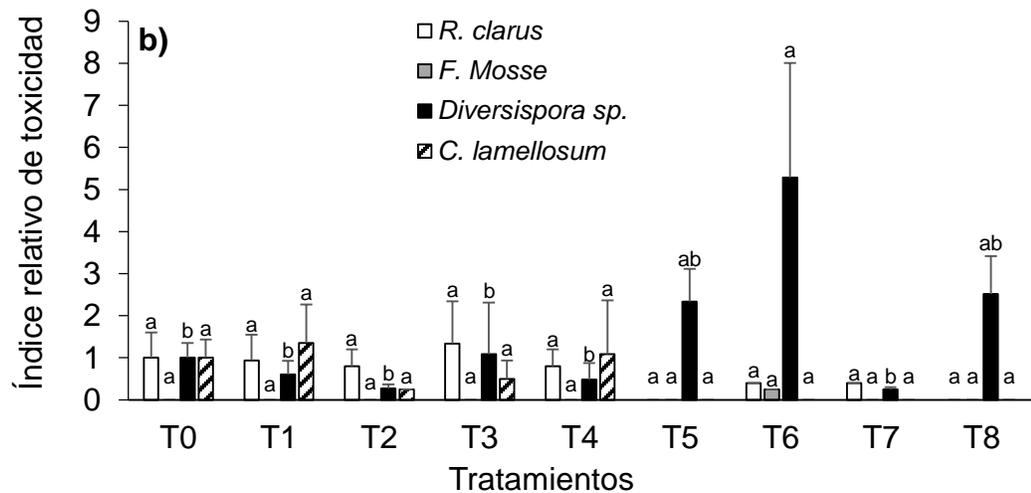
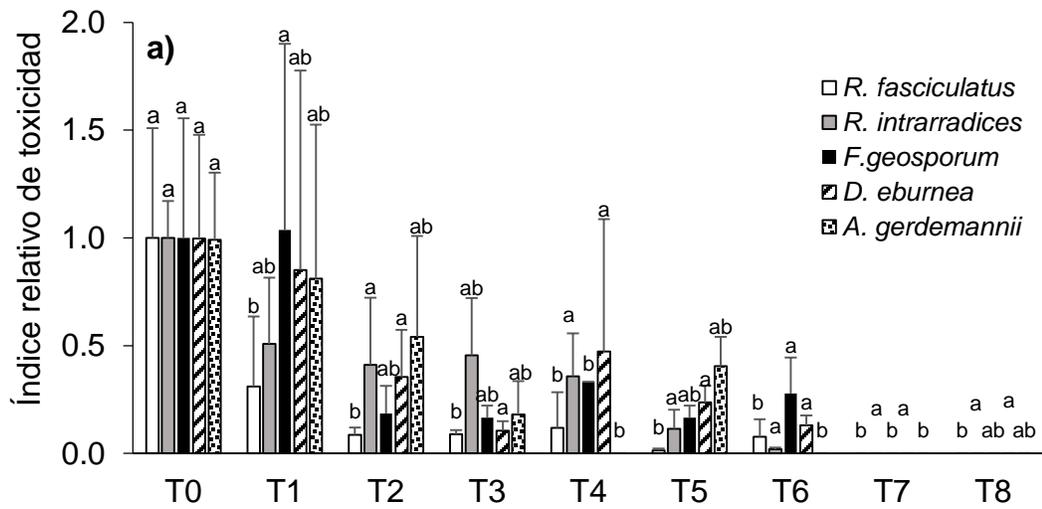
Los índices relativos de toxicidad de esporas (IRE) obtenidos del efecto del petróleo en el número de cada una de las nueve especies de HMA presentaron diferencias estadísticas significativas por efecto del petróleo crudo (Tukey  $\leq 0.05$ ) (Figura 22 a, 22b; Apéndice, Cuadro 8).

Los índices relativos de toxicidad (IRE) de *R. fasciculatus*, *R. intraradices*, *D. eburnea*, *A. aff. gerdermanii*, *F. aff. geosporum* y *Diversispora* sp. Muestran diferencias estadísticas (Tukey,  $p \leq 0.05$ ) por efecto del petróleo (figura 22 a), pero este efecto no ocurrió para *R. clarus*, *F. mosseae* y *C. 86amellosun* (figura 22 b). Los IRE muestran efecto tóxico directamente proporcional al aumentar la dosis de petróleo. La figura 22<sup>a</sup> muestra que en cinco morfoespecies el número de esporas disminuyó por el petróleo, pero por la amplia desviación estándar no se registraron diferencias estadísticas. El efecto tóxico del petróleo muestra que cinco HMA fueron afectados por el petróleo, acentuándose la toxicidad hacia las esporas en suelos donde *L. hexandra* estuvo expuesta a 150000 y 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo. *Funneliformis* aff. *geosporum* es una especie indicadora de toxicidad inducida por la presencia de 10000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo; por su parte, *R. clarus* y *C. 86amellosun* muestran toxicidad pero sin diferencias estadísticas por la dispersión de datos (figura 22b). *Diversispora* sp. Fue tolerante a todas las dosis de petróleo, mientras que el valor del IRE muestra que la micorrícica en *L. hexandra* fue 500% mayor en 120000 g de petróleo que en el suelo sin petróleo.

Las especies *A. aff. gerdermanii*, *D. eburnea*, *R. fasciculatus* y *R. intraradices* mostraron IRE menores a 1.0 en las ocho concentraciones de petróleo (figura 22a), lo que muestra su utilidad como indicadoras de la toxicidad. Sin embargo *Diversispora* sp. Presenta IRE inferiores a 1.0 en T1, T2, T4 y T7, y en suelos con 90 000 (T5), 120 000 (T6) y 180 000 (T8) los IRM son mayores a 1.0 (Figura 22 b), y por el extenso sistema radical de *L. hexandra*, esto sugiere que la relación entre *Diversispora* sp. Y *L. hexandra* se establece por mecanismos

metabólicos, que son activados en condición de estrés causado por el petróleo, y les permite establecer la asociación simbiótica. Lo que indica adaptación a las condiciones de estrés existentes en el suelo, esto sugiere que puede ser utilizada como una especie biorremediadoras de suelos con petróleo fresco.

Las especies *R. clarus*, *F. mosse*, *C. 87amellosun* tuvieron un comportamiento heterogéneo según las dosis de petróleo. *R. clarus* se aisló en la mayoría de los tratamientos con excepción 90 000 (T5) y 180000 mg kg<sup>-1</sup>(T8) en los que fue completamente inhibida, *F. mosseae* solo tiene presencia en la dosis de 120000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo (Figura 22 b).

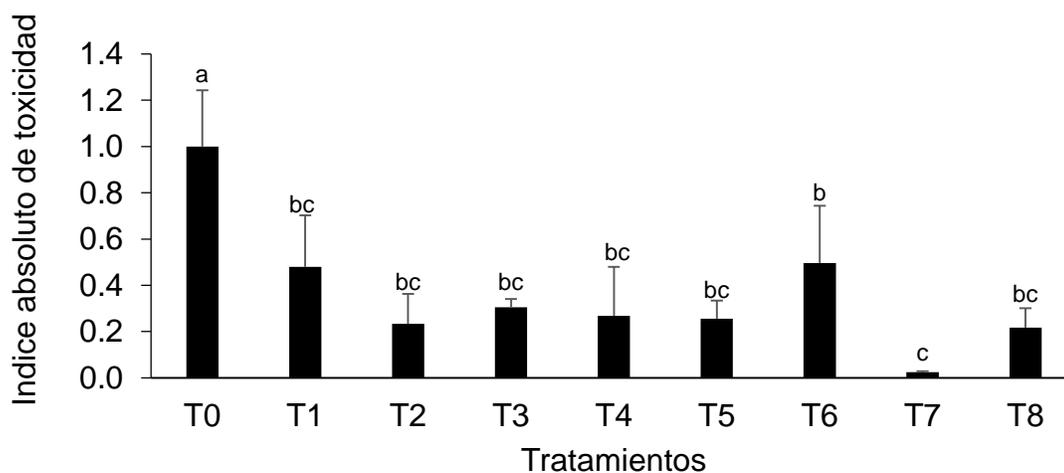


T0: 603 Biogénico T1: 3000 T2:10 000 T3: 30 000 T4: 60 000 T5: 90 000 T6:120 000 T7:150 000 T8:180 000 Tratamiento con petróleo crudo (mg kg<sup>-1</sup> suelo seco)

Figura 22. Índice relativo de toxicidad (IRE) de nueve especies de hongos micorrícicos a los 180 dds de exposición a petróleo crudo. IRE>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas del mismo color indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4).

#### **6.6.4. Índice absoluto de toxicidad por esporas al petróleo**

El IAE obtenidos con la respuesta de ocho especies de HMA e indica un comportamiento heterogéneo, con un efecto de inhibición en el número total de esporas en el suelo (Figura 23; Apéndice, Cuadro 8). Los ocho IAE son menores a 1.0, el tratamiento de 150000 mg kg<sup>-1</sup> (T7) fue el tratamiento que presento mayor toxicidad por la adición de petróleo con un índice de 0.02 que indica una inhibición del 98 %. El tratamiento con mayor significancia (IAE=0.5) el T6 (120000mg kg<sup>-1</sup>) e indica que disminuye un 50 % el número de esporas totales respecto a T0 (testigo). Las concentraciones de 10000, 30000, 60000, 90000, 180000 mg kg<sup>-1</sup> presentaron IAE estadísticamente similares con reducciones en el número de esporas que van del 50 % al 80 %.



T0: 603 Biogénico T1: 3000 T2:10 000 T3: 30 000 T4: 60 000 T5: 90 000 T6:120 000 T7:150 000 T8:180 000 Tratamiento con petróleo crudo (mg kg<sup>-1</sup>)

Figura 23. Índice absoluto de toxicidad (IAE) de nueve especies de hongos micorrícicos arbusculares asociado a *Leersia hexandra* Sw. a los 180 dds. IAE>1 Indica adaptación a los HTP's (hay estimulación sobre la variable). < 1 Indica toxicidad a los HTP's (hay inhibición de la variable). = 1 indica tolerancia, no hay diferencias con el testigo. Letras diferentes entre columnas indican diferencias estadísticas significativas (Tukey  $p \leq 0.05$ ,  $n=4$ ).

## CAPITULO VII

### CONCLUSIONES

#### 7.1 Conclusión General.

La inducción de hormesis en el crecimiento y producción de *L. hexandra*, el incremento de la cantidad de esporas del género *Diversispora* sp. en suelo con dosis de hasta 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo y los índices relativos de micotoxicidad (IRM) mayores a 1.0 en concentraciones menores e iguales a 60000 mg kg<sup>-1</sup>, indican una adaptación del pasto y de la asociación micorrícica en suelos con estrés inducido por niveles de contaminación, pero también la asociación micorrícica a partir de 60000 mg kg<sup>-1</sup> y las especies *R. fasciculatus*, *R. intraradices*, *F. geosporum*, *D. ebúrnea* y *A. gerdemannii* en dosis iniciales de 3000 mg kg<sup>-1</sup> son indicadores de la toxicidad de suelos con estrés, por lo tanto la asociación micorrícica con *L. hexandra* tienen potencial para usarse como parámetros de evaluación de la toxicidad e integran una tecnología de fitorremediación de suelos Gleysols impactados por la industria petróleo en el sureste de México.

### 7.1.1. Conclusiones particulares

1. La longitud de estolones, plantas jóvenes, biomasa radical, foliar y total de *L. hexandra* son parámetros que no se afectan a dosis de hasta 90000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo, por lo tanto no son de utilidad para usarlos como indicadores de fitotoxicidad.
2. El porcentaje de hifas, arbuscúlos, vesículas y esporas intrarradicales en *L. hexandra* son parámetros que muestran sensibilidad a dosis mayores e iguales a 90000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo, se pueden usar como indicadores micotóxicos.
3. *Leersia hexandra* expuesta a diferentes dosis de petróleo no afectan el establecimiento de las morfoespecies siguientes; *R. fasciculatus*, *R. clarus*, *R. intrarradices*, *F. mosseae*, *F. aff. geosporum* *D. eburnea*, *D. sp.*, *A. aff. gerdemannii*, *C. lamellosun*, lo que indica la capacidad de estas para sobrevivir en ambientes estresados con contaminantes orgánicos.
4. Diversas morfoespecies de hongos micorrícicos son afectadas por dosis de 3000 hasta 180000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo crudo, por lo que se pueden utilizar como indicadores de toxicidad.
5. *Diversispora sp.* fue la especie que se mantuvo presente hasta en la concentración más alta de HTP's por lo que esta puede ser usada para actividades de fitorremediación inoculada en *Leersia hexandra* Sw., pero no como indicadora de la toxicidad.

## CAPITULO VIII

### RECOMENDACIONES

1. Purificar las esporas micorrícicas de las especies tolerantes a concentraciones altas de petróleo, a través de un cultivo trampa. En especial *Diversispora* sp. que es la más resistentes a dosis de hasta 180 000 mg kg<sup>-1</sup> de petróleo fresco.
2. Inocular morfoespecies en suelo plantado con el pasto *Leersia hexandra* Sw. y someterlas a estrés abiótico a través de petróleo crudo para evaluar su comportamiento en la fitorremediación, usando como factor cada morfoespecies e identificar la mejor asociación entre especie micorrícica y pasto en la degradación del petróleo.
3. Realizar una descripción taxonómica de especies micorrícicas *in situ* con petróleo intemperizado y en invernadero con petróleo fresco, que permitan seleccionar nuevas especies tolerantes e indicadoras de la toxicidad de ambientes contaminados.
4. Analizar de manera comparativa los resultados *in situ* e invernadero de la colonización micorrícica arbuscular, que permita encontrar similitudes y/o aproximaciones, para generar información y complementar la explicación de la toxicidad y/o adaptación al petróleo del hongo micorrícico arbuscular y las morfoespecies.

## CAPITULO IX

### APÉNDICES

Cuadro 1. Análisis de varianza de longitud de estolones de *Leersia hexandra* Sw. en suelo con petróleo crudo durante seis meses.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>Inicial</b>					
Modelo	8	1110.013	138.751	7.37	<.0001
Error	27	508.375	18.828		
Total	35	1618.388			
R cuadrada	0.685				
<b>60 días</b>					
Modelo	8	9141.722	1142.715	7.77	<.0001
Error	27	3968.500	146.981		
Total	35	13110.222			
R cuadrada	0.697				
<b>120 días</b>					
Modelo	8	19613.500	2451.687	1.26	0.304
Error	27	52555.500	1946.500		
Total	35	72169.000			
R cuadrada	0.271				
<b>180 días</b>					
Modelo	8	51769.500	6471.187	2.43	0.040
Error	27	72039.250	2668.120		
Total	35	123808.750			
R cuadrada	0.418				

Cuadro 2. Análisis de varianza de plantas jóvenes de *Leersia hexandra* Sw. en suelo con petróleo crudo durante seis meses.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>Inicial</b>					
Modelo	8	8.388	1.048	2.27	0.053
Error	27	12.500	0.462		
Total	35	20.888			
R cuadrada	0.401				
<b>60 días</b>					
Modelo	8	91.500	11.437	2.79	0.216
Error	27	110.500	4.092		
Total	35	202.000			
R cuadrada	0.452				
<b>120 días</b>					
Modelo	8	275.000	34.375	4.08	0.0027
Error	27	227.750	8.435		
Total	35	502.750			
R cuadrada	0.546				
<b>180 días</b>					
Modelo	8	961.222	120.152	9.17	<.0001
Error	27	323.750	13.101		
Total	35	1314.972			
R cuadrada	0.730				

Cuadro 3. Análisis de varianza de biomasa seca foliar, radical y total y diámetro basal de estolón principal.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>Biomasa seca foliar</b>					
Modelo	8	2571.525	321.440	8.88	<.0001
Error	27	977.189	36.192		
Total	35	3548.71			
R cuadrada	0.724				
<b>Biomasa seca radical</b>					
Modelo	8	327.241	40.905	22.13	<.0001
Error	27	49.901	1.848		
Total	35	377.142			
R cuadrada	0.867				
<b>Biomasa seca total</b>					
Modelo	8	1503.766	187.970	4.23	<0.0022
Error	27	1201.207	44.489		
Total	35	2704.973			
R cuadrada	0.555				
<b>Diámetro basal</b>					
Modelo	8	0.418	0.052	1.20	0.3376
Error	27	1.180	0.437		
Total	35	1.598			
R cuadrada	0.261				

Cuadro 4. Análisis de varianza de índices relativos y absolutos de fitotoxicidad (IRF) de las variables longitud de estolones, plantas jóvenes, biomasa foliar, radical, total y diámetro basal de estolón principal.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>IRF longitud de estolones</b>					
Modelo	8	0.218	0.027	5.37	0.0015
Error	18	0.091	0.005		
Total	26	0.309			
R cuadrada	0.704				
<b>IRF de plantas jóvenes</b>					
Modelo	8	3.395	0.424	23.33	<.0001
Error	18	0.327	0.018		
Total	26	3.723			
R cuadrada	0.912				
<b>IRF Biomasa foliar</b>					
Modelo	8	2.484	0.310	20.77	<.0001
Error	18	0.269	0.014		
Total	26	2.753			
R cuadrada	0.902				
<b>IRF Biomasa radical</b>					
Modelo	8	62.198	7.774	29.83	<.0001
Error	18	4.691	0.260		
Total	26	66.89			
R cuadrada	0.929				
<b>IRF Biomasa radical</b>					
Modelo	8	1.520	0.190	11.49	<.0001
Error	18	0.297	0.016		
Total	26	1.818			
R cuadrada	0.836				
<b>IRF Diámetro basal de EP</b>					
Modelo	8	0.117	0.014	3.44	0.0140
Error	18	0.016	0.004		
Total	26	0.193			
R cuadrada					
<b>IAF</b>					
Modelo	8	1.699	0.212	11.48	<.0001
Error	18	0.332	0.018		
Total	26	2.032			
R cuadrada	8.715				

Cuadro 5. Análisis de varianza de % colonización de las variables hifas, esporas, vesículas, arbusculos y colonización total.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>% Hifas</b>					
Modelo	8	22998.916	2874.864	57.79	<.0001
Error	27	1343.088	49.744		
Total	35	24342.005			
R cuadrada	0.944				
<b>% Arbusculos</b>					
Modelo	8	5866.229	733.278	34.97	<.0001
Error	27	566.155	20.968		
Total	35	6432.384			
R cuadrada	0.911				
<b>% Vesículas</b>					
Modelo	8	3079.915	384.989	63.27	<.0001
Error	27	164.295	6.085		
Total	35	3244.211			
R cuadrada					
<b>%Esporas intrarradicales</b>					
Modelo	8	22998.916	2874.864	57.79	<.0001
Error	27	1343.088	49.744		
Total	35	24342.005			
R cuadrada	0.958				
<b>% Colonización total</b>					
Modelo	8	10451.889	1306.486	141.26	<.0001
Error	27	249.710	9.248		
Total	35	10701			
R cuadrada	0.976				

Cuadro 6. Análisis de varianza de índices relativos y absoluto de micotoxicidad (IRM) de las variables % hifas, esporas, vesículas, arbusculos y colonización total.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b>IRM % Hifas</b>					
Modelo	8	20.729	2.591	58.55	<.0001
Error	27	1.195	0.044		
Total	35	21.924			
R cuadrada	0.954				
<b>IRM % Arbúsculos</b>					
Modelo	8	63.479	7.934	34.84	<.0001
Error	27	6.149	0.227		
Total	35	69.628			
R cuadrada	0.944				
<b>IRM % Vesículas</b>					
Modelo	8	48.562	6.070	63.20	<.0001
Error	27	2.593	0.096		
Total	35	51.156			
R cuadrada	0.949				
<b>IRM % Esporas intrarradicales</b>					
Modelo	8	31.256	3.907	78.53	<.0001
Error	27	1.343	0.049		
Total	35	32.600			
R cuadrada	0.958				
<b>IAM</b>					
Modelo	8	35.605	4.450	145.03	<.0001
Error	27	0.828	0.030		
Total	35	36.433			
R cuadrada	0.977				

Cuadro 7. Análisis de varianza de número de esporas por especies.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b><i>Rhizophagus fasciculatus</i></b>					
Modelo	8	3130722.222	391340.278	5.68	0.0003
Error	27	1861600.000	68948.148		
Total	35	4992322.222			
R cuadrada	0.627				
<b><i>Rhizophagus clarus</i></b>					
Modelo	8	1850.000	231.250	0.94	0.4991
Error	27	6625.000	245.370		
Total	35	8475.000			
R cuadrada	0.218				
<b><i>Rhizophagus intrarradices</i></b>					
Modelo	8	1440655.556	180081.944	6.93	<.0001
Error	27	701175.000	25969.444		
Total	35	2141830.556			
R cuadrada	0.672				
<b><i>Funeliformis mosse</i></b>					
Modelo	8	138.888	17.361	1.10	0.3918
Error	27	425.000	15.740		
Total	35	563.888			
R cuadrada	0.246				
<b><i>Funneliformis aff. geosporum</i></b>					
Modelo	8	23955.555	2994.444	2.47	0.0373
Error	27	32675.000	1210.185		
Total	35	56630.555			
R cuadrada	0.423				
<b><i>Diversispora eburnea</i></b>					
Modelo	8	212988.000	26623.500	0.92	0.5183
Error	27	784520.750	29056.324		
Total	35	997508.750			
R cuadrada	0.213				
<b><i>Diversispora sp.</i></b>					
Modelo	8	1917788.000	239723.500	1.70	0.1447
Error	27	3812670.750	141210.028		

Total	35	5730458.750			
R cuadrada	0.334				
<b><i>Diversispora aff. gerdemannii</i></b>					
Modelo	8	2305.555	288.194	1.41	0.2379
Error	27	5525.000	204.629		
Total	35	7830.555			
R cuadrada	0.294				
<b><i>Claroideoglosum lamellosum</i></b>					
Modelo	8	7150.888	893.861	1.38	0.2485
Error	27	17458.000	646.592		
Total	35	24608.888			
R cuadrada	0.290				

Cuadro 8. Análisis de varianza de índice de toxicidad por especies.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
<b><i>IRE Rhizophagus fasciculatus</i></b>					
Modelo	8	2.445	0.305	6.88	0.0003
Error	18	0.799	0.044		
Total	26	3.245			
R cuadrada	0.75				
<b><i>IRE Rhizophagus clarus</i></b>					
Modelo	8	3.142	0.392	2.32	0.0663
Error	18	3.053	0.169		
Total	26	6.196			
R cuadrada	0.507				
<b><i>IRE Rhizophagus intraradices</i></b>					
Modelo	8	2.607	0.325	8.77	<.0001
Error	18	0.669	0.037		
Total	26	3.276			
R cuadrada	0.795				
<b><i>IRE Funneliformis aff. geosporum</i></b>					
Modelo	8	3.719	0.464	3.77	0.0092
Error	18	2.219	0.123		
Total	26	5.938			

---

R cuadrada	0.626				
<b>IRE Diversispora eburnea</b>					
Modelo	8	3.142	0.392	2.32	0.0663
Error	18	3.053	0.169		
Total	26	6.196			
R cuadrada	0.507				
<b>IRE Diversispora sp.</b>					
Modelo	8	64.144	8.018	6.72	0.0004
Error	18	21.485	1.193		
Total	26	85.629			
R cuadrada	0.749				
<b>IRE aff. gerdemannii</b>					
Modelo	8	3.521	0.440	4.56	0.0036
Error	18	1.737	0.096		
Total	26	5.259			
R cuadrada	0.669				
<b>IRE Claroideoglomerus lamellosum</b>					
Modelo	8	7.092	0.886	2.79	0.0338
Error	18	5.726	0.318		
Total	26	12.819			
R cuadrada	0.553				
<b>IAE</b>					
Modelo	8	6.335	0.791	20.39	<.0001
Error	18	0.699	0.038		
Total	26	7.034			
R cuadrada	0.900				

---

## CAPITULO X

### LITERATURA CITADA

- Alcántar, G., B. J. D. Etchevers y S. A. Aguilar. 1992. Los análisis físicos y químicos: su aplicación en Agronomía. Centro de Edafología, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. pp. 108-125.
- Alarcon, A., M. C. González-Chávez, y R. Ferrera-Cerrato. 2007. Aspectos ecológicos y aplicación de hongos micorrícicos arbusculares en agro sistemas. *In*: Fuentes-Dávila, G., Ferrera-Cerrato, R. (eds.). Ecología de la raíz. 2a ed. Sociedad Mexicana de Patología. Obregón, Sonora, México. 153 p.
- Aranda, E., J.M. Scervino, P. Godoy, R. Reina, J. A. Ocampo, R. Wittich and I. García-Romera. 2013. Role of arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus custos* in the dissipation of PAHs under root-organ culture conditions. *Environ. Pollut.* 181:182-189.
- 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 Ciencias Agralimentarias del Trópico. Colegio de Postgraduados Campus Tabasco, H. Cárdenas, Tabasco, México. 149 p.
- Arias, T. A., M.C. Rivera-Cruz, L.A. Aceves-Navarro y R. Quintero-Lizaola. 2012. Pasto japonesa (*Leersia sp.*) como especie fitorremediadora en suelos

contaminados con petróleo fresco e intemperizado. *In: Memoria del XXXVII. Congreso Nacional de la Ciencia del Suelo. 11-16 de noviembre. Zacatecas, Zacatecas, México. pp. 55-62.*

Armstrong, B., E. Hutchinson, J. Unwin, and T. Fletcher. 2004. Lung Cancer Risk after Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: A Review and Meta-Analysis. *Environ. Health Perspect.* 112:970-978.

Armstrong, K. B. y P. Boffetta. 1998. Cáncer de origen ambiental. *In: Stellman J. M. y M. McCann (eds.). Enciclopedia de Salud y Seguridad en el Trabajo. 3a ed. Organización Internacional del Trabajo. Ministerio de Trabajo y Asuntos Sociales-Subdirección General de Publicaciones. Madrid España. 1052 p.*

April W., and C.R. Sims. 1990. Evaluation of the use of prairies grasses for stimulating polycyclic aromatic hydrocarbon treatment in soil. *Chemosphere.* 20:253-275.

Atlas, M.R., A. Horowitz, M. Krichevsky, and K. A. Bej. 1991. Response of microbial population to Environmental disturbance. *Microbial. Ecol.* 22:249-256.

Atlas, M. R., y R. Bartha. 2002. *Ecología microbiana y microbiología ambiental.* 4a ed. Addison Wesley (Ed.). Madrid, España. 677 p.

Basumatary, B., S. Bordoloi and H. Prasad S. 2012. Crude Oil-Contaminated Soil Phytoremediation by Using *Cyperus brevifolius* (Rottb.) Hassk. *Water Air Soil Pollu.* 223:3373-3383.

- Blaszkowski, J. 2015. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota), endogone and complexipes Species deposited in the Department of Plant Pathology, University of Agriculture in Szczecin, Poland. <http://www.zor.zut.edu.pl/Glomeromycota/index.html>. Consultada en Mayo 2015.
- Besalatpour, A., A.H. Khoshgoftarmanesh, M.A. Hajabbasi and M. Afyuni. 2008. Germination and growth of selected plants in a petroleum contaminated calcareous soil. *Soil & Sedim. Contam.* 17:665-676.
- Bosetti, C., P. Bofetta, and C. La Vecchia. 2007. Occupational exposures to polycyclic aromatic hydrocarbons, and respiratory and urinary tract cancers: a quantitative review to 2005. *Ann Oncol.* 8:431-436.
- Botello, A.V., J. Rendón von Osten, G. Gold-Bouchot and C. Agraz-Hernández. 2005. Golfo de México, Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. 2a ed. Universidad Autónoma de Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. 696 p.
- Botello, A.V., 2005. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. *In:* A. V. Botello, J. Rendón-von Osten, G. Gold-Bouchot y C. Agraz-Hernández (eds.). Golfo de México Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias, 2a ed. Universidad Autónoma De Campeche, Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto Nacional de Ecología. Campeche, México. 696 p.

- Brady, C.N., and R. R. Well. 2008. The Nature and Properties of Soil. Pearson Prentice Hall (Ed). Upper Saddle River, New Jersey Columbus, Ohio USA. 975 p.
- Cabello, M.N. 1997. Hydrocarbon pollution: its effect on native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF). FEMS Microbiol. Ecol. 22:233-236.
- CABI. 2015. (Centre for Agricultural Bioscience International). *Leersia hexandra* (southern cut grass) <http://www.cabi.org/isc/datasheet/30391>. Consultado en Junio 2015.
- Calonne, M., J. Fontaine, B. Tisserant, H. Dupré, A. Grandmougin-ferjani, S. Declerck and A. Lournés-Hadj. 2014. Polyaromatic hydrocarbons impair phosphorus transport by the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus irregularis*. Chemosphere. 104:97-104.
- Carpio, L.A., F.T. Davies and A. Arnold A. 2005. Arbuscular mycorrhizal fungi, organic and inorganic controlled release fertilizers - effect on growth and leachate of container-grown bush morning glory (*Ipomea carnea* subsp. *fistulosa*) under high production temperatures. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 130:131-139.
- Camarena-Gutiérrez, G. 2012. Interacción planta-hongos micorrícicos arbusculares. Rev. Chap. Serie Cien. Forest. Amb. 18:409-422.
- Chaudhry, Q., M. Blom-Zandstra, S. Gupta and E.J. Joner. 2005. Utilizing the synergy between plants and rhizosphere microorganisms to enhance

breakdown of organic pollutants in the environment. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* 12:34-48.

Chaîneau, C.H., C. Yepremian, J.F. Vidalie, J. Ducreux, D. Ballerini. 2003. Bioremediation of a crude oil-polluted soil: biodegradation, leaching and toxicity assessments. *Water Air Soil Pollut.* 144:419-440.

Cheung, K.C., J.Y. Zhang, H.H. Deng, Y.K. Ou, H.M. Leung and S.C. Wu. 2008. Interaction of higher plant (jute), electrofused bacteria and mycorrhiza on anthracene biodegradation. *Biores. Techno.* 99:2148-2155.

Cuevas-Díaz, M., G. Espinoza-Reyes, C. Ilizaliturri-Hernández y A. Mendoza-Cantú. 2012. Métodos ecotoxicológicos para la evaluación de suelos contaminados con hidrocarburos. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), Instituto Nacional de Ecología (INE), Universidad Veracruzana, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT). D.F., México. 136 p.

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

Daniels, B. A. and H. D. Skipper. 1982. Methods for the recovery and quantitative estimation of propagules from soil. *In*: N. C. Schenck (ed.). *Methods and Principles of Mycorrhizal Research*. The American Phytopathological Society. Publ., St. Paul, MN, USA pp. 29-36.

- Dawson, J.J.C., E.J. Godsiffe, I.P. Thompson, T.K. Ralebitso-Senior, K.S. Killham and G.I. Paton. 2007. Application of biological indicators to assess recovery of hydrocarbon impacted soils. *Soil Biol. Biochem.* 39:164-177.
- Debiane, D., G. Garçon, A. Verdin, J. Fontaine, R. Durand, A. Grandmougin-Ferjani, P. Shirali and A. Lounés-Hadj. 2008. In vitro evaluation of the oxidative stress and genotoxic potentials of anthracene on mycorrhizal chicory roots. *Eviron. Exp. Bot.* 64:120-127.
- Debiane, D., G. Garçon, A. Verdin, J. Fontaine, R. Durand, P. Shirali, A. Grandmougin-Ferjani and A. Lounès-Hadj S. 2009. Mycorrhization alleviates benzo[a]pyrene-induced oxidative stress in an in vitro chicory root model. *Phytochemistry* 70:1421–1427.
- Debiane, D., M. Calonne, J. Fontaine, F. Laruelle, A. Grandmougin-Ferjani and A. Loune-hadj. 2011. Lipid content disturbance in the arbuscular mycorrhizal, *Glomus irregulare* grown in monoxenic conditions under PAHs pollution. *Fun. Bio.* 115:782-792.
- De la Cruz, L. A. 2013. La micorriza arbuscular del pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitytchc] en suelo con petróleo y peróxido de hidrogeno. Tesis para obtener el grado de Licenciado Químico Fármaco Biólogo, Universidad Popular de la Chontalpa, H. Cárdenas, Tabasco. 75 p.
- Delgado J.G. 2006. Asfaltenos. Composición, agregación, precipitación. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos. Versión 1.

Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Mérida, Venezuela. 36 p.

Dorn, B. P., E. T. Vipond, P.J. Salanitro, and L.H. Wisniewski. 1998. Assessment of the acute toxicity of crude oils in soils using earthworms, microtox, and plants. *Chemosphere* 37:845-860.

DWAF (Department of Water Affairs and Forestry) 2008. A practical field procedure for identification and delineation of wetlands and riparian áreas. Republic of South Africa. 49 p.

Eaton, L. D. and D. Klaassen C. 2005. Capítulo 2. Principios de toxicidad. *In*: Klassen, D. C. y B.J. Whatkins. (eds.). Casarett y Doull Fundamentos de toxicología. Mc Graw-Hill Interamericana (Ed). Madrid, España. 560 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. 40 p.

Escaso-Santos F., J. Martínez-Guitarte L., y M. Planello-Carro R. 2010. Fundamentos básicos de fisiología animal y vegetal. UNED Pearson (Ed.). Madrid, España. 264 p.

Faustman, M. E. and S. Omenn G. 2005. Capítulo 4. Evaluación de riesgo. *In*: Klassen, D. C., y B.J. Whatkins, (eds.). Casarett y Doull Fundamentos de toxicología. Mc Graw-Hill Interamericana (Ed.). Madrid, España. 560 p.

- Franco-Ramírez, A., R. Ferrera-Cerrato, L. Varela-Fregoso, J. Pérez-Moreno and A. Alarcón. 2007. Arbuscular mycorrhizal fungi in chronically Petroleum contaminated soils in México and the effects of Petroleum hydrocarbons on spore germination. *J. Bas. Microbiol.* 47:378-383.
- García, E., R. Ferrera-Cerrato, J. Almaras J. and R. Rodríguez-Vasquez. 2000. Colonización micorrícica arbuscular en gramíneas creciendo en un suelo contaminado con hidrocarburo. *In: Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. (eds.). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza Arbuscular. IRENAT-Colegio de Posgraduados, Montecillo, Mundi Prensa (Ed.). D.F. México 251 p.*
- García, E., R. Ferrera, J. J. Almaráz, R. Rodríguez y E. García. 2013. Biodegradación de queroseno en la rizosfera de gramíneas en condiciones de invernadero. *Agron. Costarric.* 37:125-134.
- Gerdemann, J. W. and T.H. Nicholson. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Trans Br. Mycol. Soc.* 46:235-244.
- Giri, B., P. Houn, R. Kumari, R. Prasad, M. Sachdev, A. Garg, R. Oelmüller and A. Varma. 2005. Mycorrhizosphere: Strategies and functions. *In: Buscot, f., Varma, a. (eds.). Soil Biology. Microorganisms in soil: Roles in genesis and funtions. Springer (Ed.). Berlin, Alemania. 426 p.*
- Gould, F.W y R.B. Shaw. 1992. Gramíneas. Clasificación Sistemática. A. Cuevas R. (trad.). AGT Editor, S.A (Ed). D.F, México. 381p.

- Gobat, J.M., M. Aaragno and W. Matthey. 2003. The living soil. Fundamentals of soil science and soil Biology. Science publishers, Inc (Ed.) New Hampshire, USA. 603 p.
- Google Maps. 2015. Map Data© 2015, INEGI, Imagery © 2015 Cnes/Spot Image, Digital Globe, Landsat. [https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es-419&authuser=0&mid=zPe-4ReK0zcs.k\\_ccRN0IYv6Q](https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es-419&authuser=0&mid=zPe-4ReK0zcs.k_ccRN0IYv6Q). Consultado en junio 2015.
- Google Maps. 2015. Map Data© 2015, INEGI, Imagery © 2015, Terra Metrics. [https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es-419&authuser=0&mid=zPe-4ReK0zcs.k\\_ccRN0IYv6Q](https://www.google.com/maps/d/edit?hl=es-419&authuser=0&mid=zPe-4ReK0zcs.k_ccRN0IYv6Q). Consultado en junio 2015.
- Groenzin, H. and O.C. Mullins. 1999. Asphaltene molecular size and structure. J. Phys. Chem. 103:11237-11245.
- Guerra-Sierra, B.E. 2007. Micorriza arbuscular. Recurso en la agricultura sostenible. Tecno. Marcha. 21:191-201.
- Heinemann J. 1994. Upgrading Petroleum Residues and Heavy Oils. Marcel Dekker, INC (Ed). New York, USA. pp. 22-39.
- Hernández-Acosta, E., R. Ferrera-Cerrato, L. Fernández-Linares, y R. Rodríguez-Vásquez. 2000. Ocurrencia de la micorriza arbuscular y bacterias fijadoras de N atmosférico en suelo contaminado por hidrocarburos. *In*: Alarcón A., Ferrera-Cerrato R. (eds). Ecología, Fisiología y Biotecnología de la micorriza Arbuscular. IRENAT-Colegio de Posgraduados, Montecillo, Mundi Prensa (Ed.) DF, México 251 p.

- Hernández-Valencia, y I., Mager, D. 2003. Uso de *Panicum maximum* y *Brachiaria brizantha* para fitorremediar suelos contaminados con un crudo de petróleo liviano. *Bioagro* 15:149-155.
- Hopkins, G.W., and P. A. Hüner N. 2008. Introduction to plant physiology. 4th ed. John Wiley & Sons, Inc (Ed). Hoboken, USA. 560 p.
- Howe-Grant, M. 1996. Petroleum. Encyclopedia of chemical technology 4th ed. Wiley Interscience Publication (Ed). New York, USA. pp. 342-480.
- Huesemann H.M. 1994. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarboncontaminated soils. *J. Soil Contam.* 3:299-318.
- INVAM (International Culture Collection of Arbuscular & Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi). 2015. West Virginia University. <http://invam.wvu.edu>. Consultado en mayo de 2015.
- Jaramillo-Juárez, F., R. Cerda-González y M. Rodríguez-Vásquez. 2009. Capítulo 1. Fundamentos de toxicología ambiental. *In*: F. Jaramillo-Juárez, A.R. Rincón-Sánchez, A., R. Rico-Martínez (eds). Toxicología ambiental. Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, Mexico. 397p.
- Kisic, I., S. Mesic, F. Basic, V. Brkic, M. Mesic, G. Dum, Z. Zgorelec and L. Bertovic. 2009. The effect of drilling fluids and crude oil on some chemical characteristics of soil and crops. *Geoderma* 149:209-216.
- Kirk, J.L., P. Moutoglis, J. Klironomos, H. Lee and J. T. Trevors. 2005. Toxicity of diesel fuel to germination, growth and colonization of *Glomus intraradices* in soil and in vitro transformed carrot root cultures. *Plant Soil* 270:23-30.

- Labud, V., C. García y T. Hernandez. 2007. Effect of hydrocarbons pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere* 66:1863-1871.
- Lafitte H.R. 2001. Estreses abióticos que afectan al maíz; *In*: Paliwal, RL., G. Granados, H.R. Latiffe, A.D. Violic y J.P. Marathée (eds). El maíz en los trópicos mejoramiento y producción. FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) Roma, Italia. 392 p.
- Leahy J.G. and Colwell R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbial. Rev.* 54:305-315
- Liao, J.P., X.G. Lin, Z.H. Cao, Y.Q. Shi and M.H. Wong. 2003. Interactions between arbuscular mycorrhizae and heavy metals under sand culture experiment, *Chemosphere*. 50:847-853
- Lichtenthaler H. K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* 148:4-14.
- Liu, A. and Y. Dalpé. 2009. "Reduction in Soil Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Arbuscular Mycorrhizal Leek Plants". *Inter. Jour. Phyto.* 11:39-52.
- Liu, H., D. Weisman D, Y. Ye, B. Cui, Y. Huang, A. Colón-Carmona and Z. Wang. 2009. An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci.* 176: 375-382.
- López-Ortiz, C., R. Ferrera-Cerrato, R., A. Alarcon, J. Almaraz J., E. Martinez-romero y M. Mendoza-López R. 2012. Establecimiento y respuesta de la

simbiosis *Rhizobium tropici*-*Leucaena leucocephala* en presencia de Fenatreno y naftaleno. Rev. Int. Cont. Amb. 28:333-342.

López, PD. 2013. Estudios de hongos rizosféricos en suelos contaminados con petróleo intemperizado en el campo petrolero La Venta, Tabasco. Tesis de Licenciatura Químico Fármaco Biólogo. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco. México. 63 p.

Madigan, T. M., M. Martinko J., V. Dunlap P. y P. Clarck, D. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. Pearson Addison Wesley (Ed). Madrid, España. 1296 p.

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

Maldonado, E. 2006. El uso de pasto Egipto *Brachiaria mutica* (Forsskal) Staff. Y la leguminosa guaje *Leucaena leucocephala* Lam. en la toxicidad y biodegradación de petróleo crudo nuevo e intemperizado en suelo. Tesis de Maestría en Ciencias Agralimentarias del Trópico. Colegio de Postgraduados. Campus Tabasco, H. Cárdenas, Tabasco, México. 184 p.

Marroquín S.G.J. 2007. Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis de Doctor en Tecnología Avanzada.

Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. D.F. México. 129 p.

Mastandrea, C., C. Chichizola, B. Ludeña, H. Sánchez, H. Álvarez y A. Gutiérrez. 2005. Hidrocarburos aromáticos policíclicos. Riesgos para la salud y marcadores biológicos. Act. Bioquím. Clín. Latin. 39:27-36.

Merkl, N., R. Schultze-Kraft and C. Infante. 2005. Assessment of tropical grasses and legumes for phytoremediation of petroleum-contaminated soils. Water Air Soil Pollut. 165:235-242.

Merkl, 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. Microbiol. Res. 161:80-91.

Meudec, A., N. Poupart, J. Dussauze and E. Deslandes. 2007. Relationship between heavy fuel oil phytotoxicity and polycyclic aromatic hydrocarbon Contamination in *Salicornia Fragilis*. Scienc. Envirom. 381:146-156.

Mezzari, M. P., D. M. Hoffmann Z., H. X. Corseuil and A. Verzani N. 2011. Potential of grasses and rhizosphere bacteria for bioremediation of diesel-contaminated soils. R. Bras. Ci. Solo. 35:2227-2236.

Muñoz-Castellanos, L., G. Nevárez-Moorillón, M. Ballinas-Casarrubias y M. Peralta-Pérez. 2010. Fitorremediación como una alternativa para el tratamiento de suelos contaminados. Rev. Int. Cien. Tec. Bio. 1:1-9.

- Nardini, C., L. Di Salvo y I. García. 2011. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. *Rev. Arg. Microbiol.* 43:311-312.
- Navarro, B.S. y G.G. Navarro. 2003. Química agrícola: El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. 2a. ed. Mundi-Prensa (Ed.). DF. México. 487 p.
- Nwoko, C.O. 2014. Effect of Arbuscular Mycorrhizal (AM) Fungi on the Physiological Performance of *Phaseolus vulgaris* Grown under Crude Oil Contaminated Soil. *J. Geosc. Environ. Protec.* 2:9-14.
- Olguín E. J., M. E. Hernández y G. Sánchez-Galván. 2007. Contaminación de manglares por hidrocarburos y estrategias de biorremediación, fitorremediación y restauración. *Rev. Int. Con. Amb.* 23:139-154.
- Olsen S.R., and L.E. Sommers. 1982. Phosphorus. *In*: A.L. Page, R.H. Miller and D.R. Keeny (eds.) *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties.* 2a ed. ASA/SSSA. Madison (Ed.). WI, USA. p. 403-430.
- Ortas, I. 2015. Comparative analyses of Turkey agricultural soils: Potential communities of indigenous and exotic mycorrhiza species effect on maize (*Zea mays* L.) growth and nutrient uptakes. *Euro. Jour. Soil Biol.* 69:79-87.
- 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.

Page A.L., R.H. Miller, D.R. Keeney. 1992. Nitrogen total. *In*: Page A.L., R.H. Miller and D.R. Keeney (eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2. Chemical and Microbiological Properties*. 2a ed. ASA. SSSA. Madison (Ed.). WI, USA. p. 595-629

Peña, C. E., D. Carter E. y F. Ayala-Fierro. 2001. *Toxicología Ambiental: Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental*. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>. 200 p. Consultado en julio de 2015.

Pérez-Hernández, I., S. Ochoa-Gaona, R.H. Adams Schroeder, M.C. Rivera-Cruz and V. Geissen. 2013. Tolerance of Four Tropical Tree Species to Heavy Petroleum Contamination. *Water Air Soil Pollut.* 224:1637.

Pilon-Smits, E. 2005. Phytoremediation. *Annu. Rev. Plant Biolog.* 56:15-39.

Pinton, R., Z. Varanini and P. Nannipieri. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. *In*: Pinton, R., Varini, Z., Nannipieri, P. (eds). *The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface*. Marcel Dekker (Ed.). New York, USA. 424 p.

- Phillips, J.M. and D.S. Hayman. 1970. Improved procedures of clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 55:158-161.
- Pinton, R., Z. Varanini and P. Nannipieri. 2001. The rhizosphere as a site of biochemical interactions among soil components, plants and microorganisms. *In: Pinton, R., Varini, Z., Nannipieri, P. (eds). The rhizosphere biochemistry and organic substances at the soil-plant interface.* Marcel Dekker (Ed). New York, USA. 424 p.
- Porta A, N. Filliat and N. Plata. 1999. Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. *In: Leeson, A. and B.C. Alleman (eds.). Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications.* Battelle Columbus (Ed.). Ohio, USA. pp. 51-56.
- Porta, J., M. López-Acevedo y C. Roquero. 2003. *Edafología para la agricultura y el medio ambiente.* 3a ed. Ediciones Mundi-Prensa (Ed). Madrid, España. 960 p.
- Pothuluri V.J., and E.C. Cerniglia. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *In: R.G. Chaudhry (ed.). Biological degradation and bioremediation of toxic chemicals.* Dioscorides Press. Department of Biological Sciences Oakland University. Portland, Oregon. pp. 92-123.
- Pyrah, G.L. 1969. Taxonomic y los estudios de distribución en *Leersia* (Gramineae). *Iowa Stat. Jour. Scien.* 44:215-270.

- Quiñones-Aguilar, E., R. Ferrera-Cerrato, F. Gavi-Reyes, LF. Linares, R. Rodríguez-Vázquez y A. Alarcón. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37:585-594.
- Ramírez-García. 2013. La plántula de *Zea mays* L. (Criollo mején híbrido DK-67) indicadora de toxicidad del petróleo crudo fresco. Tesis de Licenciatura en Químico Fármaco Biólogo. Universidad Popular de la Chontalpa, Cárdenas, Edo. De Tabasco. 97 p.
- Ramírez-Gómez, M. y A. Rodríguez-Villate. 2011. Señales de reconocimiento entre plantas y hongos formadores de micorrizas arbusculares. *Corpoica Cienc. Tec. Agro.* 11:53-60.
- Redecker, D., A. Schüßler, H. Stockinger, S. Stürmer, J. Morton, and C. Walker. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* doi:10.1007/s00572-013-0486-y.
- Repetto, J. M. y G. Repetto K. 2009. *Toxicología fundamental*. 4a ed. Ediciones Díaz Santos(Ed). Sevilla, España. 567 p.
- Reyes-Jaramillo, I. 2011. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica del suelo. *ContactoS.* 81:17-23.
- Rivera-Cruz, M. del C. 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.] y Cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el Benzo(a)pireno.

Tesis de Doctorado en Ciencias. Colegio de Postgraduados campus Montecillo, Texcoco, Edo. De México. 348 p.

Rivera-Cruz, M.C. 2011. Flora y microflora rizosférica del pantano: indicadoras de perturbación causada por petróleo e inundación. *Agroregion* 5:12-15.

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

Rivera-Cruz, M. C., R. Ferrera-Cerrato, V. Volker H., R. Rodríguez V. y L. Fernández L. 2002. Adaptación y selección de microorganismos autóctonos en medios de cultivos enriquecidos con petróleo crudo. *Terra Latin*. 20:423-434.

Rivera-Cruz, M.C., R. Ferrera-Cerrato, P. Sánchez-García, V. Volke-Haller, L. Fernández-Linares y R. Rodríguez-Vázquez. 2003. 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. y A. Trujillo-Narcía. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29:369-376.

Rivera-Cruz M.C., A. Trujillo-Narcia and A. Maldonado Ch. 2012. Effects of crude oil on the growth of brachiaria mutica and leucaena leucocephala and on soil and plant Macronutrients. *Trop. Subtrop. Agroeco*.15 SUP 2:S30-S39.

- Salanitro, J.P., P.B. Dorn, H.M. Huesemann, K.O. Moore, I.A. Rhodes and L.M. Rice-Jackson, M.M. 1997. Crude oil hydrocarbon bioremediation and soil ecotoxicity assessment. *Environ. Scienc.Techno.* 31:1769-1776.
- Sangrabiél, 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. Cont. Amb.* 22:63-73.
- Schüßler, A. 2015. Glomeromycota Phylogeny. Disponible en: <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>. Consultado en mayo de 2015.
- Schüßler, A., D. Schwarzotti, and C. Walker. 2001. A new phylum, the Glomeromycota: phylogeny and evolution. *Mycological Research* 105:1413-1421. <http://schuessler.userweb.mwn.de/amphylo/>. Consultado en mayo de 2015.
- Schüßler, A. and C. Walker. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, England. 56 p. [www.amphylogeny.com](http://www.amphylogeny.com). Consultado en mayo de 2015.
- Shirdam, R., D.A. Zand, B.G. Nabi and N. Mehrdadi. 2008. Phytoremediation of hydrocarbon-contaminated soils with emphasis on the effect of petroleum hydrocarbons on the growth of plant species. *Phytoprot.* 89:21-29.
- STDF (Sistema de toma de decisiones para la selección de especies forrajeras). 2015. Ficha técnica Lamedora, Lambe lambe. Corporación Colombiana

de Investigación Agropecuaria (CORPOICA)

<http://stdf.sistencial.com/Especie/Details/54>. Consultado en junio de 2015. Consultado en junio 2015.

Stover H.J., R.G. Thorna, J.M. Bowlesa, M.A. Bernardsa and C.R. Jacobsb. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi and vascular plant species abundance and community structure in tallgrass prairies with varying agricultural disturbance histories. *App. Soil Ecol.* 60:61-70.

SEMARNAT (Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales). 1996. Los suelos de Tabasco. Restauración, conservación y uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco, México. 231 p.

Tadeo, R.F. 2000. Fisiología de las plantas y el estrés. *In: Azcon-Bieto, J. y M. Talon, (eds). Fundamentos de fisiología vegetal. McGraw-Hill Interamericana (Ed.). Madrid, España. 651 p.*

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

Tang, J., M. Whang, F. Whang, Q. Sun and Q. Zhou. 2010. Eco-toxicity of Petroleum hydrocarbon contaminated soil. *Jour. Envirom. Scien.* 23:845-851.

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

- Vargas G.P.A., R.R. Cuellar y J. Dussan. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. Hipótesis. Apun. Cien. Unian. 4:4-49.
- Vázquez-Luna D., M. Castelán-Estrada, M.C. Rivera-Cruz, A.I. Ortiz-Ceballos, y R.F. Izquierdo. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. Interciencia 26:183-191.
- Verma, N., J. Chandra T., K. Kant S. and J. Panwar. 2008. Arbuscular Mycorrhizal (AM) Diversity in *Prosopis cineraria* (L.) Druce Under Arid Agroecosystems. Agr. Sci. China 7:754-761.
- Villegas-Vasquez, I. 2011. Respuestas de *Leucaena leucocephala* en simbiosis con *Rhizobium* y/o micorriza en diferentes etapas de desarrollo durante la fitorremediación de fenantreno. Tesis de Maestría en Ciencias en Recursos Genéticos y Productividad Fisiológica Vegetal. Colegio de postgraduados campus Montecillo, montecillo, Texcoco, Edo. Mexico. 117 p.
- Volante, A., G. Lingua, P. Cesaro, A. Cresta, M. Puppo, L. Ariati and G. Berta. 2005. Influence of three species of arbuscular mycorrhizal fungi on the persistence of aromatic hydrocarbons in contaminated substrates. Mycorrhiza 16:43-50.
- Walkley, A. and I.A. Black. 1934. An examinant ion of Degtjareff method for determining soil organic matter and a pro-posed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37:29-38.

- Walton, B.T. and A. T. Anderson. 1990. Microbial degradation of trichloroethylene in the rhizosphere: potential application to biological remediation of waste sites. *Appli. Environ. Microbiol.* 56:1012-1016.
- Walton, B.T., M.A. Hoylman, M.M. Perez, A.T. Anderson, R.T. Jonson, A.E. Guthrie, and F.R. Christman. 1994. Rhizosphere Microbial Communities as a Plant Defense Against Toxic Substances in Soils. *In: A.T. Anderson and, R.J. Coats (eds). Bioremediation through Rhizosphere Tecnology.* American Chemical Society. Washington, D.C, USA. pp. 82-92.
- WHO (World Health Organization). 1998. International Programme on Chemical Safety (IPCS): Environmental Criteria 202. Selected non-heterocyclic PAHs. Geneva. Suiza p. 376.
- Yarranton, H.W., H. Alboudwarej and R. Jakher. 2000. Investigation of asphaltene association whith vapor pressure osmometry and interfacial tensión measurement. *Ind. Eng. Chem. Res.* 39:2916-2924.
- Zavala-Cruz, J., F. Gavi-Reyes, R.H. Adams-Schroeder, R. Ferrera-Cerrato, D.J. Palma-López, H.Vaquera-Huerta, y M.J. Domínguez-Ezquivel. 2005. Derrames de petróleo en suelos y adaptación de pastos tropicales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco, México. *Terra Latino.* 23: 293-302.