



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO DE PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL
TRÓPICO

FITORREMEDIACIÓN DE UN SUELO CONTAMINADO CON PETRÓLEO USANDO LA ACTIVIDAD MICROBIANA DE *Jatropha curcas* L. EN TABASCO, MÉXICO.

MARY CRUZ LÓPEZ JIMENEZ

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

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO, MÉXICO

2023



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

La presente tesis titulada: “**Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo usando la actividad microbiana de *Jatropha curcas* L. en Tabasco, México**” realizada por la estudiante: “**Mary Cruz López Jiménez**” bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS
PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

Dra. María del Carmen Rivera Cruz

ASESORA

Dra. Rocío Guadalupe Acosta Pech

ASESOR

Dr. Jorge Martínez Herrera

H. Cárdenas, Tabasco, México, 07 de febrero de 2023

Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo usando la actividad microbiana de *Jatropha curcas* L. en Tabasco, México

Mary Cruz López Jiménez
Colegio de Postgraduados, 2023

RESUMEN

Palabras clave: Piñón, hongo micorrízico arbuscular, fase de adaptación, índice de toxicidad y bacterias hidrocarbonoclasticas.

En México y el mundo la degradación de suelos por la contaminación con petróleo crudo (PC) es un problema que afecta la dinámica de los sistemas de producción agrícola. Se requiere estudiar plantas bioenergéticas como *J. curcas* y su estado de la asociación simbiótica microbiana que sobrevivan al estrés ambiental, para generar tecnologías de fitorremediación. Este estudio se realizó por 27 semanas en micro-túnel con el objetivo de generar información básica de cinética de crecimiento, índices de toxicidad relativos (ITR) y recuperación biológica de suelos contaminados con PC. Se estableció un diseño experimental completamente al azar con arreglo unifactorial en suelo arcilloso del trópico mexicano. Siete dosis de PC (0,4,14,27,42,56 y 75) se evaluaron y se cuantificó su efecto en las variables: altura de la planta (AP), número de hojas totales (NHT) y diámetro basal (DB). En la semana 27 se evaluó el impacto de los tratamientos en AP, DB, área foliar (AF), número de raíces (NR), longitud de raíz (LR), materia seca aérea (MSA), población de bacterias heterótrofas (BH), actinomicetos (ACT), hongos heterótrofos (HH), estructura intraradical del hongo micorrízico arbuscular (HMA) y remoción de hidrocarburos totales del petróleo (RHTP). La cinética de crecimiento de *J. curcas* se modificó durante las 27 semanas de exposición para AP, NHT y DB, con fase lag prolongado lineal por tiempos cortos y fase de senescencia precoz. En la semana 27 el índice de toxicidad (IT) fue negativo (≤ 1) para AP, NHT, MSR y MSA; positivo (≥ 1) para DB, AH, NR y LR. Los índices de totales para variables de crecimiento y producción fueron negativos. En general, el PC estimula el crecimiento de BH, HH, ACT y HT y colonización total de HMA. sobresale la relación positiva altamente significativa del HMA con RHTP. *J. curcas* estimula un 54.8% la remoción de hidrocarburos totales del petróleo en suelo con 4g/kg de PC. Se recomienda el uso de *J. curcas* por su potencial para indicar toxicidad y fitorremediar PC de Gleysol del estado de Tabasco.

Phytoremediation of oil contaminated soil using the activity *Jatropha curcas* L. microbiology in Tabasco, Mexico

Mary Cruz Lopez Jimenez
Postgraduate College, 2023

ABSTRACT

Key words: Pinion, arbuscular mycorrhizal fungus, lag phase, toxicity index, hydrocarbonoclastic bacteria.

In Mexico and the world, soil degradation due to contamination with crude oil (CO) is a problem that affects the dynamics of agricultural production systems. I know requires studying bioenergetic plants such as *Jatropha curcas* and their association status microbial symbiotic that survive environmental stress, to generate technologies of phytoremediation. This study was carried out for 27 weeks in a micro-tunnel with the aim of generate basic information on growth kinetics, relative toxicity index (RTI) and biological recovery of soils contaminated with OC. A design was established completely randomized experimental with unifactorial arrangement in Gleysol del tropic Mexican. Seven CO dose (0, 4, 14, 29, 42, 56 and 75 g/kg). In seven treatments with repeated measures over time (27 weeks) plant height was evaluated (PH), number of total leaves (NTL), basal diameter (BD), curves of growth of *J. curcas*. At week 27 in the seven treatments, area leaf (AL), number of roots (NR), root length (RL), root dry matter (RDM), aerial dry matter (ADM), population of heterotrophic bacteria (BH), actinomycetes (ACT), fungi heterotrophs (HF), intraradical structures of the arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) and removal of total hydrocarbons from petroleum (RTHP). The growth kinetics of *J. curcas* was modified during the 27 weeks, exposed to CO for PH, NTL and BD; with prolonged lag phase, linear for short times and phase of early senescence. A week 27 PH, NTL, RDM and ADM samples $RTI \leq 1$ (negative response), but DB, AL, NR and LR with $RIT \geq 1$ (positive response). The total toxicity index that includes growth variables and production were ≤ 1 . CO generally stimulates BH, HH, ACT, HT, and colonization of the HMA, the highly significant positive relationship of the HMA with RHTP stands out. *J. curcas* stimulates 54.8% in soil with 4g/kg of PC. The use of *J. curcas* is recommended for its potential to indicate toxicity and phytoremedial CO from Gleysols from the state of Tabasco.

AGRADECIMIENTOS

Al Colegio de Postgraduados, campus Tabasco y al Programa de Maestría en Producción Agroalimentaria en el Trópico, por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y mi investigación de Tesis en sus instalaciones.

AL Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca de financiamiento otorgada para cursar mis estudios de la Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico durante dos años (2021 y 2022).

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesora Investigadora del Campus Tabasco. Responsable del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Ambiental. Le agradezco por su infinita paciencia, temple y compasión hacia mi persona, por transmitirme su amplio conocimiento y su basto amor por la ciencia y la investigación científica. Por permitirme utilizar el laboratorio a su cargo, equipos y materiales para desarrollar la investigación sin impedimentos, aun cuando el mundo se paralizó por la COVID 19, y brindarme libertad en este espacio de trabajo. Por ayúdame a cumplir esta meta académica y creer en este sueño de estudios. Eternamente agradecida, Mary.

A la Dra. Rocío Guadalupe Acosta Pech quien además de ser parte de mi comité y brindarme su asesoría y sugerencias en la investigación, le agradezco haberme transmitido y enseñado el amor por la estadística

Al Dr. Jorge Martínez Herrera por facilitarme las semillas certificadas de *Jatropha curcas*; el acompañamiento y sugerencias durante el desarrollo de esta formación e investigación académica, así como el apoyo en el discernimiento en la elección de este Postgrado.

A las y los catedráticos investigadores con quien tuve el gusto de obtener conocimientos, rigor científico y amistad, durante los cursos académicos del PROPAT en estos años de estudios.

A mi amiga Lucely Casango de la Cruz, por su apoyo durante el proceso de investigación en laboratorio, por su amistad, confianza y compromiso cuando la pandemia nos confino al aislamiento y ella continuo su asistencia en mi ayuda. Al MC. Mario Rodríguez Cuevas y al Dr. Dante Sumano López por su amistad, sus consejo y motivación para ingresar a

esta casa de estudios. A mis amigos Deysi del Carmen Méndez Jiménez, Pedro Flores Hernández, Leydi Arias por acompañarme los días más oscuros de estos últimos dos años, por escucharme, por brindarme ánimos, paciencia y alentarme a continuar cada día, en fin por sus infinitos consejos y amabilidad cuando el barco se hundía. A mis amigos y compañeros de laboratorio, por sus conocimientos transmitidos, motivación y valiosa amistad, mis estimados: Liliana Solís, José G. López Jiménez y José A. Orcio Carrillo; mis ánimos amigos (as) y compañeros de maestría: Ricarda Valenzuela, Marlith Magaña, José del Carmen Hernández, Bismark Álvarez, Darío de la Cruz, Isaí Quevedo, Ezequiel Gamas, Margarito Salvador, Alex C, cual valiosa y emotiva amistad me complace tener. En general agradezco a todas estas almas por hacerme feliz también con comida, charlas y hacer más divertido este proceso. A mi primo Joaquín por su apoyo..... Con cariño a todos los aquí mencionados y perdón por los que hubiese olvidado en la lista.....

DEDICATORIA

A DIOS

Al ser Superior; el Inventor Supremo; al Sabio más sabio; el Dios de Israel; de Abraham, de Isaac, de Jacob, de David; al Dios que siendo Trino es Uno...Te abrazo y bendigo tu nombre, ofrezco este tributo como agradecimiento de tu amor, fidelidad y compasión hacia mi.....

A MIS SOBRINOS

Derick, Jorge, Alex, Pau, Sami, Gabriel, Juan Carlos, y Guillermo mis incansables mosqueteros (as), mis ahijadas Melani y Arleth; que brindan alegría, curiosidad e inocencia a mi vida....

A MI FAMILIA

A Cristina Vianey, Simón Alberto y Eloísa mi madre, por mostrarme la fortaleza del ser humano y por quien vivo cada día con la esperanza de nuestro reencuentro. Y a mi Padre, a mis abuelitas Elide Broca y Clelia Diaz, mis hermanas Lupita y Flor, por mostrarme el espíritu de resiliencia....

CONTENIDO

RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
AGRADECIMIENTOS	v
DEDICATORIA.....	vii
CONTENIDO.....	viii
LISTAS DE CUADROS.....	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	4
2.1. Objetivo general.....	4
2.1.1. Objetivos particulares.....	4
2.2. Hipótesis general	5
2.2.1. Hipótesis particulares	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA	6
3.1. Definición y composición del petróleo crudo.....	6
3.1.1. Hidrocarburos del petróleo.....	7
3.1.2. Composición química de parafinas y efectos en seres vivos.....	7
3.1.3. Composición química de aromáticos y efectos en seres vivos.....	10
3.1.4. Resinas, asfáltenos y efectos en seres vivos	13
3.2. El suelo e importancia.....	15

3.2.1. Suelo Gleysol.....	15
3.3. Taxonomía y uso del piñón <i>Jatropha Curcas</i>	16
3.4. La rizosfera y sus características.....	19
3.5. Tecnologías biológicas de recuperación de suelos con petróleo	21
3.5.1. Biorremediación.....	21
3.5.2. Fitorremediación	22
3.5.2.1. Ventajas y desventajas de la fitorremediación.....	24
3.5.3 Rutas de degradación de hidrocarburos del petróleo	24
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	28
4.1. Trabajo en campo e invernadero	29
4.1.1 Características del suelo	29
4.1.2. Propagación de <i>Jatropha curcas</i> L.....	29
4.1.3. Petróleo fresco.....	29
4.1.4. Diseño y configuración experimental	30
4.1.4.1. Preparación de las unidades experimentales.	30
4.2. Establecimiento del experimento	31
4.3. Seguimiento de crecimiento de <i>Jatopha curcas</i> L.....	33
4.3.1 Levantamiento de experimento.....	33
4.4. Etapa II. Trabajo de laboratorio	34
4.4.1. Variables en planta	34
4.4.1.1. Área foliar	34

4.4.1.2. Longitud y número de raíces.....	35
4.4.1.3. Materia seca aérea y radical (g)	35
4.4.2. Variables microbiológicas en rizosfera.....	35
4.4.2.1. Población de microorganismos.....	36
4.4.3 Medios de cultivos para bacterias y hongos	36
4.4.4 Hongos micorrícicos versiculo arbuscular.....	39
4.4.4.1. Preparación y selección de raíces	39
4.4.4.2 Aclareo, tinción y montaje en microscopio.....	39
4.4.5. Variables químicas	41
4.4.5.1. Remoción de Hidrocarburos Totales de Petróleo	41
4.5. Etapa III. Análisis estadísticos	42
4.5.1. Índices de toxicidad al petróleo.....	42
4.5.2 Análisis de varianza y correlación de variables	43
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	46
5.1. Efecto del petróleo en el crecimiento de <i>Jatropha curcas</i>	46
5.2. El petróleo crudo sobre crecimiento y producción de <i>Jatropha curcas</i>	51
5.3. Índices absolutos de toxicidad al petróleo crudo.....	56
5.4. Población de microorganismos a respecto a la dosis de petróleo en suelo fitorremediado	57
VI. CONCLUSIÓN	64
6.1. Conclusión general	64

6.1.1 Conclusiones particulares.....	64
VII. LITERATURA CITADA.....	66
ANEXOS	80

LISTAS DE CUADROS

Cuadro 1	Alcanos derivados del petróleo crudo.....	8
Cuadro 2	Alquinos lineales y cíclicos derivados del petróleo crudo.....	9
Cuadro 3	Hidrocarburos aromáticos policíclicos y su riesgo a la salud y el ambiente.....	12
Cuadro 4	Exudados radicales de importancia para la nutrición vegetal y microbiológica.....	20
Cuadro 5	Tecnologías y mecanismos implicados en la fitorremediación.....	23
Cuadro 6	Análisis de varianza de altura de planta, diámetro basal y numero de hojas totales en 189 tratamientos (7 dosis de Petróleo por 27 semanas).....	46
Cuadro 7	Crecimiento y materia seca de <i>J. curcas</i> expuesta al petróleo crudo a la semana 27.....	54
Cuadro 8	Índice de toxicidad al petróleo crudo de <i>Jatropha curcas</i> a la semana 27.....	57
Cuadro 9	Población de cinco grupos microbianos a la semana 27 rizosfera de <i>J. curcas</i> en suelo contaminado con petróleo crudo tratado con fitorremediación de Julio a diciembre 2021.....	59
Cuadro 10	Porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas, esporas intraradicales, y colonización total del hongo micorrícico arbuscular en <i>Jatropha curcas</i> con diferentes concentraciones de petróleo crudo. Semana 27.....	60
Cuadro 11	Relación entre petróleo crudo, materia de planta, microorganismos y remoción de hidrocarburos totales del petróleo....	63

CUADROS DE ANEXOS

Cuadro 1	Análisis de varianza de altura de planta, diámetro basal y hojas totales en 189 tratamientos (7 dosis de Petróleo por 27 semanas)	79
Cuadro 2	Análisis de varianza del crecimiento y materia seca de <i>J. curcas</i> expuesta al petróleo crudo a la semana 27.....	80
Cuadro 3	Análisis de varianza de población de bacterias heterótrofas (BH), bacterias hidrocarbonoclasticas (BHC), Actinomicetos (ACT), hongos totales (HT) en rizosfera de <i>J. curcas</i> después de 27 semanas de fitorremediación. Julio a diciembre 2021.....	82
Cuadro 4	Análisis de la colonización del hongo micorrícico arbusculares (hifas, arbusculos, vesículas, esporas intraradicales y total) en simbiosis con <i>Jatropha curcas</i> expuesta a diferentes concentraciones de petróleo crudo. Semana 27.....	83
Cuadro 5	Análisis de varianza de Índice relativo de toxicidad (IRT) al petróleo crudo en altura de planta (AP), diámetro basal (DB), hojas totales (NHT), área de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíz (LR), materia de raíz (MSR) y materia área (MSA) de <i>Jatropha curcas</i> a la semana 27 de exposición a petróleo.....	84
Cuadro 6	Análisis de varianza del Índice de absoluto de toxicidad para crecimiento (IATC), índice de absoluto de toxicidad para producción (IATP) e índice total de toxicidad (ITT) al petróleo crudo que incluye IATC+IATP de <i>Jatropha curcas</i> a la semana 27.....	86
Cuadro 7	Análisis de varianza de la remoción de hidrocarburos totales del suelo contaminado con petróleo durante julio a diciembre 2021.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Coloide formado por agregados del petróleo.....	7
Figura 2	Parafinas del petróleo con enlaces sencillos y triples.....	8
Figura 3	Cicloalcanos derivados del petróleo crudo	10
Figura 4	Hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo crudo.....	13
Figura 5	Estructura de resinas	14
Figura 6	Estructura de asfáltenos	15
Figura 7	Partes importantes de <i>Jatropha curcas</i> L. a) ramas florecidas, b) corteza, c) venas de la hoja, d) flor pistilada, e) flor estaminada, f) corte transversal de fruto inmaduro, g) frutos, h) corte longitudinal de un fruto, i) semilla	18
Figura 8	Interacciones en la rizosfera y exudados radicales (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).....	20
Figura 9	Etapas de la oxidación de un hidrocarburo alifático.....	
Figura 10	A) Oxidación de un compuesto aromático mediado por monooxigenasa y dioxigenasa. B) Degradación del fenantreno por hongos no lignolíticos	27
Figura 11	Flujo grama del proceso de investigación. DP: dosis de petróleo.....	28
Figura 12	Preparación de suelo con dosis de petróleo fresco. A) Peso de petróleo en balanza semi-analítica. B) Mezcla de petróleo-suelo.....	31
Figura 13	Plántulas de <i>J. curcas</i> en charolas antes del trasplante y en unidades experimentales en micro-túnel.....	32
Figura 14	Diseños experimentales con distribución completamente azar bajo condiciones controladas de lluvias (micro-túnel).....	32
Figura 15	Crecimiento de <i>Jatropha curcas</i> . A). Altura de planta usando regla graduada en cm, y B) Diámetro basal (vernier).....	33
Figura 16	Levantamiento de experimento a las 27 semanas de crecimiento de <i>J. curcas</i> en suelo con dosis de petróleo. A) Desplante. B) Material aéreo. C), D) Suelo rizosférico. E) Tallos. F) Material radical	34
Figura 17	Materia radical y aérea de <i>J. curcas</i> a 27 semanas. A) Corte de hojas. B) Separación de tallo-raíz. C) Peso de material radical y aéreo.	35
Figura 18	Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar. A) muestras de rizosfera. B) Pesado de rizosfera. C) Dilución madre. D) Agitación.	37

	E) Dilución seriada. F) Alícuota en placa. G) Distribución de alícuota. H) Incubación. I) Conteo de UFC.....	
Figura 19	Procedimiento para preparar medio de cultivo específico para microorganismos hidrocarbonoclasticos.	38
Figura 20	Procedimiento de preparación y lectura de estructuras fúngicas de la micorriza vesículo arbuscular A) Lavado de raíces. B) Selección y corte de raíces. C) Montaje en capsula. D) Decoloración E) Tinción. F) Preservación. G) Montaje en portaobjetos. H) Lectura en microscopio.....	40
Figura 21	Extracción con equipo Soxhlet y cuantificación gravimétrica de hidrocarburos totales de petróleo.....	42
Figura 22	Altura semanal de planta (A), Número de hojas totales (B), diámetro basal (C) de <i>Jatropha curcas</i> expuestas a diferentes concentraciones de petróleo crudo durante julio a diciembre 2021.....	50
Figura 23	Cambios en área de hoja (cm ²) de <i>Jatropha curcas</i> según la dosis de petróleo, 27 semanas.....	53
Figura 24	Índice relativo de toxicidad (IRT) al petróleo crudo en crecimiento y producción vegetal de <i>Jatropha curcas</i> a la semana 27.....	54
Figura 25	Cambios en raíces de <i>Jatropha curcas</i> según la dosis de petróleo, 27 semanas.....	66
Figura 26	Estructuras fúngicas del hongo micorrícico arbuscular en raíces de <i>J. curcas</i> a las 27 semanas de exposición al PC a 40x. A) Hifas y vesícula. B) Hifas y esporas.....	60
Figura 27	Remoción de hidrocarburos totales del suelo contaminado con petróleo durante julio a diciembre 2021.....	62

I. INTRODUCCIÓN

El petróleo crudo (PC) es un recurso no renovable que sostiene la economía y sociedad del planeta, pero durante su extracción, conducción y transformación es derramado por accidente al suelo y contiene hidrocarburos totales del petróleo (HTP), y ellos son tóxicos, cancerígenos y mutagénicos para los seres vivos (Rivera-Cruz *et al.*, 2016; Pothuluri y Cerniglia, 1994). Las concentraciones promedio de HTP 75 y 118 g/kg en los 30 cm superiores de suelos cerca de pozos taponados, líneas de transporte y áreas de refinación exceden límites aceptables por normas oficiales ambientales (Trujillo-Narcía *et al.*, 2018; Sari *et al.*, 2018). Concentraciones que excedan el máximo límite aceptable de HTP en suelo de 10 g/kg para los humanos (ATSDR, 1999) y 3 g/kg se consideran fracciones pesadas para los seres vivos (DOF, 2013). Límites superiores de tolerancia a la contaminación por plantas y microorganismos convierten a los suelos en marginales para la agricultura.

El potencial de las plantas a la tolerancia a HTP se conoce con la relación que existe entre la cantidad, composición y grado de afectación sobre ella (Al-Mutairi *et al.*, 2008). Los estudios de toxicidad de la contaminación del suelo pueden evaluarse con la respuesta *in vitro* de plantas y microorganismos rizosféricos que crecen en suelos contaminados (Shahriari *et al.* 2007; Chávez-Álvarez *et al.*, 2022). Esto permite obtener los efectos del contaminante sobre los organismos vivos (Porta *et al.*, 2003) y el posible potencial de los organismos tolerantes para descontaminar hidrocarburos totales del petróleo del suelo. Los modelos empleados provienen de mecanismos fisiológicos y bioquímicos que inducen el restablecimiento de la homeostasis celular en concentraciones específicas del contaminante (Mickelbart *et al.*, 2015) Se utilizan índices de toxicidad y hormesis para mediar dosis-respuesta en planta (Rivera-Cruz *et al.*, 2004; Alejandro-Córdova *et al.*, 2017; Orocio-Carrillo *et al.*, 2019; Chávez-Álvarez *et al.*, 2022). La toxicidad y hormesis muestra la típica dosis-respuesta por bajas y altas dosis del contaminante, siendo respuesta inhibitoria para la primera y estimuladora para la segunda (OECD, 1984; Calabrese, 2013).

El índice de toxicidad y hormesis es un valor absoluto que muestra la capacidad de una planta para establecerse, crecer y producir en suelo con diferentes concentraciones de HTP, parámetro básico de selección de plantas con potencial de fitorremediar suelos contaminados con PC. Ejemplos de plantas arbustivas perennes usadas como indicadoras de estrés al PC; *Jatropha curcas* de la familia Euphorbiaceae (Agamuthu *et al.*, 2010; Agbogadi *et al.*, 2013); *Haematoxylum campechianum* (tinto bush) y *Swietenia macrophylla* (mahogany) (Pérez-Hernández *et al.*, 2013).

La fitorremediación es una tecnología que usa plantas previamente seleccionadas del modelo dosis-respuesta al contaminante, y con rizosfera colonizada por microorganismos que utilizan como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos del petróleo desde el suelo o agua (Hegazy *et al.*, 2017). Algunos estudios indican que la rizosfera de vegetación arbustiva como *Jatropha curcas* (piñón) (Nero *et al.*, 2020); *Cedrela odorata* (tropical cedar), *Haematoxylum campechianum* (tinto bush), *Swietenia macrophylla* (mahogany), y *Tabebuia rosea* (macuilis) demostraron habilidad para descontaminar HTP del suelo (Pérez-Hernández *et al.*, 2017).

Las plantas inducen la biodegradación de HTP porque provee un ambiente óptimo para proliferar microorganismos en la rizosfera o zona de la raíz (Denys *et al.*, 2006; Van, 2011). Diversos estudios Gupta *et al.* (2012); Widdowson *et al.* (2005); Gonzalez Moscoso *et al.* (2019) son ejemplo del efecto de la rizosfera en la fitorremediación de HTP. Adam and Duncan (2002) informa que este efecto puede ser debido a que en el suelo con petróleo crudo (PC) se activa una barrera física que reduce el acceso del agua, oxígeno y nutrientes por las raíces. Las raíces de plantas adaptadas al estrés exudan compuestos orgánicos (fenoles, ácidos orgánicos, alcoholes, proteínas) en la rizosfera con PC que pueden servir como fuente de carbono y energía para la sobrevivencia y crecimiento de bacterias, hongos, actinomicetos y hongos micorrícicos arbusculares (HMA) (Alkorta y Garbisu, 2001; Balestrini *et al.*, 2015).

Los microbios en suelo con PC desactivan la barrera física que permiten que las raíces tengan acceso al agua, oxígeno y nutrientes en la rizosfera. Se ha demostrado que los microorganismos asociados a la rizosfera mineralizan y estimulan el co-metabolismo aeróbico de compuestos inorgánicos, orgánicos de origen biogénico y petrolífero (Saleh

et al., 2004) debido a la presencia de oxígeno derivado de la raíz (Anderson *et al.*, 1995), enzimas, hormonas, carbohidratos, vitaminas, flavonoides, ácidos y surfactantes que los microorganismos transfieren al suelo (Pepper *et al.*, 2015). Diversas investigaciones informan que las bacterias y hongos hidrocarbonoclasticos, así como HMA son promotoras del crecimiento vegetal, y degradan hidrocarburos del PC en la rizosfera (González-Moscoso *et al.*, 2019; Alejandro-Córdova *et al.*, 2017; Rabie *et al.*, 2005).

Los HMA tiene la habilidad de mejorar la capacidad de la planta para establecerse y hacer frente a situación de estrés inducida por el carbono orgánico derivado del PC que es toxico, cancerígeno y mutagénico (Querejeta *et al.* 2003). Los HMA contribuyen en romper la tensión superficial, disponen de agua y nutrimentos para la planta y microorganismos (Kohler *et al.*, 2008). *Jatropha curcas* establece simbiosis con HMA (Reyes *et al.*, 2003; González *et al.*, 2015).

Jatropha curcas “Piñón” originaria del estado de Veracruz, México, fue seleccionada para ese estudio debido a que es una planta versátil cultivada en suelos marginales para la producción de cultivos agrícolas y productora de aceite para biocombustibles (Martínez-Herrera *et al.*, 2006), y promete doble uso ambiental y humano. Se desconoce el uso de *J. curcas* como bioindicadora de toxicidad y rizodegradación de HTP en suelos arcillosos del Trópico húmedo mexicano asociada a bacterias y hongos micorrícicos arbusculares.

II. OBJETIVOS E HIPOTESIS

2.1. Objetivo general

Conocer el potencial de *Jatropha curcas* para usarla en protocolos de toxicidad y fitorremediación de suelo arcilloso contaminado con petróleo crudo, en términos de su crecimiento, producción y actividad microbiana de bacterias y hongos micorrícicos arbusculares.

2.1.1. Objetivos particulares

1. Determinar el efecto del petróleo crudo a través del tiempo en altura, diámetro basal y número de hojas, para señalar las fases de crecimiento vegetativo bajo condiciones de estrés.
2. Obtener a la semana 27 índices dosis-respuesta a PC en el crecimiento y producción de material vegetal de *J. curcas*.
3. Determinar a través de índices dosis respuesta el potencial de fitorremediación de *J. curcas*.
4. Evaluar el efecto del petróleo crudo en la población de bacterias y hongos micorrícicos arbusculares que se establecen en la rizosfera de *J. curcas* a la semana 27.
5. Relacionar la producción de raíz de *J. curcas*, microorganismos rizosfericos con el porcentaje de remoción de hidrocarburos totales del petróleo.

2.2. Hipótesis general

Jatropha curcas es una planta versátil que manifiesta en su crecimiento y producción el estrés inducido por el petróleo crudo, pero que al asociarse con bacterias y hongos micorrizicos arbusculares tiene potencial de uso en tecnologías de fitorremediación de suelos arcillosos contaminados con hidrocarburos totales del petróleo.

2.2.1. Hipótesis particulares

El petróleo crudo indujo cambios significativos en altura de planta, número de plantas y diámetro basal durante las 27 semanas secuenciales

Jatropha curcas manifiesta fases de crecimiento con curvas dosis respuesta al estrés diferentes según la dosis de exposición al petróleo crudo

Jatropha curcas a la semana 27 de su crecimiento induce índices de toxicidad menores y mayores a uno en parámetros de crecimiento y producción.

J. curcas presenta índices que la potencializan como planta fitorremediadora.

La población de bacterias y estructuras fúngicas del hongo micorrizico arbuscular asociadas a la rizosfera de *J. curcas* es afectada por la exposición a diferentes concentraciones de petróleo crudo, a la semana 27 después de aplicada la tecnología de fitorremediación

La remoción de hidrocarburos totales del petróleo en suelo arcilloso a la semana 27 después de aplicada la fitorremediación usando *J. curcas*, se relaciona con la concentración de petróleo y la actividad microbiana rizosferica.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Definición y composición del petróleo crudo

El petróleo o *Petroleum* significa aceite de roca. El crudo del petróleo (PC) es un líquido de naturaleza hidrocarbonatada, oleaginoso e inflamable, está constituido por una mezcla compleja de diferentes tipos de hidrocarburos (SGM, 2017; Lluch, 2008). Los compuestos químicos elemental son carbono, hidrogeno, azufre y nitrógeno, en porcentajes que van 84-87%, 11-14 %, 0-2% y 0.2 % respectivamente (Gary y Handework, 2003), metales traza como vanadio, Níquel, hierro, aluminio y cobre, y de acuerdo al tipo de PC y la región de origen depende su concentración (Lluch, 2008). El color del PC es variable también entre ámbar y negro (SGM, 2017) marrón, verdoso o amarillento (Varjani, 2013)

El PC según la proporción relativa del peso molecular se clasifica en pesado, mediano y ligero (Varjani, 2013). Y según los estándares del Instituto Americano del Petróleo (API), el crudo mexicano se clasifica según los grados API y el contenido de azufre en amargo (mayor de 1.5%), semi- amargo (entre 0.5 a 1.5%) y dulce (menor del 0.5%) (Pemex, 2022).

En México Petróleos Mexicanos clasifica a la mezcla del PC mexicano en cinco tipos según los grados API:

- a) Extra Ligero el “Olmeca”, bueno para producir lubricantes y petroquímicos, cuenta con una densidad de 0.83 g/cm³, 39 API y 0.8% de azufre en peso, semi amargo.
- b) El Crudo Ligero “Istmo” quien brinda mayor rendimiento para la realización de gasolina y destilados intermedios, con una densidad de 0.87 - 0.83 g/cm³, 32 API y 1.3% de azufre en peso, semi- amargo.
- c) El crudo Pesado “Maya” tiene menor rendimiento en producción de gasolina con densidad de 1.0 - 0.92 g/cm³, 22 API y 3.3% de azufre en peso, amargo.
- d) El crudo pesado “Talam” con densidad de 16° API y 2.8% de azufre en peso, amargo.
- e) El crudo pesado “Altamira” con una gravedad de 15° a 16.5° API y 5.5% a 6.0% de azufre en peso, amargo (PEMEX, 2022).

3.1.1. Hidrocarburos del petróleo

La composición típica de hidrocarburos del PC es; parafinas normales (14%), parafinas ramificadas (16%), parafinas cíclicas (30%), aromáticos (30%), resinas (10%) y asfaltenos (10%) (Figura 1) (Thomas *et al.*, 2001).

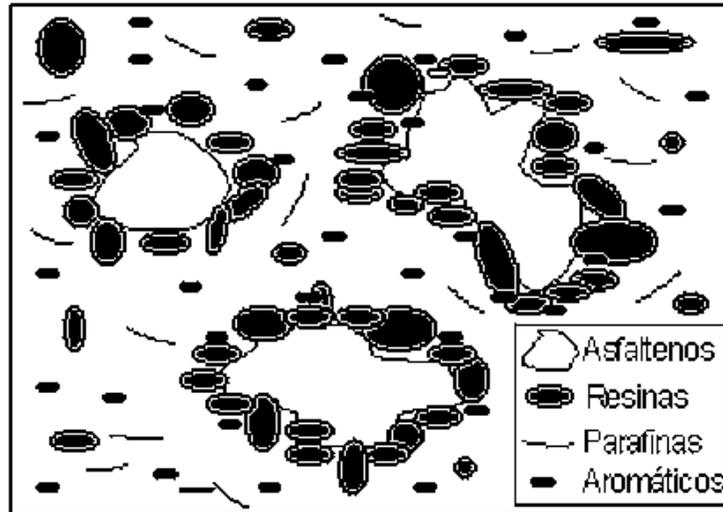


Figura 1. Coloide formado por agregados del petróleo (Thomas *et al.*, 2001).

3.1.2. Composición química de parafinas y efectos en seres vivos

Las parafinas son hidrocarburos alifáticos que se dividen en alcanos, cicloalcanos, alquenos y alquinos. (Figura 2). Los alcanos tienen la fórmula general C_nH_{2n+2} donde $n=1,2,\dots$. Se distinguen por presentar enlaces covalentes sencillos, se les denomina también saturados porque presentan una serie de alcanos, y aumentan el número de átomos de C al aumenta el número de isómeros estructurales. En el Cuadro 1 se muestran los primeros isómeros de cadena lineal de alcanos. Los primeros cuatro alcanos se presentan en forma gaseosa y del quinto al décimo en estado líquido a temperatura ambiental, superiores a ellos se presentan como parafinas (sólidos aceitosos) (Chang, 2007; McMurry, 2008).

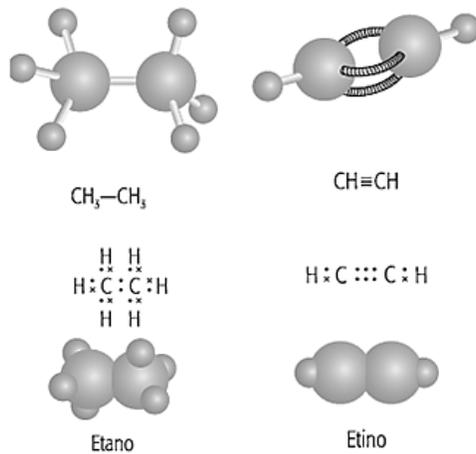


Figura 2. Parafinas del petróleo con enlaces sencillos y triples.

Cuadro 1. Alcanos derivados del petróleo crudo

Hidrocarburo parafínico	Fórmula molecular	Átomos de carbono
Metano	CH ₄	1
Etano	CH ₃ -CH ₃	2
Propano	CH ₃ -CH ₂ -CH ₃	3
Butano	CH ₃ -(CH ₂) ₂ -CH ₃	4
Pentano	CH ₃ -(CH ₂) ₃ -CH ₃	5
Hexano	CH ₃ -(CH ₂) ₄ -CH ₃	6
Heptano	CH ₃ -(CH ₂) ₅ -CH ₃	7
Octano	CH ₃ -(CH ₂) ₆ -CH ₃	8
Nonano	CH ₃ -(CH ₂) ₇ -CH ₃	9
Decano	CH ₃ -(CH ₂) ₈ -CH ₃	10
Undecno	C ₁₁ H ₂₄	11
Dodecano	CH ₁₂ H ₂₆	12
Tridecano	C ₁₃ H ₂₈	13
Icosano	C ₂₀ H ₄₂	20
Triacontano	C ₃₀ H ₆₂	30

Fuente: Chang, 2007; McMurry, 2008

Alquenos u oleofinas. Son hidrocarburos insaturados que contienen enlaces dobles o triples de carbono-carbono, siendo esta su parte más reactiva y grupo funcional, en ocasiones suelen presentar isometría geométrica (cis-trans) como el *cis-but-2-eno* o el *trans-hex-2-eno*; los alquenos presentan reacciones de moléculas o alógenos y formar propeno entre otros (Chan, 2007); otra forma de presentarse es en su forma de cicloalquenos (Wade, 2012). La fórmula general de los alquenos es C_nH_{2n} donde $n=2,3,\dots$ (Chang, 2007) .

Alquinos. Son hidrocarburos con al menos un enlace triple carbono- carbono como su grupo funcional. La fórmula general es C_nH_{2n-2} , donde $n=2,3$ (Chang, 2007) en este grupo no existen probabilidad de isomería geométrica (*cis-trans*) debido a que el triple enlace es lineal. En el Cuadro 2 se observan siete tipos de alquinos y un cicloalquino (Chang, 2007; Wade, 2012).

Cuadro 2. Alquinos lineales y ciclico derivados del petróleo crudo

Alquino lineal	Alquino ciclico
$CH\equiv C-CH_2-CH_3$ (1-butino)	(Ciclooctino)
$H_3C-C\equiv C-CH_3$ (2-butino)	
$H-C\equiv C-H$ (etino)	
$H-C\equiv C-CH_3$ (propino)	
$H-C\equiv C-CH_3$ (propino)	
$H-C\equiv C-CH_2-CH_3$ (but-1-ino)	
$CH_3-C\equiv C-CH_3$ (but-2-ino)	

Fuente: Chang, 2007; Wade, 2012

Cicloalcanos. Son alcanos especiales donde los átomos de carbono se unen en anillos, tienen la formula general C_nH_{2n} donde $n=3,4,\dots$ ejemplo de ellos se observan en las Figura 3 (Chang, 2007). Algunos ciclohexanos presentan diversas geometrías, estando libres de tensión, es decir, que sus enlaces están estirados, o torcidos frente a las formas normales geométricas. Su hibridación es sp^3 . (Chang, 2007).

Los efectos de los alcanos sobre el medio ambiente y organismos vivos son diversos: (A) en agua forman una película lustrosa flotante que afecta y mata la fauna marina

debido al impedimento de intercambio de oxígeno y CO₂. (B) En aire y agua, son causa de gases efectos invernaderos, al aumentar su deposición atmosférica. (C) en humanos a nivel celular impide la oxigenación celular causando carboxihemoglobina. Los alcanos son cancerológicos, y al formar parte del aire atmosférico causa irritación de ojos y pulmones en humanos. Los alquenos al formar parte de los plásticos contaminan el suelo y agua a larga plazo, debido a su carácter de baja biodegradación (Recio, 2013)

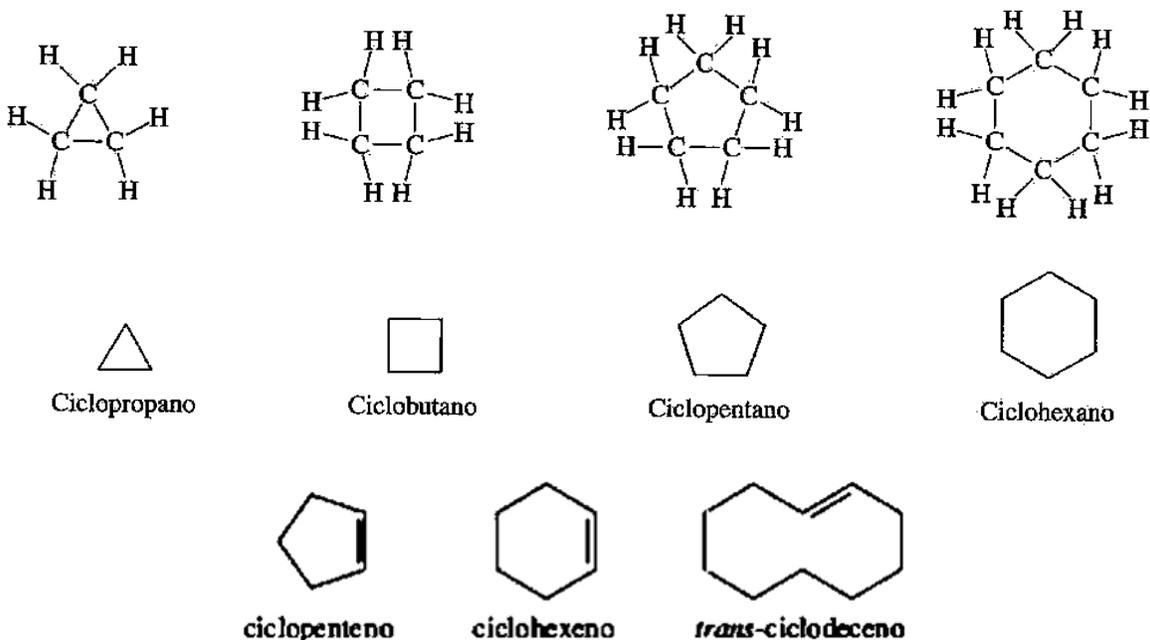


Figura 3. Cicloalcanos derivados del petróleo crudo (Chang, 2007)

3.1.3. Composición química de aromáticos y efectos en seres vivos.

Los hidrocarburos aromáticos (HA) son derivados del benceno, se representa mediante un anillo de seis miembros con tres enlaces dobles muy estables. El grupo alquilo presenta un sustituyente llamado R, el sustituyente del grupo arillo se llama Ar. Si el anillo bencénico es el sustituyente se le denomina como grupo fenilo (Ph, phenyl) (Wade, 2012).

Los HA causar efectos agudos y crónicos en los organismos vivos, pero el benceno contenido en los aromáticos es metabolizado y eliminado de forma rápida en los organismos, una pequeña parte puede quedar adherida durante varios días en los tejidos después de haberse finalizado la exposición a él (Zubizarreta *et al.*, 2018).

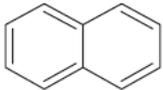
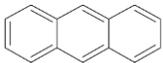
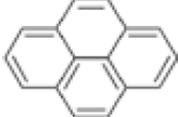
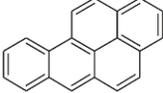
La toxicidad puede ser aguda o crónica y producir efectos diversos como cefalea y hasta problemas cardiovasculares y hepatotoxicidad. En exposición crónica el benceno presenta efectos carcinogénicos, desarrollo de leucemias, alteraciones hemáticas y cromosómicas en animales y humanos (Zubizarreta *et al.*,2018).

Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son considerados según Agencia de Protección Ambiental (EPA, por su sigla en inglés) como contaminantes prioritarios por ser cancerígeno, mutagénicos, teratogénicos para los seres vivos (Cuadro, 3) (Conejo-Saucedo *et al.*, 2019). En la Figura 4 se muestran seis ejemplos de estructuras químicas estables de HPA. Sin embargo, entre HPA disponibles en el suelo según la NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 se encuentra el Benzo[a]pireno, Dibenzo[a,h]antraceno, Benzo[a]antraceno, Benzo[b]fluoranteno, Benzo[k]fluoranteno, y Indeno (1 ,2,3-cd) pireno (DOF, 2013).

Los HPA causan daños a los seres vivos entre estos; disminuir la fecundación y malformaciones en las crías, epitelio externo y los fluidos corporales, y pérdida de habilidad del sistema inmunológico para combatir infecciones (Toxfaqstm, 2021).

La norma oficial mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012 (DOF, 2013) establece los límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación.

Cuadro 3. Hidrocarburos aromáticos policíclicos y su riesgo a la salud y el ambiente.

Compuesto	Estructura química	Formula molecular y PM ¹	Posición Rango [†]	Riesgo a la salud	Riesgo ambiental
Naftaleno		C10H8 /128.174	81	Irritante/ Nocivo en caso de ingestión; carcinogénico.	Muy toxico para organismos acuáticos; a largo plazo y el ambiente.
Antraceno		C14H10 /178.23	9	Toxico; no carcinogénico.	Muy toxico para organismos acuáticos; a largo plazo y el ambiente.
Fenantreno		C14H10 / 178.23	252	Toxico; carcinogénico o mutagénico.	Muy toxico para organismos acuáticos; a largo plazo y ambiente.
Pireno		C16H10 /202.25	260	Toxico; no genotóxico.	Muy toxico para organismos acuáticos; bioacumulación en leche, crustáceos, peces, moluscos y algas.
Benzopireno		C20H12 / 252.31	230	Toxico; carcinogénico; y causa dificultades reproductivas, teratogénico.	Muy toxico para organismos acuáticos; a largo plazo y

Benzo [g,h,i]perieno		C ₂₂ H ₁₂ / 276.338	9 (PAHs)	Carcinogénico; causa ruptura de cadena de ADN mutagénico.	Peligroso para el ambiente muy tóxico para la vida acuática; con efectos duraderos.
----------------------	--	--	-------------	---	---

† Rango de posición de acuerdo al CERCLA (*Priority List of Hazardous Substances*) C&L Inventory (europa.eu)). Conejo-Saucedo *et al.*, 2019. Y datos obtenidos de National Center for Biotechnology Information (NCBI por sus siglas en inglés, 2022) en Benzo[ghi]perylene | C₂₂H₁₂ - PubChem (nih.gov). Fuente: Conejo-Saucedo *et al.*, 2019. †PM : peso molecular

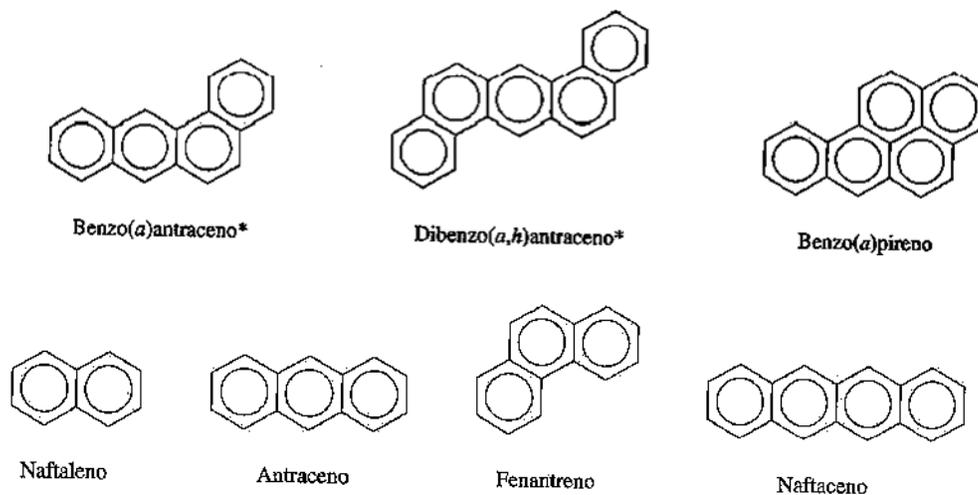


Figura 4. Hidrocarburos aromáticos policíclicos del petróleo crudo (Chang, 2007).

3.1.4. Resinas, asfáltenos y efectos en seres vivos

Las resinas y asfáltenos es la fracción más pesada del PC y corresponde aproximadamente al 10 % de su composición química (Thomas *et al.*, 2001). Estas moléculas contienen entre tres a diez o más anillos aromáticos, y con peso molecular grandes entre 516 a 5000 Dalton (Figura 5 y 6) (Navarro *et al.*, 2004). Las resinas y asfáltenos presentan diferencias importantes a pesar de contar con estructuras similares; las resinas son fácilmente solubles mientras que los asfáltenos tienen dispersión coloidal y no se disuelven en aceite. Los asfáltenos suelen ser oscuros y no volátiles cuando son

puros mientras que las resinas puras presentan un carácter de solido pastoso o líquidos pesados muy volátiles como hidrocarburos del mismo tamaño, además son rojizas cuando tienen un peso molecular alto y son menos coloridas a menor peso (Thomas *et al.*, 2001).

Las resinas son compuestos químicos eluidos de la fase estacionaria del petróleo, después de haber removido las fracciones saturadas y aromáticas del petróleo (Reyes *et al.*, 2012). Las resinas forman parte de la fracción de crudo soluble conformado por carbono, hidrogeno y elementos en una composición elemental de 81.8 % C, 9.5% H, 3.76% S, 1.04% N respectivamente, y 257.1 ppm de V y 73.9ppm de Ni. Con un peso molecular entre 700 y 1300 Dalton. Su estructura química es similar a la de los asfáltenos, aunque su peso molecular es menor (Navarro *et al.*, 2004)

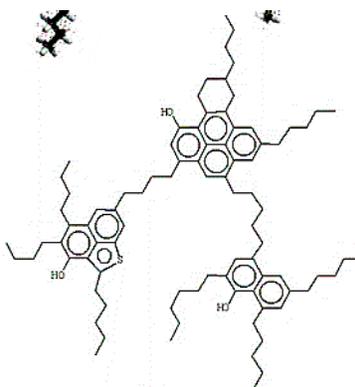


Figura 5. Estructura de resinas (Navarro *et al.*, 2004)

Asfáltenos. Fracción de crudo soluble en tolueno o benceno e insoluble en exceso de n- alcano (pentano u hexano). Están constituidos por anillos aromáticos ligados por cadenas alquílicas y cicloalcanos así como compuestos heterocíclicos con relación C/H 1:1.1 (40% de C es aromático) poseedores azufre (6-9%), nitrógeno (7.3%), Vanadio (1530 mg/kg y Níquel (403 mg/kg) (Figura 6) (Thomas *et al.*, 2001; Navarro *et al.*, 2004; Delgado, 2006).

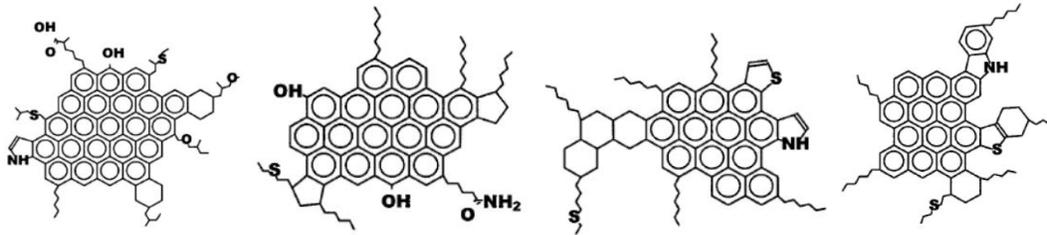


Figura 6. Estructura de asfáltenos (Delgado, 2006)

3.2. El suelo e importancia

El suelo es un cuerpo natural ubicado en la superficie terrestre, que soporta seres vivos, líquidos, sólidos como minerales, materia orgánica y gases (SSS, 2014). El término suelo incluye la capa arable de la tierra y parte superior hasta donde llegar las raíces de las plantas “*solum*” (SSS, 2014). Otra definición, según el origen del suelo dice es el material parental donde subyace en cuanto a estructura, textura, consistencia, propiedades químicas, biológicas y físicas, debido a la influencia que recibe a través del tiempo por parte del clima, topografía, flora, fauna y el ser humano (FAO, 2016).

Las funciones del suelo son diversas; ciclaje de nutrientes, almacenaje y renovación del carbono, mantenimiento del agua, disposición de su estructura, regula la diversidad aérea, biótica, amortigua y transforma elementos tóxicos. El suelo permite la contención de micro y macro biota para su funcionalidad, usando la actividad, biomasa y diversidad de los organismos allí existentes (Paul, 2015). En el suelo se desarrollan ciclos básicos de macronutrientes y micronutrientes; carbono, nitrógeno, fósforo, sulfato y potasio entre otros., y ellos sostienen la nutrición de plantas y microorganismos (FAO, 2016).

3.2.1. Suelo Gleysol

Se define a este tipo de suelos como aquellos que contiene un horizonte moteado y se forma en una zona del suelo que está saturado de agua durante una parte del año, pero parcial o completamente aireada durante el verano o el periodo más seco del año. Desarrolla condiciones reductoras que dan lugar propiedades *gléycas* mostrándose en color amarillento, marón o rojizo, mientras que dentro de los agregados o capas más profundas del horizonte colores gris/azulado (FitzPatrick, 1980). Los Gleysols tienen uso agrícola y de conservación, se cultivan plantas tolerantes a la humedad como: arroz,

pastos y arboles (zapote de agua, mangle) (WRB, 2015). En época de sequía se establecen plantas anuales como el cultivo de maíz y el piñón (*Jatropha curcas*)

3.3. Taxonomía y uso del piñón *Jatropha Curcas*

El piñón nombre común, es una planta con la siguiente taxonomía; Reino: Plantae. Subreino: *Tracheobionta*. División: *Embryophyta*. Clase: *Magnoliopsida*. Subcalses: *Malpighiales*. Familia: *Euphorbiaceae*. Subfamilia: *Crotonoideae*. Tribu: *Joannesieae*. Género: *Jatropha*. Especie: *Jatropha Curcas* L. (TOMBG, 2022). *Jatropha curcas* fue definido por Linnaeus, Carl Von (1753-1754) (Font, 2003). El género está constituido por alrededor de 66 especies del viejo mundo y en México solo una poca proporción de estas especies no son nativas (Dehgan y Webster., 1979).

J. curcas es una hierbas, arbusto o árbol, a veces carnosa en forma de cactácea, regularmente con látex. En la Figura 7 se observan las partes de la planta, con hojas simple o compuestas, alternas o a veces opuestas con estipulas; inflorescencias variadas que simulan ser una flor única, o en ciatos; flor unisexual, monoica y en ocasiones dioica, muy reducida regularmente, perianto nulo, flores estaminadas con uno o varios estambres libres o monoadelfos, flores con o sin estaminodios pero postiladas y pediceladas; ovario supero tricarpelar y triocular con 1 o 2 óvulos por lóbulo y basales unidos; fruto en forma de capsula tricarpelar; semilla carnosa con carúncula sobre el micrópilo, y endospermo graso (Heller, 1996).

Fases de crecimiento. Es una planta perene. Con un desarrollo óptimo la fase de crecimiento puede tardar entre 1, 2 y 3 años alcanzando 1.5 m de altura, siempre y cuando tengan condiciones ambientales y suelo con fertilidad adecuada, pero tras de cuatro a cinco años se regulariza la producción de la floración y semilla, y estas fases son tres meses por año (Anónimo, 2022) la floración tarde entre 2 a 10 días (Heller, 1996). En el estado de Veracruz, México se reporta las fases fenológicas desarrollo de la planta (ocho meses), floración dos meses y fructificación (tres meses) y defoliación (dos meses) (Pérez *et al.*, 2013; Martínez *et al.*, 2020)

Usos *J. curcas* se empleada como cerco vivo por los campesinos, debido a que no es consumida por los bovinos, además de ser una especie de cobertera, es usada para el

control de la erosión del suelo en zonas áridas. Presenta usos medicinales e industriales como la elaboración de purgantes, jabones, como control de plagas en forma de pesticidas (para cultivos de algodón, papa, legumbres, sorgo, maíz) (Heller, 1996).

Es una especie promisoriosa y de gran aporte en la industria extractiva de combustibles de origen vegetal como el biodiesel, ya que posee gran cantidad de aceite en sus semillas; es útil en la producción de fertilizantes, y en medicina tradicional (Pabón y Hernández-Rodríguez, 2012). Diversas investigaciones muestran su potencial como especie útil para el saneamiento de suelos, debido que tolera condiciones de estrés a sequía y a contaminación por metales pesados e hidrocarburos (Juwarkar *et al.*, 2008; Jamil *et al.*, 2009; Agamuthu *et al.*, 2010; Nero, 2020).

Distribución. *J. curcas* es cultivada desde América Central, Sudamérica, Sudeste de Asia, India y África (Schmook and Seralta-Peraza, 1997), de esta forma el género se distribuye desde los trópicos hasta los subtrópicos. De acuerdo con Córdova., *et al* (2015) en México la distribución de la especie, basada en revisiones de herbarios, se encuentra de manera mayoritaria en los estados de Chiapas, Colima, Guerrero, Jalisco, Nayarit, Oaxaca, Puebla y Veracruz

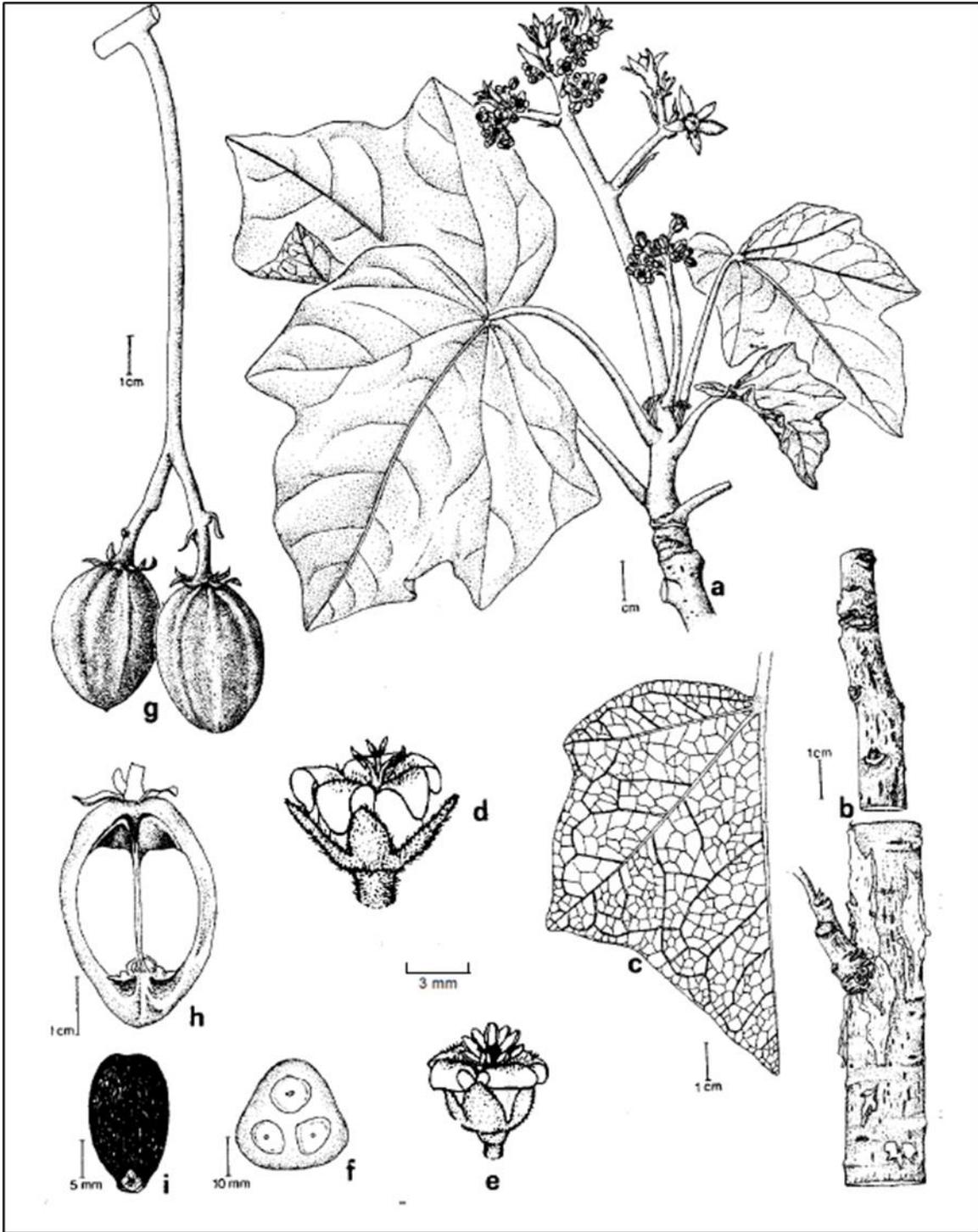


Figura 7 Partes importantes de *Jatropha curcas* L. a) ramas florecidas, b) corteza, c) venas de la hoja, d) flor pistilada, e) flor estaminada, f) corte transversal de fruto inmaduro, g) frutos, h) corte longitudinal de un fruto, i) semilla (Foto: <http://legacy.tropicos.org/Image/39167>; Heller, 1996)

3.4. La rizosfera y sus características

La palabra rizosfera se compone por el termino Rhiza, raíz y sphere, campo de influencia. Esta fue definida inicialmente como " la zona del suelo que aguanta grandes niveles de actividad bacteriana y ubicada inmediatamente adyacente a las raíces de las leguminosas" (Hiltner, 1904), actualmente se define como una estrecha zona de suelo que rodea y recibe la influencia de las raíces de las plantas (Figura 8) (Prashar *et al.*, 2014). Las raíces, liberan exudados pueden ser; carbohidratos, aminoácidos y aminos, ácidos alifáticos, ácidos aromáticos, fenoles, entre otros (Figura 8, Cuadro 4) y tienen un rol importante en la nutrición vegetal y microbiológica debido a la retención de agua y nutrientes (Marschner y Rengel ., 2012).

Los exudados generan cambios en estructura del suelo rizosférico, la disponibilidad de nutrientes inorgánicos debido a cambios en pH y por consiguiente induce interacciones negativa o positivamente planta-comunidad microbiana. En la Figura 8, se observa la interacción con hongos micorrícicos arbusculares, bacterias de vida libre reguladoras del crecimiento vegetal, microorganismos hidrocarbonoclasticas degradadoras de hidrocarburos del petróleo (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

La importancia de la rizosfera es diversa entre estas: 1) disposición de macronutrientes y micronutrientes para las plantas y microorganismos en el microbioma. 2). Protege a las plantas a través de la acción de los exudados radicales (Alshaal *et al.*, 2017). 3) Mejora de los procesos de biodegradación de contaminantes y fitorremediación (Liu *et al.*, 2017).

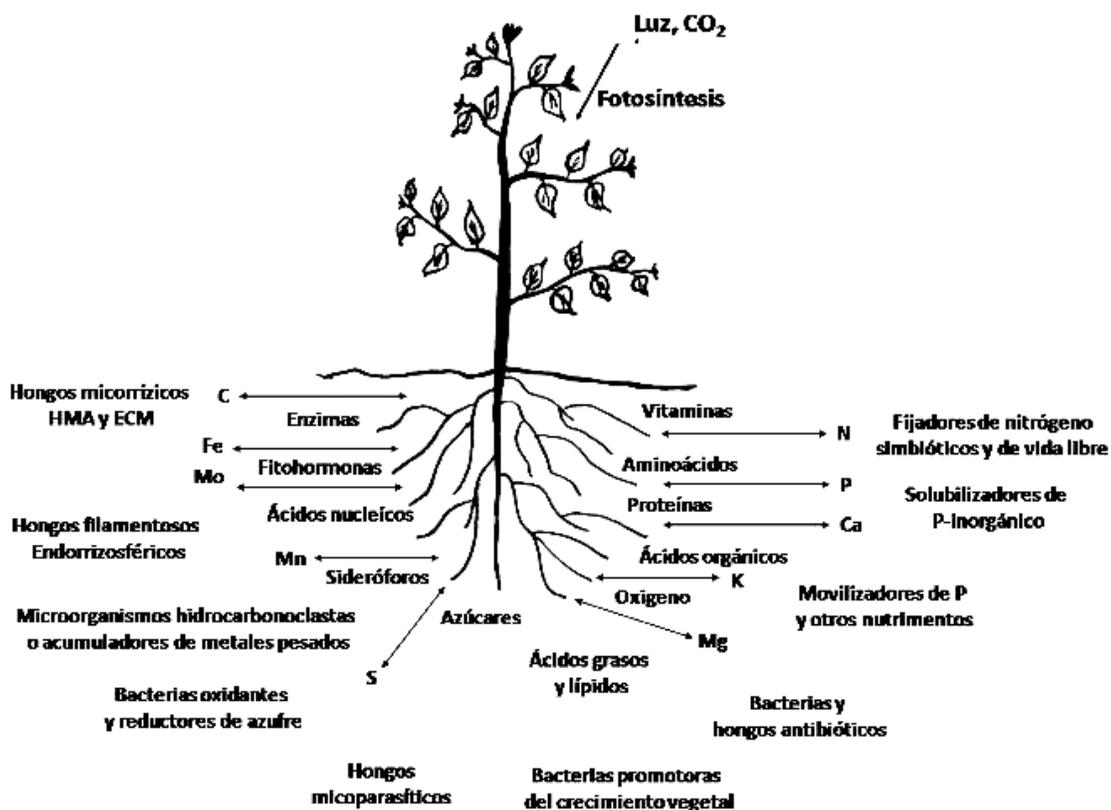


Figura 8. Interacciones en la rizosfera y exudados radicales (Ferrera-Cerrato y Alarcón, 2007).

Cuadro 4. Exudados radicales de importancia para la nutrición vegetal y microbiológica.

Ejemplo	Función reportada
Carbohidratos	
Arabinosa, glucosa, fructuosa, galactosa, maltosa, ramosa, ribosa, sucrosa y ribosa	Proveer ambiente favorable para el crecimiento de microorganismo
Aminoácidos y aminas	
Aminoácidos proteicos (20 existentes), ácido amino butírico, homoserina, cistationina y ácido mugineico	Inhibidor de nematodos
Ácidos alifáticos	
Fórmico, acético, butírico, propiónico, maleico, cítrico, isocítrico, oxálico, fumárico, malónico,	Reguladores del crecimiento de la planta y efecto inhibidor

succínico, tartárico, oxaloacético, pirúvico, oxalogutárico, glicólico, chiquímico, acetónico, valerico, glucónico	
Ácidos aromáticos	
p-hidroxibenzoico, cafeico, p-cumárico, ferúlico, gálico, gentísico, protocatecuico, salicílico, sináptico, siringico	Efecto estimulante, dependiente de la concentración de prueba
Fenólicos varios	
Flavonoides, flavonas, flavononas, antocianininas, isoflavonoides	Inhibidor o estimulante del crecimiento dependiendo de la concentración de prueba
Ácidos grasos	
Linoleico, linolénico, oleico, palmítico, esteárico	Reguladores de crecimiento
Esteroides	
Compesterol, colesterol, sitosterol, estigmasterol	Reguladores de crecimiento

Fuente: Oliveros-Bastidas *et al.*, 2009

3.5. Tecnologías biológicas de recuperación de suelos con petróleo

Las tecnologías por el instrumento a utilizar en el proceso de descontaminación del suelo se clasifican en físicas, químicas y biológicas. Las biológicas utilizan plantas y microorganismos para remediar al suelo y se clasifican en; biorremediación, fitorremediación, atenuación natural, bioaumentación, bioventeo, bio-pilas, bioestimulación y biolabranza (Chan- Quijano *et al.*, 2015; Hussain *et al.*, 2018). La biorremediación y la fitorremediación tienen mejor potencial para la ingeniería del ambiente (Hussain *et al.*, 2018).

3.5.1. Biorremediación

Ma *et al.* (2016) y Hussain *et al.* (2018); describen a esta tecnología como natural, amigable con el medio ambiente, económica, sostenible y de bajo costo, al ser no invasiva es una solución permanente que puede finalizar con degradación o transformación de contaminantes ambientales en formas más inocuas o menos tóxicas. Esta tecnología logra transformar contaminantes orgánicos en productos más inocuos

como dióxido de carbono y agua. Esta tecnología tiene capacidad de eliminar contaminantes orgánicos e inorgánicos, en especial cuando se utiliza de manera combinada con otras tecnologías (Liu *et al*, 2017). Su aplicación es *in situ* o *ex situ* en superficie de suelo pequeñas y extensas (Dziona *et al*, 2016). Su eficiencia dependerá de algunos factores como pH, temperatura, peso molecular de los ácidos orgánicos y ácidos húmicos, valencia de los metales pesados, biodisponibilidad de los HAP y toxicidad de estos hacia la microbiota (Liu *et al*, 2017).

3.5.2. Fitorremediación

La fitorremediación es descrita por Sarma. (2011) como el aprovechamiento de especies vegetales seleccionadas y su microbiota específica, que en conjunto limpian y desintoxican contaminantes ambientales en suelos, agua y aire. La fitorremediación se sustentan en los mecanismos fisiológicos básicos de las plantas y microbiota asociada a ellas, como transpiración, fotosíntesis, metabolismo y nutrición (Thangavel y Subhuram, 2004; Delgadillo-López *et al.*, 2011).

En la fitorremediación se utilizan plantas que no muestren síntomas de toxicidad al contaminante objeto de tratar, así como con un sistema rizosferico colonizado por microorganismos que metabolicen moléculas orgánicas e inorgánicas no deseadas en el suelo, sedimento y agua. La selección de la planta con las características anteriores depende el éxito de la fitorremediación (USEPA-3540C 1996).

La selección de las especies contempla algunos criterios (Sarma, 2011) como; (a) los niveles de tolerancia con respecto al metal e hidrocarburos (b) el nivel de acumulación, translocación, y absorción del contaminante, (c) tolerancia a condiciones de sequía o encharcamientos extremos. (d) tolerancia alta salinidad o pH, e) profundidad de la zona radical y las características propias de la raíz. En el Cuadro 5, se muestran los mecanismos implicados en la fitorremediación.

Cuadro 5. Tecnologías y mecanismos implicados en la fitorremediación.

Técnica.	Contaminante objetivo.	Mecanismo.	Contaminante.
Fitoextracción.	Elementos traza, radio nucleótidos, elementos preciosos incluidos el oro, níquel y taladio.	Hiperacumulación	Orgánicos.
Rizofiltración.	Arroyos contaminados y aguas residuales contaminados con melates y radionucleotidos.	Adsorción y absorción de contaminantes e agua (radical)	Orgánicos e inorgánicos.
Fitoestabilización.	Metales y radio nucleótidos.	Complejación	Orgánicos e inorgánicos.
Fitovolatilización.	Compuestos orgánicos volátiles (VOCs) y radio nucleótidos.	volatilización a través de las hojas.	Orgánicos e inorgánicos
Fitodesalación.	Sales.		
Fitodegradación.	TNT, MTBE, TCE and TPHs.	Degradación (asociación planta – microorganismos)	Orgánicos.
Rizorremediación.	TPHs, PAHs, PCBs, DDTs, pesticidas.	Degradación.	
Fitoimmobilización.		Acumulación en la rizosfera	Orgánicos e inorgánicos.

Fuente: Delgadillo- López *et al.*, 2011; Hussain *et al.*, 2018.

3.5.2.1. Ventajas y desventajas de la fitorremediación

Ventajas de la fitorremediación. A. Se realiza *In situ* o *Ex site*. B. Es *ecofriendly*. C. Baja dispersión de los contaminantes a otros ambientes como el aéreo. D. Funciona de manera eficiente con contaminantes orgánicos e inorgánicos. E. Bajos costes. F. No requiere personal especializado para su manejo. G. Las practicas agronómicas requeridas son convencionales y pocas. H. Actúa de manera positiva sobre las propiedades físicas y químicas del suelo, al mejorar la cobertura vegetal. I. Es estéticamente agradable y por ende mayor aceptación por la población afectada. J. Al evitarse la excavación también evita el tráfico pesado. K. Permite el reciclaje de biomasa, agua y minerales. L. Se puede emplear en agua, suelo y sedimentos (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Ghosh y Singh, 2005)

Desventajas de la fitorremediación. A. Es un proceso relativamente lento (en especial con árboles y arbustos. B. Se restringe a sitios de contaminación superficial dentro de la zona rizosferica. C. El crecimiento de las plantas está limitado por las concentraciones del contaminante. D. Se cree que los contaminantes en las hojas pueden ser liberados al ambiente por medio de la fitovolatilización y por combustión los acumulados en la madera. E. No todas las especies vegetales tienen la capacidad de bioacumular o tolerar contaminantes tóxicos. F. Aumenta la solubilidad de los contaminantes y su posible migración. G. Se ha encontrado la diseminación de plagas como mosquitos en ambientes acuáticos remediados (Delgadillo-López *et al.*, 2011; Ghosh y Singh, 2005)

3.5.3 Rutas de degradación de hidrocarburos del petróleo

El metabolismo de los hidrocarburos del petróleo bajo condiciones aeróbicas es realizado en el suelo y la rizosfera por microorganismos que utilizan como fuente de carbono y energía a los hidrocarburos del petróleo, que los oxidan a metabolitos intermedios y en el mejor de los casos a CO₂ y H₂O (Madigan *et al.*, 2015). En la Figura 9 se observa la ruta de degradación de un alcano, Las etapas de oxidación de los compuestos alcano están determinadas por la acción de enzimas catalizadoras: las oxigenasas. Existen dos tipos de éstas: dioxigenasas y monooxigenasas.

Las primeras catalizan la incorporación del oxígeno molecular (O_2) completo, es decir, sus dos átomos de oxígeno entran en la molécula original (n-Octanol). Mientras que las monooxigenasas se encargan de catalizar la incorporación de un solo átomo de los dos que posee el oxígeno molecular y el átomo restante de oxígeno lo reduce a agua (H_2O) formando n-octanal y ácido n-octánico para integrarlo a la ruta de beta-oxidación y reducirlo a Acetil-CoA (Figura 9), El Acetil-CoA se incorpora al ciclo tricarbocílico produciendo CO_2 , H_2O y ATP (Madigan *et al.*, 2015). Ejemplos de microorganismos capaces de llevar a cabo este tipo de degradación principalmente, son: *Mycobacterium*, *Pseudomonas* y *Nocardia* (Madigan *et al.*, 2015; Castillo *et al.*, 2005).

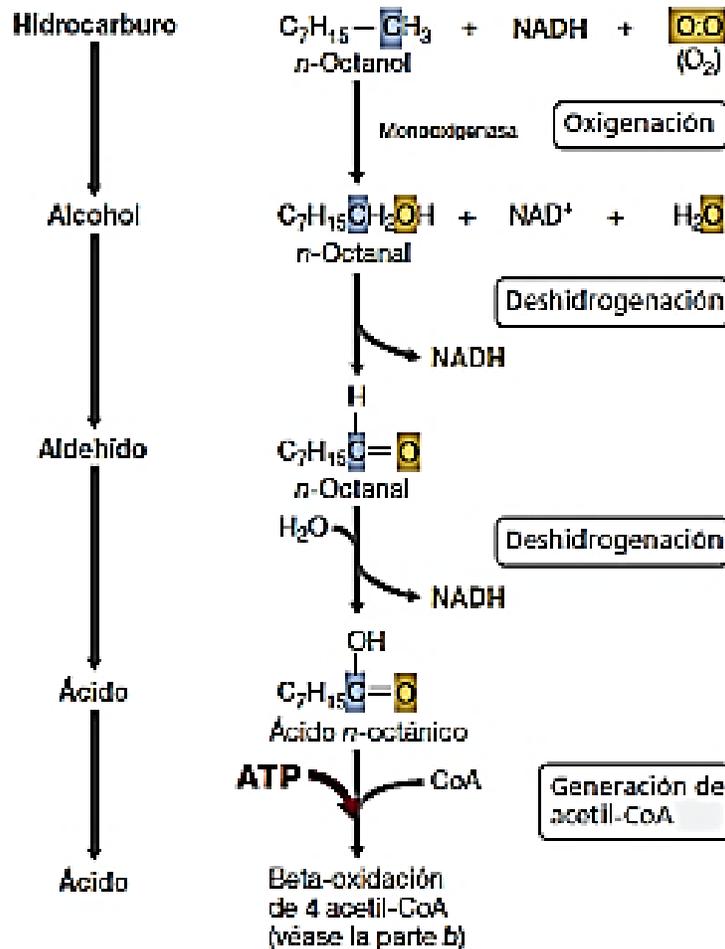
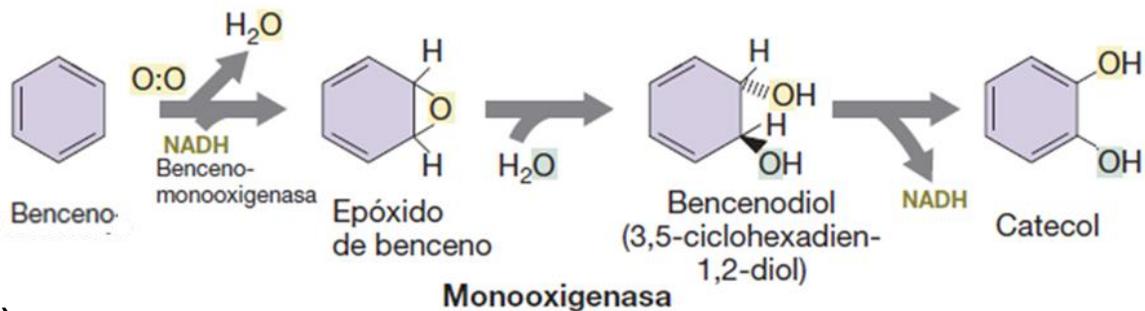


Figura 9. Etapas de la oxidación de un hidrocarburo alifático (Madigan *et al.*, 2015)

La oxidación del benceno inicia incorporando un átomo de O₂ en uno de los carbonos terminales por acción de la monooxigenasa y el NADH como donador de electrones pasando a epóxido de benceno, incorporándose una molécula de H₂O y dando lugar a 3,5 -ciclohexadien-1,2-diol, para oxidarse a catecol. A partir del catecol formado se le adicionaran dos átomos de oxígeno por medio de las dioxigenasas, este se oxidará a Catecoldioxetano, para luego ser cortado a Cis—Cis--Muconato, cuando la dioxigenasa corta el anillo intradiol formado (Figura 10A). Este ácido graso mediante el ciclo de la beta- oxidación será oxidado a Acetil CoA y posteriormente pasa al ciclo de Krebs en donde sucede la oxidación completa formando CO₂ + ATP, estos electrones entraran a la cadena de transporte de electrones o se ocuparan en la formación de nuevo material celular (Mandigan *et al.*, 2015).

La degradación del fenantreno hidrocarburo policíclico aromático de tres anillo bencénicos es hidroxilado por NADH a través de hongos no lignolíticos (*A.terreus* y *Cylothyrrium sp.* CBS109850, *Trichoderma*) a hidroxifenantreno, sulfatos, derivados del fenantreno y hidroxisulfatos (Figura 10B). El mecanismo de degradación de los PAHs principalmente incluye la acumulación intracelular del contaminante (Verdin *et al.*, 2005; Fayeulle *et al.*, 2014). De igual forma de manera extracelular enzimas como la “lacasa” producida por algunos hongos pueden mediar la degradación de PAHs (Wu *et al.*, 2010). Y dependiendo de las enzimas secretadas por cada organismo, será la región bahía atacada microbiológicamente, en el caso del fenantreno la región “K” será la involucrada en la bahía (Reyes-César *et al.*, 2014).



A)

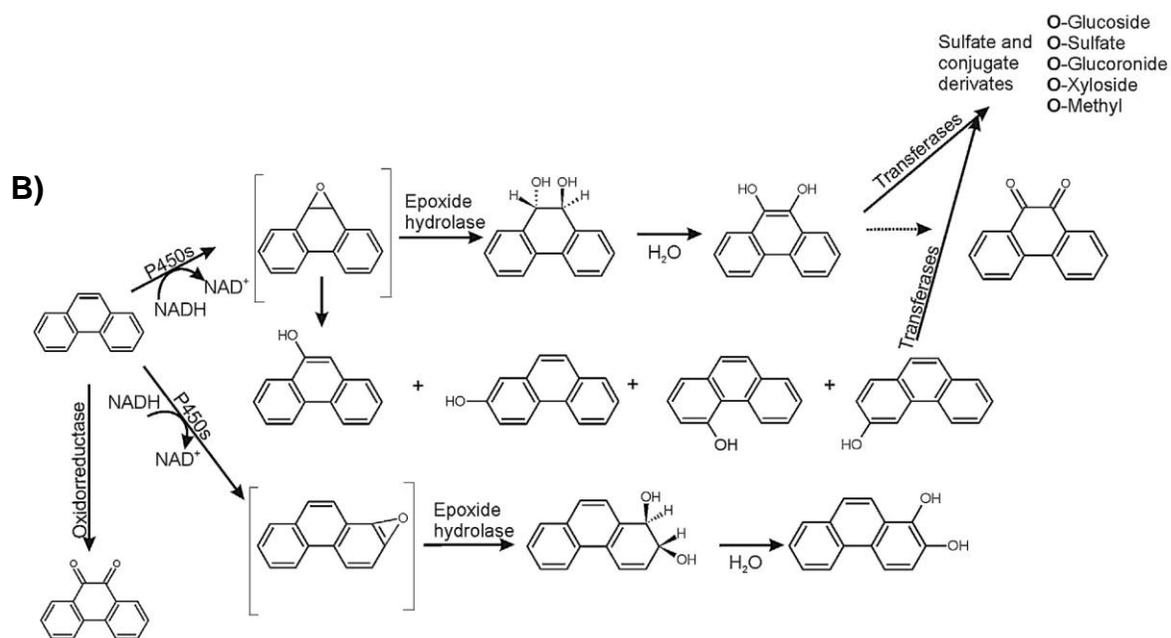
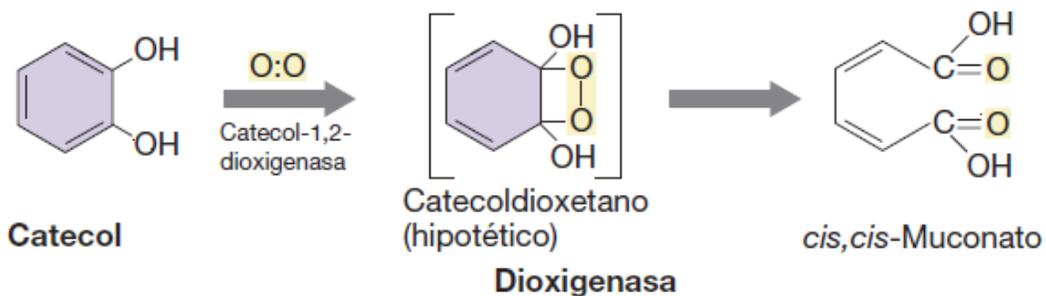


Figura 10. A) Oxidación de un compuesto aromático mediado por monooxigenasa y dioxigenasa (Madigan *et al.*, 2015). B) Degradación del fenantreno por hongos no lignolíticos (Marco-Urrea *et al.*, 2015).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación es Ciencia Básica Aplicada y pertenece a la línea de conocimiento Manejo Sustentable de los Recursos Naturales para la Producción Agroalimentaria del Trópico (PROPAT). Se realizó en las instalaciones del Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco, ubicado en Periférico Carlos A. Molina S/N, Km. 3.5, Huimanguillo, Tabasco. El proceso de investigación se efectuó en tres etapas secuenciales: Etapa I. Trabajo en campo e invernadero. Etapa II. Trabajo en laboratorio. Etapa III. Análisis estadístico y escritura de tesis (Figura 11).

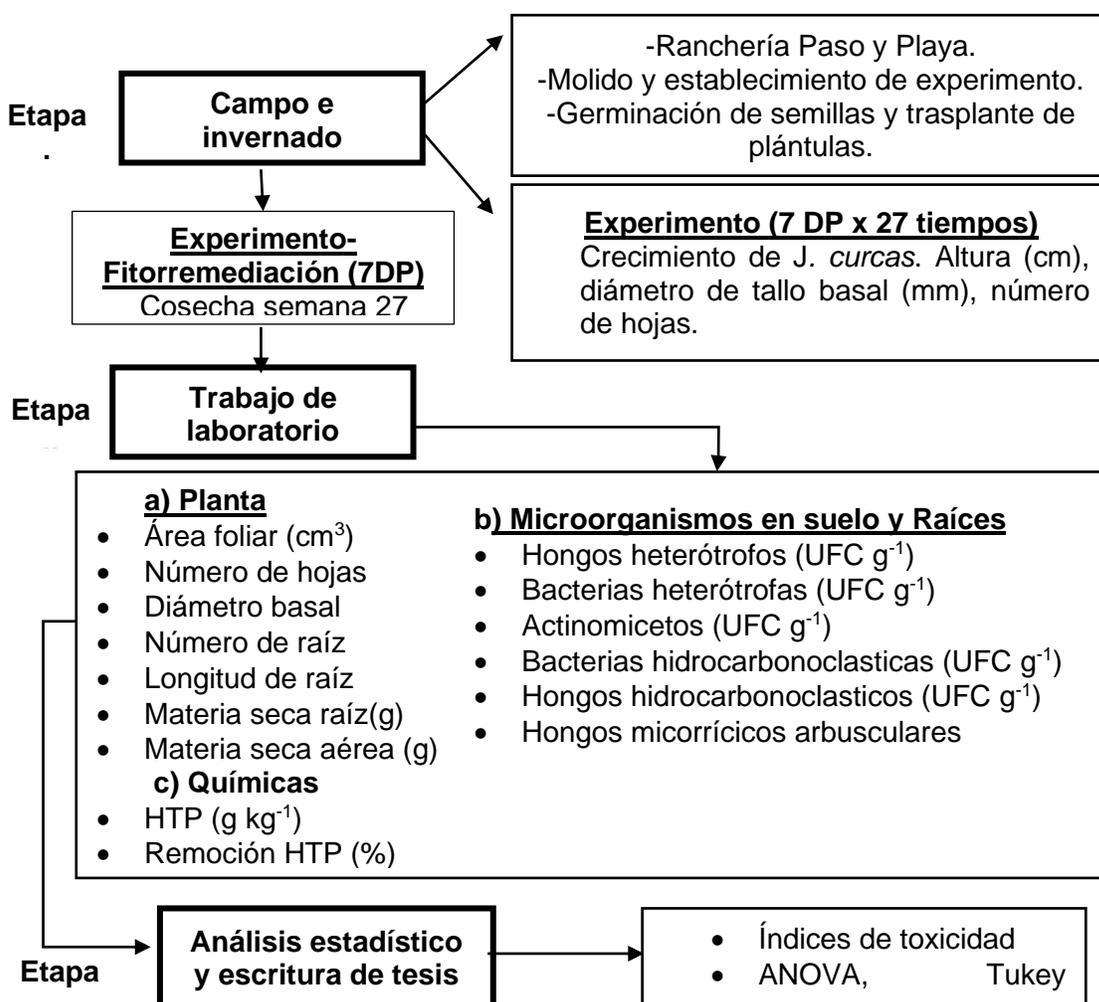


Figura 11. Flujo grama del proceso de investigación. DP= dosis de petróleo.

4.1. Trabajo en campo e invernadero

4.1.1 Características del suelo

El suelo Gleysol se colectó del horizonte superficial (0-30cm) en el ejido Paso y playa del km 2 de la carretera federal Cárdenas Huimanguillo. Sitio que se encuentra bajo las coordenadas geográficas latitud 17°57'42.52''N y longitud 93°21'41.5097''W. Las características del suelo son; textura franco arcilloso, pH neutro (6.4), CE 0.3 dS/m, 6.1% MOS, N inorgánico 55.5 mg/kg y 102.4 mg/kg de hidrocarburos totales del petróleo (Rodríguez-Uribe *et al.*, 2021). Se colectaron 200 kg de suelo y se trasladó a las instalaciones del Colegio de Posgraduados, Campus Tabasco. El suelo fue secado bajo sombra a temperatura ambiente y aeración natural, una vez seco se le retiró de forma manual fragmentos para su posterior molido y tamizado en malla metálica de 5 mL de abertura.

4.1.2. Propagación de *Jatropha curcas* L

Se utilizó semilla de *Jatropha curcas* proporcionada por el Dr. Jorge Martínez Herrera, originaria de Pueblillo, Papantla del Estado de Veracruz, el cual se encuentra bajo las coordenadas geográficas en Latitud N 20° 15' 09" y O 97°15'13", 80 m de altitud, región cálida subhúmeda con lluvias en verano con precipitación anual de 1500 mm y suelo de tipo Regosol Calcáreo (INEGI, 2001; Martínez-Herrera *et al.*, 2006), las semillas fueron de la cosecha de otoño de 2020. Las semillas se cultivaron en Colegio de Postgraduados Campus Tabasco bajo condiciones de micro túnel. Se establecieron en charolas con suelo por 22 días hasta la formación de plántulas con altura 13 ± 2.7 cm antes del trasplante en unidades experimentales.

4.1.3. Petróleo fresco

El petróleo crudo (PC) utilizado en el experimento es extra Ligero "Olmeca", con 31.27° grados API y densidad 0.816. Proviene del campo petrolero SEN, Nacajuca Tabasco.

4.1.4. Diseño y configuración experimental

Se estableció el experimento para evaluar el comportamiento de *J. curcas*, el cual consistió en un diseño unifactorial de una sola vía con medidas repetidas en el tiempo, con el objetivo de dar seguimiento al crecimiento de *J. curcas* a través del tiempo, las evaluaciones se realizaron cada semana por 27 semanas. Las dosis de PC evaluadas fueron; 0, 4, 14, 29, 42, 56 y 75 g/kg. Fueron siete tratamientos con cuatro repeticiones para un total de 28 unidades experimentales.

Y con el objetivo de evaluar el potencial de *J. curcas* en la fitorremediación del suelo con PC, se estableció un segundo experimento por 27 semanas bajo un diseño unifactorial de una sola vía. Dosis de PC; 0, 4, 14, 29, 42, 56 y 75 g/kg. Fueron siete tratamientos con cuatro repeticiones en total 28 unidades experimentales

4.1.4.1. Preparación de las unidades experimentales.

La unidad experimental (UE) consistió en un contenedor 19 x 13 x 20.5 cm (altura, base y superior), con capacidad de 2.700 kg de suelo preparado con la concentración de PC según tratamiento. La preparación del suelo incluyó molido, tamizado y homogenizado antes de agregarle el PC. Para las concentraciones de PC, se pesó los diversos gramos de crudo en una balanza digital marca Ohaus (200g de capacidad). El suelo fue mezclado con el PC en las diversas concentraciones dentro de charolas de plástico y homogenizado perfectamente, posteriormente la muestra fue colocada en las unidades experimentales (Figura 12). Una vez estabilizado el suelo a las 24 hrs, se tomó una muestra de cada UE, para determinar el contenido inicial de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de acuerdo a lo establecido en el método EPA para extracción 418.1 (EPA, 1986).



Figura 12. Preparación de suelo con dosis de petróleo fresco. A) Peso de petróleo en balanza semi-analítica. B) Mezcla de petróleo-suelo.

4.2. Establecimiento del experimento

Se estableció un diseño experimental completamente aleatorizado unifactorial. El factor de estudio fue la concentración de PC en dosis de 0, 4, 14, 29, 42, 56, 75 g/kg suelo seco, en total se analizaron siete tratamientos con cuatro repeticiones, 28 unidades experimentales (UE). Para dar seguimiento al crecimiento a través del tiempo (cada semana) se utilizó un diseño en medidas repetidas completamente al azar.

Dos plántulas de *J. curcas* de 22 días de edad y altura 13 ± 2.7 cm se trasplantaron en cada una de las 28 UE (Figura 13). A los 15 días después del trasplante se retiró una planta, quedo solo una planta por UE (Figura 13). El experimento se estableció sobre mesas metálicas colocadas dentro de un micro-túnel (Figura 14) del Área de Ciencias ambiental, laboratorio de Microbiología Agrícola y Ambiental, Colegio de Postgraduados. El micro-túnel se encontraba bajo condiciones controladas de lluvia, durante un periodo de 27 semanas de evaluación. La humedad del suelo se mantuvo bajo riego diario a capacidad de campo del 32% para la estimulación del crecimiento vegetal, el establecimiento de microbiota en el suelo y la degradación del PC.



Figura 13. Plántulas de *J. curcas* en charolas antes del trasplante y en unidades experimentales en micro-túnel.



Figura 14. Diseños experimentales con distribución completamente azar bajo condiciones controladas de lluvias (micro-túnel).

4.3. Seguimiento de crecimiento de *Jatropha curcas* L.

El crecimiento de *J. curcas* fue evaluado cada semana por 27 tiempos después del trasplante. Los parámetros de crecimiento a los que se les dio seguimiento son: altura de planta (AP), diámetro basal de tallo (5cm) (DB), número de hojas en plantas total (NHT) (incluye caídas y permanentes), y número de hojas caídas (NHC). AP se midió con una regla graduada en cm desde la base inmediata del suelo hasta el meristemo apical (Figura 15A). El DB se midió de manera directa con un vernier digital marca Steren, en milímetros de longitud y precisión de ± 0.1 mm (Figura 15B). El NHT y NHC fue conteo directo. Las hojas caídas se colectaron cada semana y expuestas a 65°C de temperatura en horno.



Figura 15. Crecimiento de *Jatropha curcas*. A). Altura de planta usando regla graduada en cm, y B) Diámetro basal (vernier).

4.3.1 Levantamiento de experimento

A la semana 27 después de establecido el experimento de fitorremediación cada UE fue cosechada, estas se colectaron en partes separadas; material aéreo (Figura 16A, b), suelo rizosférico (Figura 16C, D), tallos (Figura 16E), material radical (Figura 16F).

El suelo rizosférico fue homogenizado y se tomaron muestras para analizar parámetros químicos y microbiológicos. Las muestras para microorganismos se conservaron a 4°C bajo condiciones de temperatura y las muestras para evaluar hidrocarburos totales del petróleo final se congelaron hasta su procesamiento.

Las raíces frescas se lavaron con agua potable y se depositaron en bolsas de polietileno, se almacenaron en refrigeración a una temperatura de 4°C hasta su procesamiento. El material aéreo se introdujo en bolsas de papel y se secó en horno a 72°C de temperatura por 98 horas y se procedió al pesado.

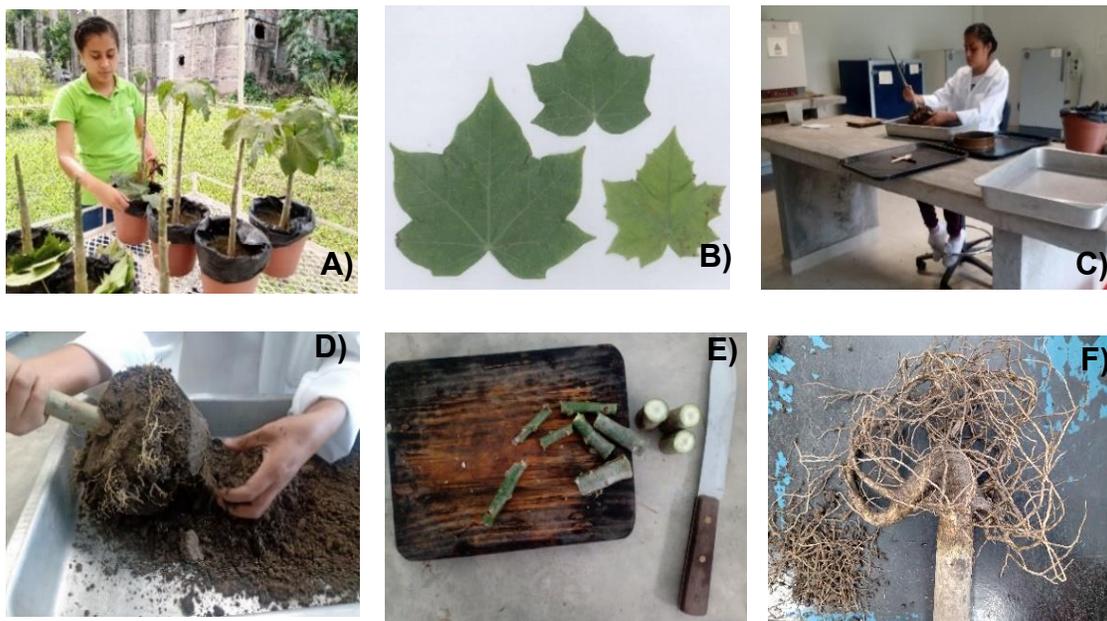


Figura 16. Levantamiento de experimento a las 27 semanas de crecimiento de *J. curcas* en suelo con dosis de petróleo. A) Desplante. B) Material aéreo. C), D) Suelo rizosférico. E) Tallos. F) Material radical.

4.4. Etapa II. Trabajo de laboratorio

4.4.1. Variables en planta

4.4.1.1. Área foliar

El área foliar (cm^2) (AF) fue determinada para el total de hojas que permanecieron en la planta a la semana 27 de cada unidad experimental y se realizó de manera directa usando un medidor de área foliar modelo LI-3100C, *LI-COR BioSciences, Lincoln, NE, USA*.

4.4.1.2. Longitud y número de raíces

La longitud de raíz (LR) fue directa usando cinta métrica graduada en mm. El número de raíces totales frescas (NRT) que incluyo primarias, secundarias, terciarias y cuaternarias se contaron directamente a la semana 27 después del lavado.

4.4.1.3. Materia seca aérea y radical (g)

La materia seca de raíz (MSR) y aérea (MSA) se evaluó a la semana 27 (mes seis) después del trasplante. El material fresco de raíz y aéreo por UE y separado (Figura 17A, B) se sometió a secado en una estufa de circulación de aire forzado durante 72 horas a 72 °C y posteriormente fue pesada en balanza semi- analítica (Ohaus, modelo Scout Pro SP202). A la MSA se sumó el peso de las hojas caídas colectadas por 27 semanas. Los resultados se expresaron en gramos (Figura 17c).



Figura 17. Materia radical y aérea de *J. curcas* a 27 semanas. A) Corte de hojas. B) Separación de tallo-raíz. C) Peso de material radical y aéreo.

4.4.2. Variables microbiológicas en rizosfera

A la semana 27 se colectó de las 28 UE suelo rizosferico sometido a fitorremediación. De muestras frescas se les determinó el porcentaje de humedad y la unidad formadora de colonias (UFC) de los principales grupos microbiológicos; bacterias heterótrofas, hongos heterótrofos, actinomicetos, bacterias hidrocabonoclasticas y hongos micorrícicos arbusculares en raíz usando las técnicas que se describen a continuación.

4.4.2.1. Población de microorganismos

La técnica para evaluar población de bacterias y hongos de vida libre en forma de unidades formadoras de colonia (UFC g⁻¹ rizosfera seca) fue la cuenta viable por dilución seriada en placa de agar (Figura 18) (Madigan *et al.*, 2015).

El procedimiento se realizó de la siguiente manera: (1) diluir 10g de rizosfera en 90 ml de H₂O₂ estéril (dilución madre). (2) agitar por 10'. (3) tomar un ml de la solución madre e inocularlo a 9 ml de H₂O para formar 10⁻¹, de esta dilución tomar 1 ml e inocular en 9 ml de H₂O, repetir y obtener dilución 10⁻³, 10⁻⁴ y 10⁻⁵. (4) tomar 0.1 ml de cada dilución y depositarla por triplicado sobre el medio de cultivo correspondiente. (5) Incubar a 28°C por 96 horas. (6) Contar UFC que crecieron sobre el medio de cultivo (Figura 18). Para el reporte de las UFC (g⁻¹ r.s) de aplicó la fórmula siguiente:

$$UFC\ g^{-1}\ r.s = \frac{N.C.D \times P.R.S}{P.R.H}$$

Donde UFC g⁻¹ s.r= Unidades formadoras de colonias en gramos de rizosfera seca
N.C.D= Número de colonias por dilución. P.S.S= Peso de rizosfera seca. P.S.H= Peso de rizosfera húmeda (Díaz, 2006).

4.4.3 Medios de cultivos para bacterias y hongos

Los medios de cultivos y su composición fueron:

1. Bacterias heterótrofas en medio agar nutriente formulado por peptona de carne (5 g/L), Extracto de carne (3 g/L), Agar-Agar (12 g/L) (Johnson y Carl, 1972).
2. Actinomicetos totales, se utilizó medio de cultivo Czapek- Nitrate agar (Coon, 1021) formulado con; NaNO₃ (2g), K₂HPO₄ (1g), MgSO₄* 7H₂O (0.5g), KCl (0.5g), FeSO₄ * 7H₂O (10mg), Sacarosa (30 g) y Agar (15 g) y agua destilada (1000ml) (Johnson y Carl, 1972).
3. Hongos heterótrofos en medio de cultivo de papa dextrosa agar (Baker®) (Johnson y Carl, 1972) formulado con; papa (peled o silice) (200g), dextrosa (20g),

agar (15 g) y agua destilada (1000mL). Se utilizó el colorante de rosa de bengala con fenol para distinguir las unidades formadoras de colonias de hongos.

4. Bacterias hidrocarbonoclasticas se empleó el medio Bushnel Haas de acuerdo a Fernández- Linares *et al.*, (2006). El cual contiene un medio basal compuesto por KH_2PO_4 (1 g/L), K_2HPO_4 (1 g/L), NH_4NO_3 (1 g/L), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.2 g/L), FeCl_3 (0.005 g/L), $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (0.002 g/L), Acetato de sodio (2 g/L), Agar (15 g/L), pH 7 ± 0.2 más dos soluciones shock a 10x: solución 1 CaCl_2 (0.2g), + Agua destilada (10 ml). Solución shock 2: FeCl_3 (0.5 g) + Agua destilada (10 ml), y 50 μL de PC por caja petrí (Figura 19)
5. Hongos hidrocarbonoclasticos en medio de cultivo mineral celulosa agar (Johnson y Carl, 1972) formulado con extracto de levadura (0.5 g) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.5g), KH_2PO_4 (0.5g), KCl (0.2g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.1g) y petróleo crudo (0.05 mL), agar (15 g) agua destilada (1000 mL), y tiamina (1 mL), ajustar el pH (6).



Figura 18. Procedimiento de cuenta viable por dilución seriada en placa de agar. A) muestras de rizosfera. B) Pesado de rizosfera. C) Dilución madre. D) Agitación. E) Dilución seriada. F) Alícuota en placa. G) Distribución de alícuota. H) Incubación. I) Conteo de UFC (Madigan *et al.*, 2015)



Figura 19. Procedimiento para preparar medio de cultivo específico para microorganismos hidrocarbonoclasticos. A) Preparación y vaciado de medio de cultivo en placa. B) Esterilizado de PC. C) Impregnado de PC sobre placa de cultivo. D) Distribución de PC. E) Cajas petrí con medios de cultivo impregnado con PC.

4.4.4 Hongos micorrícicos versículo arbuscular

La colonización de hongo micorrícico arbuscular en raíz de *Jatropha curcas* L, se realizó a las 27 semanas de crecimiento. Mediante la evaluación del porcentaje de colonización de estructuras intraradicales (hifas, arbusculos, vesículas y esporas). La técnica utilizada fue de aclareo y tinción de Philips y Hayman (1970) (modificada). Y observadas al microscopio a 40x. La fórmula para determinar el porcentaje de colonización a base de frecuencias es la siguiente.

$$\% \text{ Colonizacion} = \frac{NMR}{NRO} \times 100$$

Donde:

NMR= Número de raíces colonizadas

NRO= Número de raíces observadas.

El proceso consiste en: 1) Preparación y selección de raíces frescas, 2) Aclareo, tinción y montaje en microscopio.

4.4.4.1. Preparación y selección de raíces

Las raíces de *J. curcas* se lavaron con agua potable para retirar el residuo de suelo, se seleccionaron las raíces más finas y delgadas, tanto terciarias como cuaternarias, cortando segmentos de 1.5 cm aproximadamente de longitud de cada una de ellas. Después se procedió a ser colocadas sobre un paño de gasa y colocadas dentro de una capsula para realizar todo el proceso secuencial de aclareo y tinción (Figura 20 a, b, c) respectivamente.

4.4.4.2 Aclareo, tinción y montaje en microscopio.

Las muestras de raíces dentro de la capsulas se clarearon con KOH al 10% por 60 horas a temperatura ambiente (28 a 30°C) (Figura 20a, b, c), al terminar el tiempo se procede a enjuagar las raíces con agua potable, inmediatamente las raíces se exponen a peróxido de hidrogeno al 3% por diez minutos, pasado el tiempo enjuagar en agua corriente y posterior adicionar HCl al 10% por cinco minutos, para proceder a enjuagar en agua

potable. Seguidamente fueron inmersas en azul tripano al 0.05% durante 72 horas. Pasado el tiempo se desechó el azul de tripano y se sumergieron en lactoglicerol a 4°C para eliminar el exceso de colorante, hasta su observación en microscopio (Philips y Hayman, 1970) (modificada) (Figura 20 d, e, f) respectivamente.

Las raíces teñidas se montaron en un portaobjetos con ayuda de una pinza y aguja y se agregaron gotas de lactoglicerol para su mejor lectura (Figura 20 g). Se colocaron 15 raíces por portaobjetos y dos repeticiones por unidad experimental que fueron llevadas al microscopio compuesto digital marca Motic Digital Microscope DMB3-223 con el objetivo 40x, para realizar 3 barridos, en un total de 45 observaciones por portaobjetos (Figura 20 h)

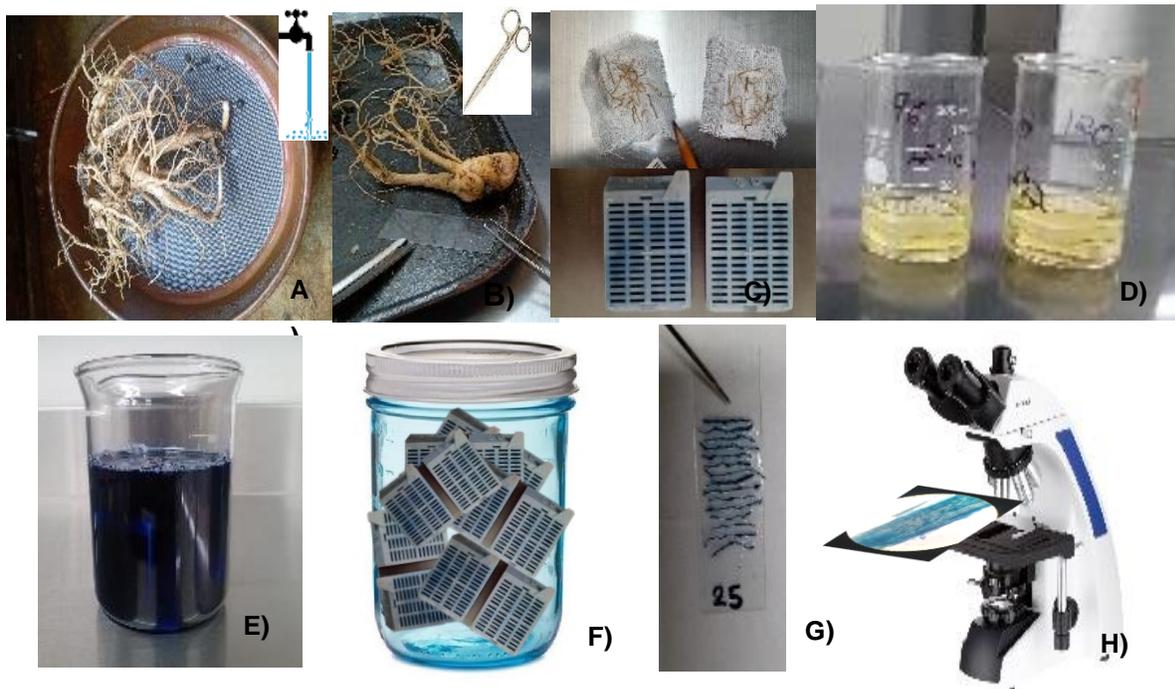


Figura 20. Procedimiento de preparación y lectura de estructuras fúngicas de la micorriza vesículo arbuscular A) Lavado de raíces. B) Selección y corte de raíces. C) Montaje en capsula. D) Decoloración E) Tinción. F) Preservación. G) Montaje en portaobjetos. H) Lectura en microscopio.

4.4.5. Variables químicas

4.4.5.1. Remoción de Hidrocarburos Totales de Petróleo

La determinación de la remoción de PC se realizó determinando el porcentaje de pérdida de hidrocarburos totales del petróleo (HTP) de la rizosfera a la semana 27 respecto a los HTP iniciales. La extracción de los HTP se realizó en equipo soxhlet (EPA, 1996) (Figura 21), se utilizó el diclorometano con 99.5% de pureza. Se utilizó 10 g de muestra de suelo (húmedo) y sometió a reflujo en dedales durante 8 h, en el equipo soxhlet, el sobrenadante se concentró en matraces con un rota vapor. Los matraces más PC permanecieron por 24 horas en desecador. La concentración de HTP residual se calculó según la ecuación siguiente:

$$\text{HTP}_{(g/kg \text{ suelo seco})} = \frac{(\text{HTP}'s \text{ g})(1000 \text{ g kg})}{P_s \text{ g}}$$

Dónde: HTP= (PM+HTP extraídos del suelo) – (PM) PM= peso del matraz de extracción a peso constante. Ps= peso del suelo de extracción, de acuerdo al método analítico indicado en la norma mexicana NMX-AA-134-SCFI (DOF, 2006).

El porcentaje de remoción de HTP se determinó mediante la fórmula:

$$\% \text{ de remoción de HTP SS} = \frac{Psuelo \text{ seco} * Remocion}{10}$$



Figura 21. Extracción con equipo soxhlet y cuantificación gravimétrica de hidrocarburos totales de petróleo.

4.5. Etapa III. Análisis estadísticos

4.5.1. Índices de toxicidad al petróleo

El índice relativo de toxicidad a la semana 27 se realizó para cada una de las variables de crecimiento (altura, diámetro basal, hojas totales, área de hoja, longitud de raíz, número de raíz) y producción: materia seca radical (MSR) y materia seca aérea (MSA) de *J. curcas*. Se aplicó la fórmula 1.

$$IRT(x) = T_p R_n / T_t R_m \quad (1)$$

El índice absoluto de toxicidad para crecimiento (IATC) consiste en la sumatoria total de los IRT de las variables altura, diámetro basal, hojas totales, área de hoja, raíz (longitud), raíz (numero), y se aplica la fórmula 2. El índice absoluto de toxicidad para producción (IATP) consiste en la sumatoria de las variables materia seca radical (MSR) y materia seca aérea (MSA), se aplicó la fórmula 3.

$$IATC = \frac{\sum_{i=1}^n IRTc(x)}{n} \quad i= 1,2,\dots,t \quad (2)$$

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

IT=

donde:

IRT(x): índice relativo de toxicidad para la variable x

IATC: índice absoluto de toxicidad para crecimiento.

IATP: índice absoluto de toxicidad para producción

Tp: tratamiento con HTP

Tt: Tratamiento testigo

Rn: repetición 1...n

Rm: Media global del tratamiento testigo

n: número de variables

Si IR es igual que 0, los HTP no afectan la variable en ningún sentido.

Si IR es menor a 0, los HTP producen efectos negativos sobre la variable

Si IR es mayor a 0, los HTP incrementan la expresión de la variable.

4.5.2 Análisis de varianza y correlación de variables

El análisis estadístico empleado en el experimento uno para analizar los datos de altura de planta, diámetro basal de tallo y número de hojas considerando la dosis de PC (siete) y tiempo (27 semanas) fue un ANOVA unifactorial con medida repetidas en el tiempo. Para el experimento dos el ANOVA unifactorial se empleó en el caso de número de hojas, área foliar, lamina foliar, número de raíces, longitud de raíz, materia seca raíz, materia seca aérea, población de bacterias heterótrofos, hongos heterótrofos, actinomicetos, bacterias hidrocarbonoclasticas y hongos hidrocarbonoclasticos, del mismo modo,

porcentaje de hifas, arbúsculos, vesículas, esporas intraradical, colonización total HMA, remoción de HTP, índices relativos de toxicidad fisiológico e índice absoluto de toxicidad del PC.

El modelo estadístico para realizar los análisis cuantitativos incluidos en este estudio se muestra en la fórmula cuatro. El objetivo fue encontrar diferencias entre los tratamientos, diferentes dosis de petróleo en el efecto sobre las diferentes variables respuesta.

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ijk} \quad (4)$$
$$i=1,2,\dots,a \quad j=1,2,\dots,b \quad k=1,2,\dots,c$$

Donde

y_{ijk} : es la variable respuesta de interés.

μ : es la media general para todos los tratamientos

τ_i : son los tratamientos (dosis de petróleo)

ε_{ijk} : es el error aleatorio.

Hipótesis del modelo estadístico

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \tau_3 = \tau_4 = \tau_5 = \tau_6 = \tau_7$$

v.s

$$H_1: \tau_i \neq \tau_j \quad \text{para algún par } (i \neq j)$$

Donde

H_0 : El efecto de las diferentes dosis de petróleo es el mismo en todas las UE.

H_1 : El efecto de los tratamientos es diferente

Los supuestos de normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos se verificaron con las pruebas de Shapiro- Wilks y Bartlett Test.

Supuesto de normalidad (prueba de Shapiro- Wilks)

H_0 : Los errores presentan una distribución normal

H_1 : Los errores no presentan una distribución normal

Supuesto de igualdad de varianza (prueba de Bartlett Test)

H_0 : Las varianzas presentan una distribución normal

H_1 : Las varianzas no presentan una distribución normal

Para encontrar diferencias entre las variables de estudio se empleó la técnica de diferencias de rangos de Tukey ($p \leq 0.05$), se utilizó la técnica de correlación bivariada de Pearson para describir relación entre todas las variables en los tratamientos de fitorremediación. Todos los análisis se realizaron en el *Software estadístico R Core Team* (2022).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Efecto del petróleo en el crecimiento de *Jatropha curcas*

El análisis de varianza para altura de planta (AP), diámetro basal (DB) y número de hojas totales (NHT) de *J. curcas* mostró diferencias significativas entre los 189 tratamientos (Tukey $p \leq 0.05$, anexo, Cuadro 1) (Figura 22A, B, C). En cuanto al efecto principal dado por el factor tiempo y concentración de petróleo estos presentaron efectos significativos para AP, DB y NHT. Existe una interacción significativa entre el factor CP*T para todas las variables de crecimiento en *J. curcas* (Cuadro 6).

Cuadro 6: Análisis de varianza de altura de planta, diámetro basal y número de hojas totales en 189 tratamientos (7 dosis de Petróleo por 27 semanas)

	Concentración de petróleo (CP)	Tiempo (T)	Interacción (DP*T)
Altura de planta	$<2.2e^{-16}***\S$	$<2.2e^{-16}***$	$<2.2e^{-16}***$
Diámetro basal		$<2.2e^{-16}***$	$<2.2e^{-16}***$
Número de hojas totales	$<2.2e^{-16}***$	$<2.2e^{-16}***$	$<2.2e^{-16}***$
	$<2.2e^{-16}***$		

†1 a 27 semanas. †(Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$).

§Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Los datos en AP, NHT y DB de *J. curcas* registraron diferencias estadísticas desde la semana cinco del experimento para AP, y semana dos para NHT y DB. En los tratamientos sin PC, AP manifiesta fase de crecimiento mayor respecto a los tratamientos con PC, siendo la fase lag por cuatro semanas, fase lineal de la semana 5 a 16 y fase de senescencia semana 17 a 27. Sobresale, que en los tratamientos con PC la fase lag se prolonga hasta la semana 11, la fase lineal de la semana 12 a 14 (prolongándose hasta 17 en 4 g/kg) y semana 15 a 27 senescencia en concentración de 14 hasta 75 g/kg (Figura 22A). Los valores de AP mayores fueron en los tratamientos sin PC fue durante las semanas 17 a 27, y la menor AP a partir de la semana uno a la 11 expuesta a 56 y

75 g/kg PC. Los datos muestran que *J. curcas* fue una planta no tolerante a la exposición a petróleo en cada una de las 27 semanas.

Al igual que AP, NHT se presentan tres fases de crecimiento diferentes; fase lag para el total de los tratamientos semana 1 a 3, fase lineal en suelo testigo y con 4, 14, y 29 g/ kg de PC fue de la semana 4 hasta la 16, y de la semana 4 a la 12 en suelo con 42, 56 y 75 g/kg de PC, con fase de senescencia durante la semana 17 a 27 para las primeras tres dosis y a partir de la 13 en las tres dosis altas (Figura 22B). Los valores de NHT mayores fueron en los tratamientos sin PC durante la semana 21 a 27, y sobresale a la semana 27 de exposición a 75 g/kg PC el NHT disminuye 53.3% respecto al suelo sin PC. El DB diferente a la cinética de crecimiento de AP y NHT, manifiesta dos fases de crecimiento en suelo con 56 y 75g/kg PC (lag semana 1 a 4 y fase lineal 5 a 27) con menor DB que planta crecida en suelo sin PC. En suelo sin PC y 4, 14, 29 y 42 g/kg PC con fase de crecimiento lineal a entre la semana 3 a 27 (Figura 22C). Es interesante que la planta control tiene menor DB durante este experimento con respecto a los tratamientos con 14, 29 y 42 g/kg PC entre la semana 20 a 27. El mayor DB (27.73 y 27.30 mm) fue en suelo con 4 y 14 kg/kg a la semana 27, y la menor (5.75 mm) en suelo con 75 g/kg a la semana uno.

La Jatropha curcas es una planta versátil que se adapta a condiciones de sequía, y suelo con baja disponibilidad de nutrientes (Toral *et al.*, 2008). Los resultados en el presente estudio indican que *J. curcas* no se adapta en un 100% a crecer en artificial suelo conteniendo entre 4 a 75 g/kg de PC. Una explicación al respecto es que el PC en el suelo incorpora HTP que son recalcitrantes, con estructuras químicas con baja solubilidad en agua, y al estar sorbidos en materia inorgánico y orgánica causan toxicidad a las plantas (Jacques *et al.*, 2007; Chávez-Álvarez *et al.*, 2022). Los resultados de esta investigación muestran que *J. curcas* en suelo sin y contaminado presenta tres fases de crecimiento (lag, lineal y senescencia) similar a lo reportado por Salisbury y Ross. (2000) para plantas perenes sin estrés abiótico.

En nuestra investigación AP de *J. curcas* en suelo sin PC presenta fase lag por 4 semanas, y expuesta a 4 hasta 75 g PC se prolonga a 11 (primeras cuatro dosis) y 14 semanas (ultimas dosis) (Figura 22A). Lo contrario sucedió en la fase lineal de

multiplicación celular con un tiempo de 3 semanas en planta expuesta a PC, y 11 semanas tratamiento control. Otros estudios con *J. curcas* expuesta a 22.4 g/kg HTP muestra fase lineal de crecimiento de AP desde la semana dos a la 16 en suelo sin y contaminado, siendo menor la AP en suelo con HTP (Nero, 2020). Los resultados sugieren que durante la fase de adaptación de *J. curcas* al estrés se interrumpe la interacción suelo-planta; el flujo de agua y nutrientes por xilema hacia la parte superior de la planta restringe la división celular y diferenciación del meristemo apical (Salisbury y Ross, 2000). Esta interrupción es por la barrera física aceitosa que el PC ocasiona en las partículas minerales del suelo y raíz, y limita el intercambio catiónico, disponibilidad de nutrientes esenciales y oxígeno para la planta (Shukry *et al.*, 2013), así como la biosíntesis celular de giberelina que posiblemente baje e interrumpa la elongación del tallo (Iglesias y Talón, 2008).

Similar a AP, el crecimiento de hojas en tallo de *J. curcas* son menores en plantas expuesta a PC en cada una de las 27 semanas evaluadas, pero se presentan tres fases (lag, lineal y senescencia) con periodos de tiempos similares al tratamiento control (Figura 22B). Resultados similares para número de hojas en *J. curcas* fueron reportados por Nero (2020) por 16 semanas con inducción de menor fase lineal de crecimiento en plantas expuestas a 22.6 g/kg HTP. La formación de hojas bajo condiciones de estrés abiótico puede ser limitada; por la disminución de la velocidad de biosíntesis, intensidad de transporte de llegada y salida del agua que regulan la concentración de auxina (ácido indolil-3acético, AIA) en el meristemo foliar en el momento para la diferenciación de hojas jóvenes (Acosta *et al.*, 2008). La síntesis del AIA celular puede ser influenciada por la biosíntesis de etileno (Taiz *et al.*, 2015), al respecto dosis 42, 56 y 75 g/kg PC en la investigación adelanta la fase de senescencia a partir de la semana 13 (Figura 21B) esta respuesta sugiere que el PC indujo la reducción del AIA en hojas e incrementa la síntesis de etileno lo que provoca la separación de la hoja del tallo y ocasiona la muerte celular (Taiz *et al.*, 2015).

Diferente a la AP y NHA, es la respuesta del DB del tallo de *J. curcas* al presentar crecimiento lineal durante la semana 1 a la 27 tanto en los tratamientos sin y con PC (4, 14, 29 y 42 g/kg), y fase lag en la semana uno y dos expuesta a 56 y 75 g/kg. Sobresale

en nuestra investigación, que en el periodo de la semana 17 a la 27 el DB fue estimulado por las primeras cuatro concentraciones de PC. Resultados contrarios reporta Nero (2020) pero a la semana 16 al disminuir el diámetro basal. La respuesta positiva al PC del DB sugiere que el estrés, favorece el proceso de xilogenesis en *J. curcas*, el cual es un proceso de división y diferenciación del cambium representado por la fase de alargamiento celular y engrosamiento y lignificación de la pared celular (Liang *et al.*, 2016). Un factor que favoreció este engrosamiento puede ser el flujo de oxígeno a través de las lenticelas del periderma, presente en plantas perenes, lo que permite que las células interiores intercambien gases con la atmósfera exterior, suministrando oxígeno a las células vivas y metabólicamente activas de la corteza, el xilema y el floema (Funada *et al.*, 2016), sin que se altere su crecimiento por falta de oxígeno proveniente de las raíces en suelo con petróleo crudo. Otro factor estimulado bajo condiciones de estrés es la inducción de señales química para diferenciar metabolitos secundarios como los esteroides, que según Salisbury y Ross (2000) constituyen polímeros estructurales de la lignina que se acumula en la corteza del tallo.

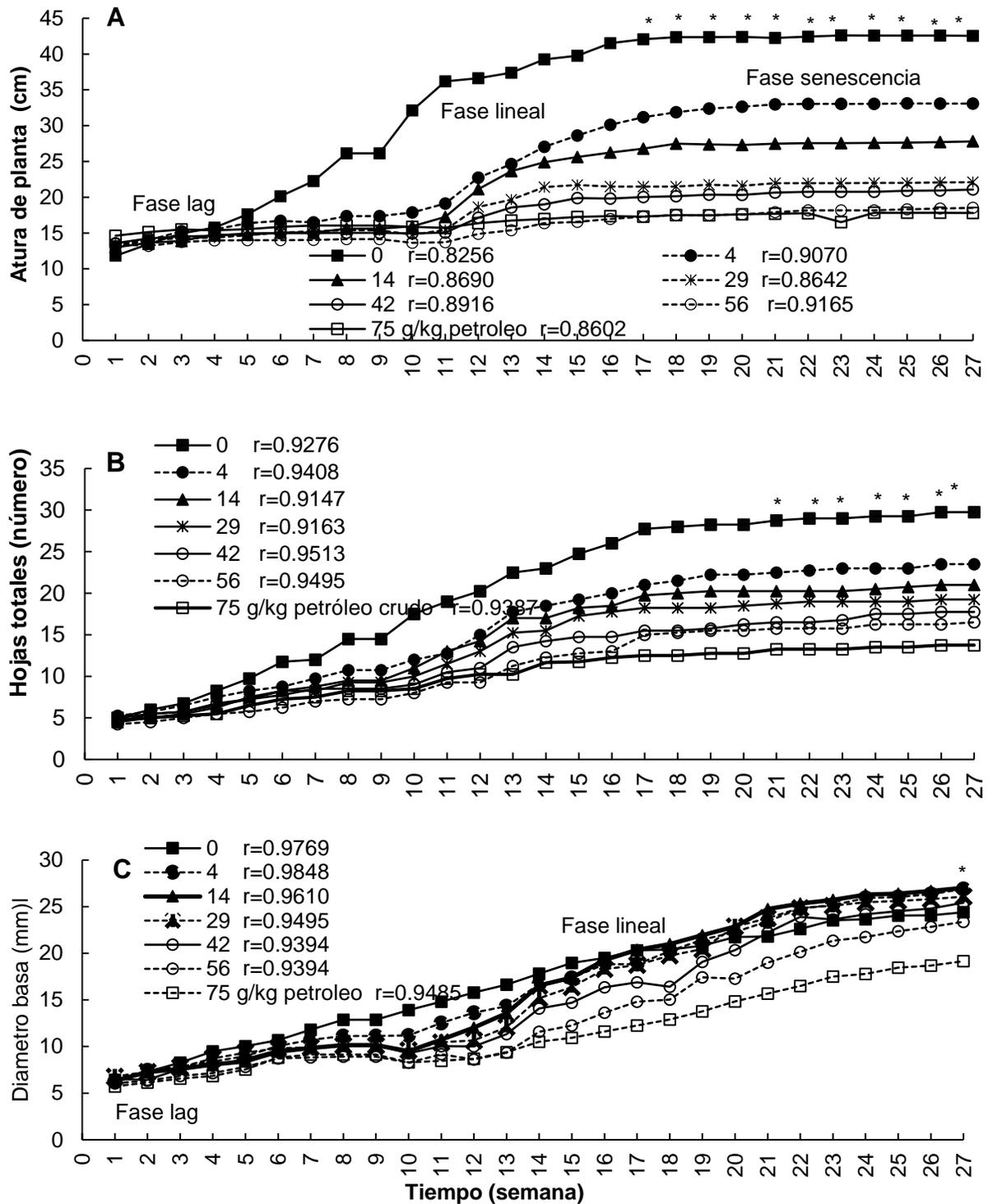


Figura 22. Altura semanal de planta (A), Número de hojas totales (B), diámetro basal (C) de *Jatropha curcas* expuestas a diferentes concentraciones de petróleo crudo durante julio a diciembre 2021. Medias de tratamientos con diferencias estadísticas significativas (Tukey $p < 0.05$, $n=4$). *: Significativo

5.2. El petróleo crudo sobre crecimiento y producción de *Jatropha curcas*

A la semana 27, la AP fue estadísticamente significativa mayor el tratamiento sin PC (anexo, Cuadro 2), pero dosis 4, 14, 29, 42, 56 y 75 g/kg decrece 23, 35, 49, 51, 58 y 58% (Figura 1A). Se produce índices dosis-respuesta < 1 para esta variable en las seis dosis (Figura 22). Al igual que AP, NHT en suelo sin PC fue mayor respecto a las dosis 4, 14, 29, 42, 56 y 75 g/kg (anexo, Cuadro 2), que decrece 20, 26.6, 36.6, 40, 43 y 53% respectivamente (Cuadro 7).

El diámetro basal (DB), área de hoja (AH), número y longitud de raíz de *J. curcas* depende de las dosis de PC, e induce diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$) (Cuadro 7; anexo, Cuadro 2). El DB y AH (Figura 22) tienen un efecto estimulador cuando la dosis incrementa hasta 42 g/kg. El DB incrementa por 11.5, 9.2, 6 y 2% con dosis de 4, 14, 29, 42 g/kg y con dosis 56 y 75 g/kg decrece 2.5 y 20% respectivamente. Al igual que DB, el AH incrementa por 34, 34.8, 16 y 16.5% con dosis de 4, 14, 29, 42 g/kg, pero con dosis de 56 y 75 g/kg decrece 12 y 17%, respectivamente, produciendo para las dos variables IRT dosis-respuesta > 1 en suelo entre 4 a 45 g/kg PC (Figura 24A; anexo, Cuadro 5).

Al igual que el DB y AH, el NRT fue estadísticamente mayores con las primeras tres dosis (4, 14, 29 g/kg), pero con dosis de 42, 56 y 75 g/kg el NRT disminuye 8.9, 36, 46% respectivamente anexo, Cuadro 2). Produciendo dosis-respuesta hormesis para las primeras tres dosis, con IRT > 1 (Figura 24A; Figura 25). Llama la atención la longitud de raíz en dosis de 4, 14, 29, 42, 56, 75 g/kg comparado con el control que induce incremento 22, 21, 48, 49, 29 y 3 % respectivamente, produciendo IRT > 1 para seis dosis (Cuadro 7, Figura 24A).

La producción de materia seca de raíz y aérea a la semana 27 al igual que AP y NHT muestra diferencias estadísticas mayor en suelo sin PC respecto a las seis dosis de PC (Cuadro 7; anexo, Cuadro 2). Exposición de *J. curcas* a dosis de 4, 14, 29, 42, 56 y 75 g/kg en suelo decrece la producción de MSR por 26, 24, 30.7, 50, 64, 81% y MSA por 0.9, 5, 28, 38, 43 y 67% comparado con el control (Cuadro 2), produciendo para las dos variables curva dosis-respuesta inversamente proporcional a dosis de PC, IRT con

valores < 1 inhibe el PC a la producción de materia seca de raíz (Figura 24B; anexo, Cuadro 5).

Los resultados son semejantes a los reportados por Nero (2020), *J. curcas* expuesta a 22.6 g de hidrocarburos totales del petróleo a la semana 16, indica que AP y número de hojas son menores en suelo contaminado respecto a no contaminado. También coinciden con los resultados en otras especies de plantas que disminuyen la AP en suelo con media y altas concentraciones de hidrocarburos (Xie *et al.*, 2017; Gonzalez- Moscoso *et al.*, 2019).

En nuestra investigación, el DB y área de hoja son estimuladas en *J. curcas* expuesta entre 4 a 42 g/kg PC, sin embargo esto no coincide con los resultados de Nero (2020) que encontró que el DB es afectado negativamente por los hidrocarburos del petróleo, sin embargo, la respuesta positiva de *J. curcas* al estrés en DB y el área de hoja inducida por el PC, según Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, (2012) puede ser a que esta planta bajo condiciones de estrés responde con mecanismos de defensa para protegerse del daño, debido a que se ha observado que las plantas con altos niveles de antioxidantes, constituidos o inducidos tienen mejor resistencia al daño.

Los antioxidantes no enzimáticos y enzimáticos sintetizados por las células vegetales de plantas resistentes al estrés abiótico contrarrestan biosíntesis de especies reactivas de oxígeno que causan la muerte celular (Hasanuzzaman *et al.*, 2012). Así mismo, el aumento del grosor del tallo de *J. curcas* puede deberse a que las condiciones de estrés indujeron la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), y ellas inducen la peroxidación de lípidos (principalmente fosfolípidos de células membrana) (Bhattacharjee, 2005) acumulándose en las células de la epidermis del tronco de la planta. Otra explicación, puede ser a que las condiciones de estrés indujeron la producción de ERO, y ellas inducen la peroxidación de lípidos (principalmente fosfolípidos de células membrana) (Bhattacharjee, 2005) acumulándose en las células del tronco de la planta.

Las altas concentraciones de PC en los suelos pueden reprimir el crecimiento de raíz (Agamuthu *et al.*, 2010), sin embargo, en esta investigación dosis entre 4 y 29 g/kg

incremento el número de raíces secundarias y terciarias, y dosis entre 4 y 56 g/kg PC también incrementan la longitud radical (Cuadro 7). Este incremento de raíces puede ser a la biosíntesis de auxina en el sistema radical como respuesta al estrés, siendo ellas las estimuladoras del alargamiento o elongación celular de raíces (Acosta *et al.*, 2008). Recientemente, varios estudios se han centrado en cambios anatómicos inducidos por el petróleo crudo en las raíces de *Sebastiania commersioniana*, *Schinus terebinthifolius*, *Pisum sativum* y *Zea Mays*, y el aumento del diámetro de la raíz se asoció con un alto número de vasos de xilema (Bona *et al.*, 2011; Kummerová *et al.*, 2013), permitiendo la absorción de agua en las raíces primarias en condiciones de estrés (Mu *et al.*, 2006). *J. curcas* es una planta adaptada a suelos con estrés hídrico (Martínez-Herrera *et al.*, 2006) y de manera indirecta al estar expuesta al petróleo el sistema radical manifestó adaptación a condiciones de estrés similares.

La materia seca de raíz y aérea de la planta *J. curcas* en esta investigación disminuyó con mayor concentración de PC, resultados similares a los reportados por Agamuthu *et al.* (2010) en *J. curcas* en donde muestra síntomas de fitotoxicidad a mayor concentración de 2.5% de HTP. Estos autores argumentan que el menor rendimiento es atribuible a la presencia del PC en el suelo. La contaminación del suelo puede disminuir la disponibilidad de agua, oxígeno y micronutrientes para la absorción de la planta (Nogueira *et al.*, 2011). Las altas concentraciones de aceite en el suelo según Wyszowska y Kucharski. (2000) pueden reprimir la dinámica radical, absorción de agua y nutriente, así como la actividad microbiana por reducir la permeabilidad y la infiltración de agua en los suelos.

Cuadro 7. Crecimiento y materia seca de *J. curcas* expuesta al petróleo crudo a la semana 27.

PC [†] (g/kg s.s.)	NHT [‡]	Área foliar(cm ³)	Raíz		Materia seca	
			Número	Longitud (cm)	Raíz	Área
0	30±5.3a [§]	86.3±16.6bc	237±2.6ab	21±7b	13.±1.3a	32±2.5a
4	24±1.3b	131.7±4.9a	279±35a	26±1.4b	9.6±1.2bc	31.7±5a
14	22±1.3bc	132.3±8.3a	253±45a	27±2b	9.9±2.1b	30.5±6.3a
29	19±1.2bcd	103.2±10.4b	273±22a	40.7±4a	9±2.1bc	23±0.96ab
42	18±2cd	103.44±17b	216±5b	41.4±3a	6.5±0.84cd	19.8±3.6bc
56	17±1.9cd	76±13.4c	152±27bc	29.9±10ab	4.7±1.7de	18.2±6.4bc
75	14±.96d	71.6±1.1c	127±33c	22±7b	2.4±1.01e	10.7±4.1c
Sin	29.7±5.3A	86.3±16.6A	236±2.6A	24.7±7.2A	13A	32A [‡]
Con	18.7±3.5B	103.07±27A	216.8±6A	30.77±9.3A	7.06±3B	22.3±8.5B
r ²	.79	.79	.78	.59	.85	.72
CV	12.07	11.62	13	19.8	17.8	19.15

[†]PC: Petróleo crudo. s.s.: suelo seco. [‡]NHT: hojas totales. [§]Letras minúsculas diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4). [‡]Letras mayúsculas diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=4).

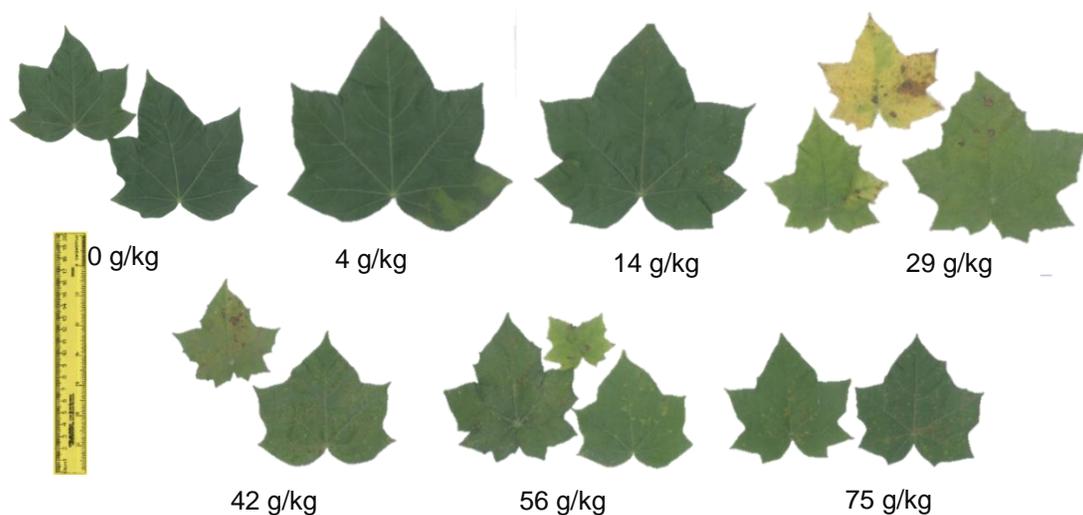


Figura 23. Cambios en área de hoja (cm²) de *Jatropha curcas* según la dosis de petróleo, 27 semanas

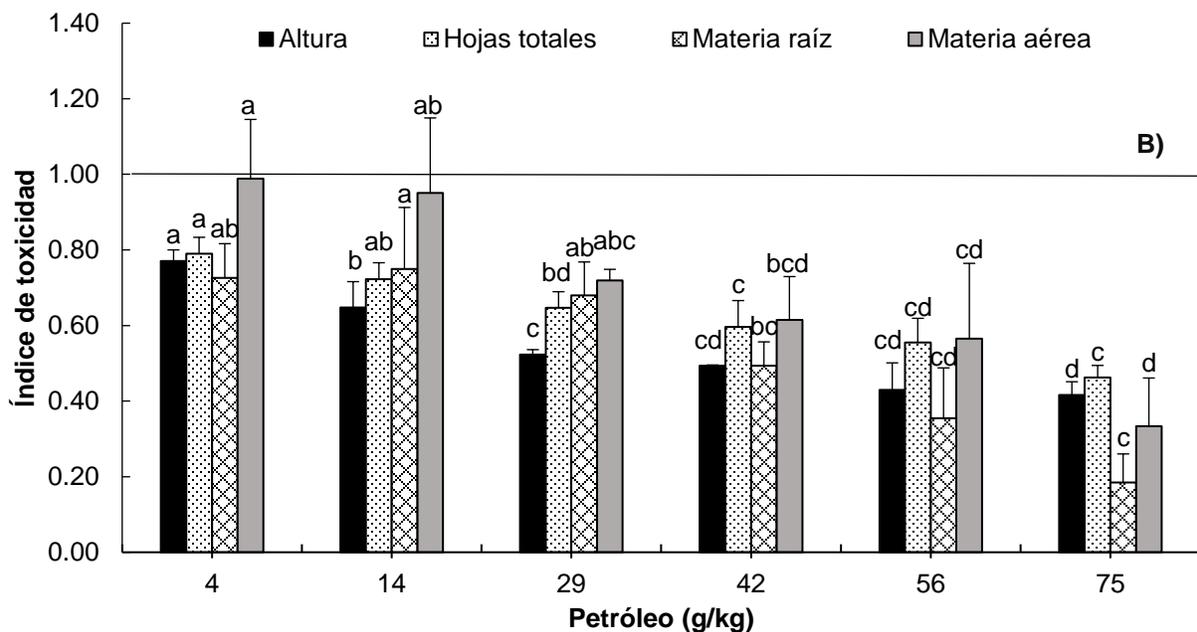
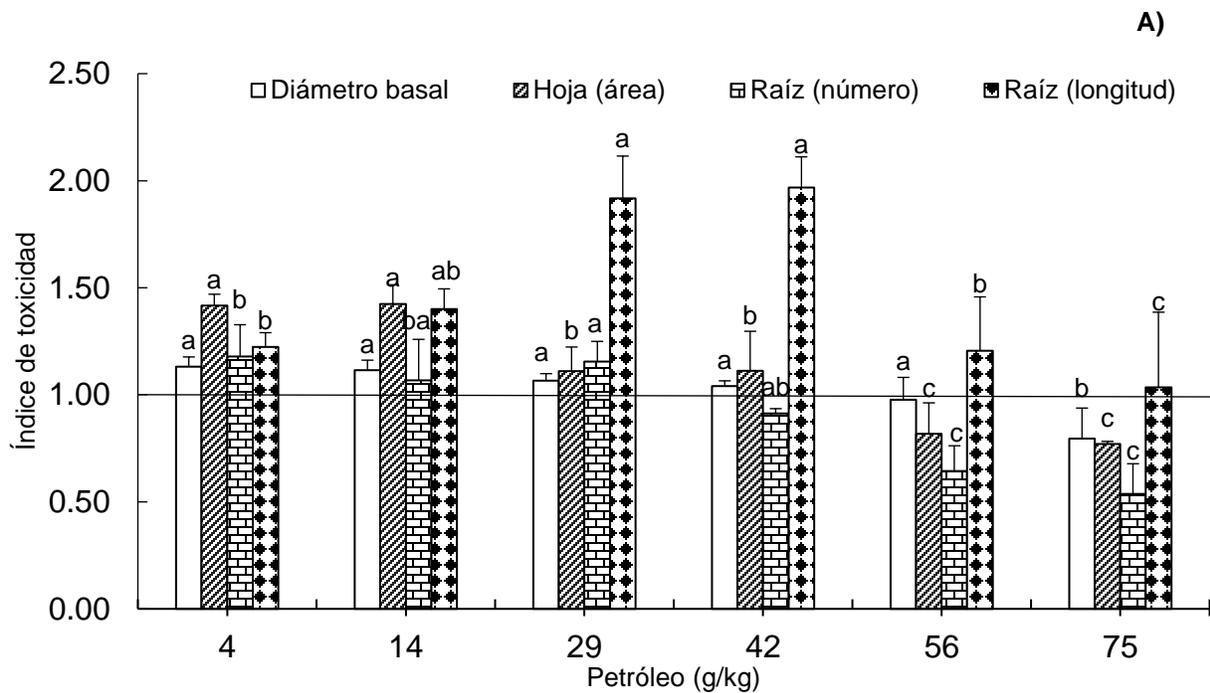


Figura 24. Índice relativo de toxicidad (IRT) al petróleo crudo en crecimiento y producción vegetal de *Jatropha curcas* a la semana 27. (A) Variables con IRT > 1 indica que el petróleo crudo estimula el crecimiento. (B) Variables con IRT < 1 indica que el petróleo

crudo inhibe el crecimiento y producción de la planta. Columnas denotadas con diferentes letras indican diferencias estadísticas (Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$).



Figura 25. Cambios en raíces de *Jatropha curcas* según la dosis de petróleo, 27 semanas

5.3. Índices absolutos de toxicidad al petróleo crudo.

Los índices absolutos de toxicidad en crecimiento (IATC) a la semana 27, incluye AP, DB, NHT, área de hoja, número y longitud de raíces fueron estadísticamente iguales y significativas en las primeras cuatro dosis (4, 14, 29, 42 g/kg) con valores entre 1.02 a 1.09, son iguales a 1 e indica que *J. curcas* es una planta que no es afectada por el PC, por lo que sostiene su crecimiento bajo condiciones de estrés causado por hasta 42 g/kg de PC en suelo Gleysol. Una explicación, puede ser que *J. curcas* es una planta que se adapta al estrés hídrico que induce una menor cavitación en los vasos de las raíces semejante a los arbustos del desierto permitiendo una mayor adaptación a la falta de agua en el suelo (Hacke y Sperry, 2001). Lo contrario fue el índice absoluto de toxicidad para producción (IATP) con valores < 1 e indican efecto de estrés causado por dosis entre 4 a 75 g/kg de PC (Cuadro 8).

El índice total de toxicidad obtenido de la sumatoria de los IAC e IAP de *J. curcas* con valores igual entre 1 a 0.57 en dosis 4, 14, 29,42, 56 y 75 g/kg (Cuadro 8), e informan el potencial de respuesta al estrés de la planta según diferentes concentraciones secuenciales de PC en el suelo. Por lo tanto, *J. curcas* se adapta a dosis de 4 g/kg de petróleo crudo, por producir materia de raíz y aérea similar al suelo sin petróleo. Posiblemente, biosíntetiza moléculas O₂, H₂O₂ y radicales OH⁻ lo que provoca daños a nivel de membrana celular, lo que induce la inhibición en crecimiento vegetal (Liu *et al.*, 2009; Gill y Tuteja, 2010; Peralta-Pérez y Volke-Sepúlveda, 2012; Hasanuzzaman *et al.*, 2020), en concentraciones iguales y mayores a 14 g/kg de PC en suelo.

Cuadro 8. Índice de toxicidad al petróleo crudo de *Jatropha curcas* a la semana 27

Petróleo crudo (g/kg)	Índice absoluto de toxicidad (IAT)		Índice total (IT)
	Crecimiento (C)	Producción (P)	
4	1.09±.04a	0.86±.11a	1.03a
14	1.02±.05a	0.85±.17a	.98a
29	1.07±.01a	0.70±.04b	.98a
42	1.02±.02a	.55±.08c	.90a
56	.77±.12b	.46±.16c	.69b
75	.67±.10b	.26±.04d	.57b

†Letras diferentes por columna indican diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=24 para IATC; n=8 para IATP; n=32 para IT).

5.4. Población de microorganismos a respecto a la dosis de petróleo en suelo fitorremediado

La media de población de bacterias heterótrofas (BH), hidrocarbonoclasticas (BHC), actinomicetos (ACT), hongos heterótrofos (HH) y hongos hidrocarbonoclasticos (HHC) registraron diferencias estadísticas significativas (Tukey <0.05; anexo, Cuadro 3) inducidos por el PC y la tecnología de fitorremediación (Cuadro 9). Los cuatro grupos de microorganismos fueron más abundantes en suelo contaminado entre 4 a 75 g/kg de PC. La mayor densidad poblacional de BH (22x10⁴ UFC/g) fue en rizosfera expuesta a 56 g de petróleo y BHC (36x10³ CFU/g) en suelo con 4 g de petróleo. Así como el suelo con 56 y 75 g, es favorecida la población de ACT (13 x 10⁵ UFC/g), y los HHC son favorecidos por las cinco dosis de PC (4, 14, 29,56 y 75 g/kg) con 13, 16, 12, 13 y 11 x10³ UFC/g

respectivamente (Cuadro 9). Similares resultados fueron reportados por Chávez-Álvarez *et al.* (2022) con incrementos en UFC de bacterias hidrocarbonoclasticas (18×10^4) y 50×10^4 de actinomicetos en la rizosfera de *E. palustris* crecida en suelo con 75 g de HTP.

La simbiosis del hongo micorrízicos arbuscular (Figura 26), fue observada en todos los tratamientos y evidencia diferencias estadísticas (Tukey, $p < 0.05$; anexo, Cuadro 4) en los porcentajes de hifas, arbusculos, vesículas y esporas intraradicales (Cuadro 10) por efecto de las diferentes concentraciones de petróleo crudo en suelo. La mayor cantidad de hifas (74 y 76%) y vesículas (32 y 26%) fue observada en suelo con 14 y 29 g/kg de PC; la menor cantidad de hifas y vesículas (48 y 8%) fue en 42 g/kg de concentración de PC. Los arbusculos fueron inhibidos en suelo sin PC, y estimulados en porcentajes bajos entre 9 a 2 % en concentraciones 4 a 75 g/kg, pero decrecen conforme aumenta la concentración de PC en suelo (-0.415^{**} , Cuadro 11).

La cantidad de esporas intraradicales (8 a 4%) son favorecidas por la concentración de PC, el mayor porcentaje (8%) en suelo con 14 g/kg y la menor cantidad (2%) en suelo sin PC. Global análisis estadístico muestra que la colonización total fue estimulada en las tres primeras concentraciones (4, 14 y 29 g/kg) comparada con el suelo control, el incremento fue 39, 38 y 5% respectivamente. Alejandro-Córdova *et al.*, (2017) reporta HMA en tienen habilidad de colonizar raíces de *L. hexandra* en suelo entre 3 a 60 g/kg de petróleo siendo mayor respecto al control.

La habilidad del HMA para colonizar *J. curcas* en suelo hasta 29 g/kg de petróleo crudo puede ser explicado porque induce efecto hormesis (Calabrese, 2012) sobre el crecimiento de las raíces, como ha sido demostrado en este estudio (Figura, 24A) con $IRT \geq 1$ para número de raíces y longitud de raíz. Esta inducción del crecimiento de las raíces en la micorrizosfera de *J. curcas* asegura la disponibilidad de carbono, nutrientes, oxígeno y CO_2 para la germinación de las esporas del HMA (Timonen and Marschener, 2006).

Cuadro 9. Población de cinco grupos microbianos a la semana 27 rizosfera de *J. curcas* en suelo contaminado con petróleo crudo tratado con fitorremediación de Julio a diciembre 2021.

Petróleo (g/kg)	Bacterias		Actinomicetos	Hongos	
	HTR [†]	Hidrocarbonoclasticas		HTR	Hidrocarbonoclasticos
10 ³ UFC g ⁻¹ rizosfera seca.....		10 ² UFCg ⁻¹ rizosfera seca....	
0	1332c [¶]	12d	72c	16bc	97cd
4	1495b	36a	205c	12cd	138ab
14	1420bc	31b	259bc	34a	159a
29	1157d	23c	662b	8de	117bc
42	1418bc	30b	639b	6e	73d
56	2284a	24c	1357a	13c	131ab
75	1018e	30b	1352a	20b	114bc
Sin	1332B [§]	12B	72B	16A	97B
Con	1465A	29A	746A	15A	122A
r ²	.98	.93	.88	.95	.77
CV	3.79	7.7	27.7	11.9	11.8

[†]HTR: heterótrofas (o). [¶]Letras minúsculas diferentes por columna indica diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=12). [§]Letras mayúsculas diferentes por columna indica diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=36 suelo con petróleo, n=9 suelo sin petróleo).

Cuadro 10. Porcentaje de hifas, arbusculos, vesículas, esporas intraradicales, y colonización total del hongo micorrícico arbuscular en *Jatropha curcas* con diferentes concentraciones de petróleo crudo. Semana 27.

Petróleo (g/kg r.s)	Colonización (%)				
	Hifas	Arbusculos	Vesículas	Esporas	Total
0	57±8ab [†]	0b	13±0.66c	2±0.3b	18±3.9b
4	74±8.7ab	9±0.32a	32±0.3a	4±0.5b	30±2.5a
14	76±4.8a	7±0.3ab	26±0.42ab	8±0.6a	29±1.7a
29	58±1.8ab	3± 0.4ab	13±0.2bc	3±.02b	19±1.5ab
42	48±11.5b	2±0.2ab	8±0.4c	4±0.5b	16±4b
56	53 ± 17ab	3±0.2ab	11±0.8c	6±0.6b	18±7b
75	49±9.7ab	5±0.4ab	10±0.87c	4±0.3b	17± 7.4b
Sin	57±8.2A [‡]	0	13±6.6BA	2±2.9B	18±3.9B
Con	60±15.9A	5±3.8A	17±10A	5±4.5A	22±7.1A
r ²	0.37	0.36	0.68	0.15	0.54
CV	19.8	17.5	13.8	19.5	21

[†]Letras minúsculas diferentes por columna indica diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=9). [‡]Letras mayúsculas diferentes por columna indica diferencias estadísticas significativas (Tukey p≤0.05, n=36 suelo con petróleo, n=9 suelo sin petróleo).

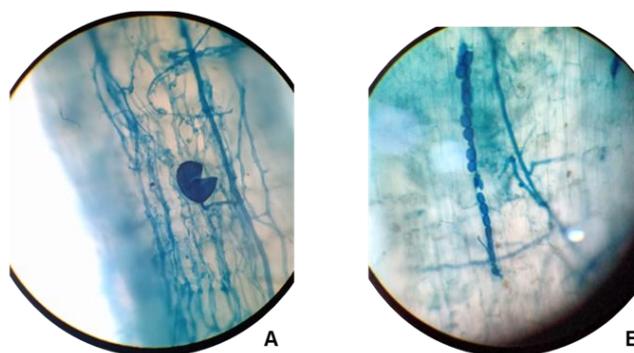


Figura 26. Estructuras fúngicas del hongo micorrícico arbuscular en raíces de *J. curcas* a las 27 semanas de exposición al PC a 40x. A) Hifas y vesícula. B) Hifas y esporas.

5.5. Remoción de hidrocarburos totales del petróleo desde la rizosfera de *J. curcas* y su relación con parámetros de crecimiento y microorganismos

Los resultados de la remoción, en los tratamientos con fitorremediación muestran diferencias significativas (Tukey <0.05 ; anexo, Cuadro 7) (Figura 27). El alto porcentaje de remoción (54.8%) ocurrió en suelo con 4 g/kg de PC, en contraste, la baja remoción (37%) en suelo con 75 g/kg. Resultados diferentes fueron obtenidos por Nero (2020) al establecer *J. curcas* en suelo con 22.6 g/kg de HTP a la semana 16 solo remueve un 16.2%. Agamuthu *et al.* (2010) en suelo con 25 y 10g/kg de lubricante de petróleo estimula al día 180 un 89.6% y 96.6% de remoción, respectivamente. Este último reporte sugiere que *J. curcas* sin estimulantes orgánicos para suelos de Asia y África tiene potencial para usarla en tecnologías de fitorremediación, sin embargo, Nero (2020) recomienda a *J. curcas* pero estimulada con fertilizantes orgánicos.

En particular en nuestra investigación en suelos Gleysol con 29 g/kg de PC ubicados en el estado de Tabasco, *J. curcas* a la semana 27 remueve 45.3 %, lo que equivale respecto a lo reportado por Nero (2020) una eficiencia del 64.2% en remoción de HTP en el trópico húmedo mexicano, pero 11 semanas más de permanencia en el suelo. Así mismo, si se compara con la remoción reportada por Agamuthu *et al.* (2010) es menos eficiente en un 49.4%. Por lo anterior, *J. curcas* puede usarse en tecnologías de fitorremediación para suelos Gleysol del trópico húmedo de México, posiblemente prolongando su permanencia en el sitio hasta completar su fase de crecimiento inicial por dos años (Heller, 1996). Tiempo requerido en el trópico de México para continuar con la fase de floración y fructificación. Esto permitirá que el sistema radical aumente y se establezca mayor diversidad de microorganismos que remueva a los hidrocarburos del petróleo.

Al respecto, nuestro estudio identifica que la remoción tiene relación altamente significativa (**), pero negativa (-.694**) con dosis de petróleo, correlación positiva con producción de MSR (.494**) y MSA (.601**), así como con la colonización intraradical de la micorriza arbuscular; HIF=.473*, ARB=.503**, VES=.526**, COT=.551** (Cuadro 11), y sin relación alguna con bacterias, actinomicetos y hongo de vida libre.

La asociación del HMA con *J. curcas*, es una fortaleza para ella debido a que contribuye a la adaptación, crecimiento y nutrición de la planta bajo condiciones ambientales (Nardini *et al.*, 2011). Joner and Leyval. (2003) reporta que *Glomus mosseae* tiene habilidad para asociarse en suelo con hidrocarburos policíclicos aromáticos. Existen reporte que el establecimiento de los HMA en el sistema radical de algunas plantas contribuye para degradar y reducir la toxicidad de hidrocarburos policíclicos aromáticos (Jones and Leyval 2003; Gamal, 2005; Hernández-Ortega *et al.*, 2012).

Aunque en esta investigación no se encontró relación alguna entre bacterias, actinomicetes y hongos de vida libre, si lograron establecerse en suelo contaminados, y según Zambrano y Araujo (2015) los microorganismos que logran establecerse en suelo con PC, significa que utilizan como fuente de carbono y energía, a los hidrocarburos del petróleo. Ellos los oxidan y reducen a metabolitos secundarios y en el mejor de los casos hasta CO₂ y H₂O, utilizando enzimas monooxigenas y dioxigenasa (Madigan *et al.*, 2015).

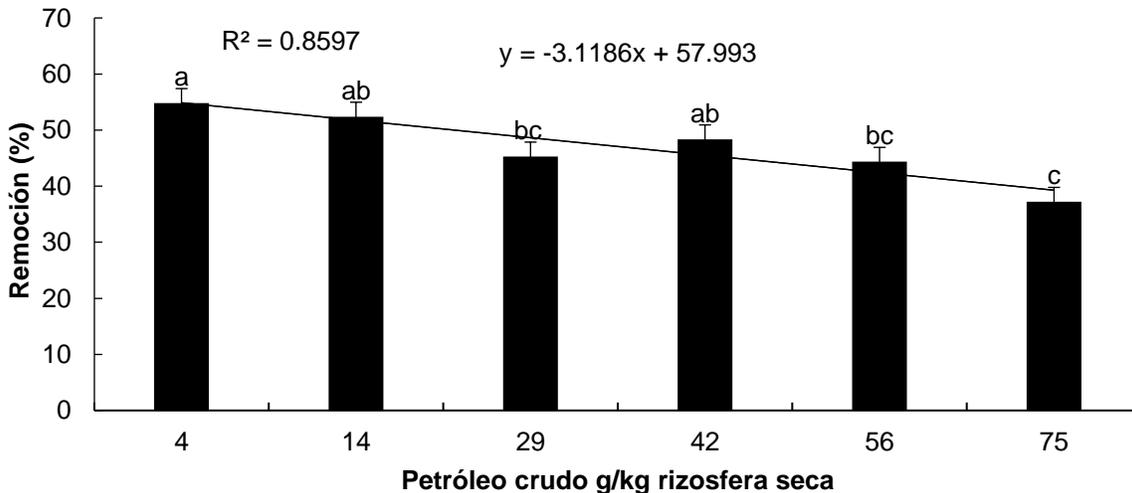


Figura 27. Remoción de hidrocarburos totales del suelo contaminado con petróleo durante julio a diciembre 2021. Letras diferentes de medias de tratamientos con diferencias estadística significativas (Tukey, $p < 0.05$, $n = 4$)

Cuadro 11. Relación entre petróleo crudo, materia de planta, microorganismos y remoción de hidrocarburos totales del petróleo

	MSR [¶]	MSA [§]	ACT ^ᵖ	HHC ^²	HIF ^{¶¶}	ARB ^{§§}	VES ^{ᵇᵇ}	COT ^{²²}	REM ^{†††}
PC [†]	-.886**	-.856**	.892**	-.416*	-.627**	-.415**	-.739**	-.675**	-.694**
MSR	1	.850**	-.810**	NS ^{¶¶¶}	.503**	NS	.550**	.511**	.494**
MSA		1	-.731**	.428*	.720**	NS	.728**	.747**	.601**
ACT			1	NS	-.457	NS	-.589**	-.515*	-.642**
HHC				1	.533**	.434*	.645**	.612**	NS
HIF					1	.531**	.794**	.946**	.473*
ARB						1	.680**	.663**	.503**
VES							1	.911**	.526**
COT								1	.551*
REM									1

†PC petróleo crudo. ¶MSR material seca raíz. §MSA materia seca aérea. ᵖACT actinomicetos. ²HHC hongos hidrocarbonolcasticos. ¶¶HIF hifas. §§ARB arbusculo, ᵇᵇVES vesículas. ²²COT colonización total de la micorriza arbuscular. †††REM remoción de hidrocarburos totales del petróleo. ¶¶¶NS no significativo. §§§: *** Altamente significativo (Tukey, p≤0.01).

VI. CONCLUSIÓN

6.1. Conclusión general

Jatropha curcas originaria del estado de Veracruz, es una planta versátil no tóxica que tiene potencial de uso durante su crecimiento y producción en protocolos de toxicidad y fitorremediación de suelos con petróleo. *J. curcas* manifiesta toxicidad en crecimiento y producción, pero también hormesis en crecimiento por exposición a 4, 14, 29, 42,56 y 75 g/kg de petróleo crudo, así mismo induce entre 54.8 a 37% la remoción de hidrocarburos totales del petróleo del suelo asociada a la simbiosis del hongo micorrízico arbuscular. Se recomienda el uso de *J. curcas* en protocolos de toxicidad ambiental y a tecnologías *ex situ* de fitorremediación aplicada a suelos del estado de Tabasco que contengan entre 4 a 75 g/kg de petróleo crudo por 27 semanas y mayor a 27 semanas en suelo conteniendo hasta 75 g/kg de petróleo crudo. **Por lo tanto, se acepta la hipótesis.**

6.1.1 Conclusiones particulares

El efecto de la exposición a petróleo indujo menor altura de planta, número de hojas durante las 27 semanas secuenciales, pero a partir de la semana 18 el diámetro basal fue mayor respecto al testigo en suelo con 4, 14, 29 y 42 g /kg PC. **Hipótesis aceptada.**

J. curcas presenta fases de crecimiento convencionales de altura de planta, número de hojas totales y diámetro basal, pero fue sensible al estrés por el petróleo crudo e indujo cambios notorios en la fase de adaptación al prolongarla, acortar la fase lineal y adelantar la senescencia. **Hipótesis aceptada.**

J. curcas a la semana 27 indujo índices relativos de toxicidad en crecimiento (altura de planta y número de hojas) y producción (materia seca raíz y aérea) \leq a 1, por lo que es una planta promisoría para proponerla en protocolos de toxicidad a suelos contaminados con petróleo crudo. **Hipótesis aceptada.**

El petróleo indujo a la semana 27 $IRT \geq$ para diámetros basal, área de hoja, número y longitud de raíces de *J. curcas*, parámetros básicos en su potencial fitorremediador de un suelo con petróleo crudo. **Hipótesis aceptada.**

El efecto del petróleo indujo mayor población de bacterias heterótrofas, actinomicetos, hongos heterótrofos, bacterias y hongos hidrocarbonoclasticos, así como la colonización antirradical de tres estructuras del hongo micorrícico arbuscular en la rizosfera de *J. curcas*. Por lo que es una rizosfera con alta colonización que puede ser promisoría de la recuperación de suelos con petróleo crudo. **Hipótesis aceptada.**

El efecto de la concentración de petróleo en el suelo a la semana 27 en la remoción de hidrocarburos totales del petróleo, y su relación positiva con estructuras intraradicales del hongo micorrícico arbuscular concluye, que *J. curcas* bioestimula la degradación en suelos con bajas concentración de petróleo en un 54%, pero es limitadas en concentraciones de hasta 75 g/kg de petróleo crudo al remover un 37%. **Hipótesis aceptada.**

VII. LITERATURA CITADA

- Acosta E.M., Sánchez B. J y Bañón A. M. 2008. Auxinas. *En: Azcón-Bieto J., Talón M (eds). Fundamentos de Fisiología Vegetal (pp: 377-398). McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España.*
- Adam G and Duncan H. 2002. Influence of diesel fuel on seed germination. *Environmental Pollution*.120:363-370. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(02\)00119-7](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(02)00119-7)
- Agamuthu P., Abioye O. P., and Aziz A.A. 2010. Phytoremediation of soil contaminated with used lubricating oil using *Jatropha curcas*. *Journal of Hazardous Materials*. 179(1-3): 891-894. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.03.088>
- Agbogadi O. M., Ilondu E. M., and Ohwo O. A. 2013. Effects of crude oil as a soil contaminant on seedling growth of *Jatropha curcas* L. *Journal of Biological and Chemical Research*. 30(1): 188-196.
- Alejandro-Córdova A., Rivera-Cruz M.C., Hernández-Cuevas L.V., Alarcón A., Trujillo-Narcía A., and García-de la Cruz R. 2017. Responses of Arbuscular Mycorrhizal Fungi and Grass *Leersia hexandra* Swartz Exposed to Soil with Crude Oil. *Water Air Soil Pollution*. 228, 65. <https://doi.org/10.1007/s11270-017-3247-2>.
- Alkorta I., and Garbisu C. 2001. Phytoremediation of organic contaminants in soils. *Bioresource Technology*79: 273-276. doi:10.1016/s0960-8524(01)00016-5
- Al-Mutairi N., Bufarsan A and Al-Rukaibi F. 2008. Ecorisk evaluation and treatability potential of soils contaminated with petroleum hydrocarbon-based fuels. *Chemosphere* 74 (1): 142-148. <http://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.08.020>
- Alshaal T., El-Ramady H., Al-Saeedi A. H., Shalaby T., Elsakhawy T., Omara A. E.D., Gad A., Hamad E., El-Ghamry A., Mosa A., Amer M., and Abdalla N. 2017. The rhizosphere and plant nutrition under climate change. *In: Naeem M., Ansari A.A, and Gill S.S (Eds.). Essential Plant Nutrients (pp: 275-308). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-58841-4-11*
- Anderson T.A., White D.C., and Walton B.T. 1995. Degradation of hazardous organic compounds by rhizosphere microbial communities (pp. 205-225). *In: Singh, V. (ed.). Biotransformations: Microbial degradation of health-risk compounds. Elsevier Science. Amsterdam, The Netherlands.*
- Anónimo 2022. *Jatropha*. <https://www.flores.ninja/jatropha>. Consultado 08, 12/2022.

- ATSDR (Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de enfermedades). 1999. Resumen de salud pública: Hidrocarburos totales de petróleo. Public Health Service, U.S. Division of Toxicology and Human Health Sciences. Atlanta.G.A. USA.6 p.
- Balestrini R., Lumini E., Borriello R., and Bianciotto V. 2015. Plant-Soil Biota Interactions. (pp: 311-338) *In*: Eldor A.P (ed). Soil Microbiology, Ecology and Biochemistry. 4ta. Ed. Academic Press Elsevier San Diego CA.USA, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415955-6.00011-6>
- Bhattacharjee S. 2005. Reactive oxygen species and oxidative burst: Roles in stress, senescence and signal transduction in plants. *Current Science*, 89 (7): 1113-1121.
- Bona C., da Silva, M.Y.B., de Rezende I.M., Santos G.O., de Souza L.A., and Inckot, R.C.2011. Efeito do solo contaminado com óleo diesel na estrutura da raiz e da folhade plântulas de *Sebastiania commersoniana* (Euphorbiaceae) e *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae). *Acta Botanica Brasilica*. 25: 277-285.
- Calabrese E. J. 2012. Hormesis: Improving predictions in the low-dose zone. En A. Luch (Ed.), *Molecular, Clinical and Environmental Toxicology* (Vol. 101, pp. 551-564). Springer Basel. <https://doi.org/10.1007/978-3-7643-8340-4-19>
- Calabrese E.J. 2013. Hormetic mechanisms. *Critical Reviews in Toxicology*. 43 (7): 580-606.<https://doi.org/10.3109/10408444.2013.808172>
- Castillo R. F., Roldán R. M. D., Blasco P.R., Huertas R. M. J., Caballero D. F.J., Moreno V.C. y Martínez L.R.M. 2005. *Biología ambiental*. Madrid, España: Editorial Tébar. 616
- Chang R. 2007. *Química*. 9a edición. McGrawHill Interamericana. México D.F. 1062 p.
- Chan-Quijano J. G., Jarquín Sánchez. A., Ochoa Gaona. S., Martínez Zurimendi. P., López Jiménez. L. N., Lázaro V. A. 2015. Directrices para la remediación de los suelos contaminados con hidrocarburos. *Teoría y Praxis*. 11(17): 123-144. <https://doi.org/10.22403/UQROOMX/TYP17/05>
- Chávez-Álvarez K., Rivera-Cruz, M.C., Aceves-Navarro, L. A., Trujillo-Narcía, A., García-de la Cruz, R., and Vega-López, A. 2022. Physiological and microbiological hormesis in sedge *Eleocharis palustris* induced by crude oil in phytoremediation of flooded clay soil. *Ecotoxicology*. 31(8): 1241-1253. <https://doi.org/10.1007/s10646-022-02583-x>
- Conejo-Saucedo U., Olicón-Hernández, D.R., Robledo-Mahón, T., Stein, H.P., Calvo., C and Aranda, E. 2019. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contaminated soil through fungal communities. (pp: 217- 236). *In*: Yadav A.N., Singh, S., Mishra, S., Gupta, A (Eds) *Recent advancement in white biotechnology through fungi*

- volume 3: Perspective for Sustainable Environments. Springer, San Diego CA, USA. https://doi.org/10.1007/978-3-030-25506-0_8
- Córdova T. L., Bautista R. E., Zamarripa C. A., Rivera L.J.A., Pérez V. A., Sánchez S.O.M., Martínez H. J., y Cuevas S. J.A. 2015. Diagnóstico y Plan Estratégico de la Red *Jatropha spp.* en México. SNICS, SINAREFI, México. 116p
- Dehgan B., and Webster G.L. 1979. Morphology and infragenetic relationships of the genus *Jatropha* (Euphorbiaceae). University of California Publications in Botany. 74: 2- 29.
- Delgadillo- López A. E., González- Ramírez C. A., Prieto- García F., Villagomez-Ibarra J.R., y Acevedo-Sandoval O. 2011. Fitorremediación: Una alternativa para eliminar la contaminación. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*.14: 597-612.
- Delgado J. G. 2006. Asfáltenos. Composición, agregación, precipitación. Laboratorio FIRP. Escuela de Ingeniería Química. Mérida, Venezuela.38p.
- Denys S., Rollin C., Guillot F., and Baroudi H. 2006. In-situ phytoremediation of PAHs contaminated soils following a bioremediation treatment. *Water, Air and Soil Pollution Focus* 18 (6): 299-316 <https://doi.org/10.1007/s11356-011-0498-0>
- Díaz S.C. 2006. Estudio del comportamiento de las bacterias en suelos contaminados con petróleos nuevos e intemperizados de la Venta, Tabasco. Tesis Universitaria. Universidad popular de la Chontalpa.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) 2006. NORMA MEXICANA NMX-AA-134-SCFI-2006, Suelos-Hidrocarburos fracción pesada por extracción y gravimetría- Método de Prueba. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México D.F. 23p.
- DOF (Diario Oficial de la Federación) 2013. NORMA Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SSA1-2012, Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y lineamientos para el muestreo en la caracterización y especificaciones para la remediación. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. 19p.
- Dzionic A., Wojcieszńska D., and Guzik U. 2016. Natural carriers in bioremediation: A review. *Electronic Journal of Biotechnology*. 23: 28-36. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2016.07.003>
- EPA (Environment Protection Agency). 1996. Method 3540C Mod. Soxhlet Extraction. Washington, DC. USA. 8 p.
- FAO 2016. Base referencial mundial del recurso suelo. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Roma Italia. 218 p.

- Fayeulle A., Veignie E., Slomianny C., Dewailly E., Munch J.C., and Rafin C. 2014. Energy-dependent uptake of benzo[a]pyrene and its cytoskeleton-dependent intracellular transport by the telluric fungus *Fusarium solani*. *Environmental Science and Pollution Research*. 21(5): 3515-3523. <https://doi.org/10.1007/s11356-013-2324-3>
- Fernández L. L.C., Rojas A. N.G., Roldán C.T.G., Ramírez I.M.E., Zegarra M.H.G., Uribe H.R., Reyes A.R. J., Flores H.D y Arce O.J.M. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelo aplicadas a la remediación de sitios contaminados. Instituto Mexicano del Petróleo. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales e Instituto Nacional de Ecología. México, D.F. 179 p.
- Ferrera-Cerrato R., Alarcón A., Mendoza-López M.R., Sangabriel W., Trejo- Aguilar D., Cruz-Sánchez J.S., López-Ortiz C., y Delgadillo-Martínez, J. 2007. Fitorremediación de un suelo contaminado con combustóleo usando *Phaseolus coccineus* y fertilización orgánica e inorgánica. *Agrociencia*. 41(8): 817-826.
- FitzPatrick E.A. 1980. Suelos Su formación, Clasificación y Distribución. Continental S.A., de C.V. México D.F. 430 p.
- Font F. 2003. Las especies del género *Jatropha* L (Euphorbiaceae, Crotonoideae) en Argentina. *Revista del Círculo de Coleccionistas de Cactus y Crasas de la República Argentina*. 2 (1):4-20.
- Funada R., Yamagishi Y., Begum S., Kudo K., Nabeshima E., Nugroho DW., Hasnat R.M., Oribe Y., and Nakaba S. 2016. Xylogenesis in Trees: From Cambial Cell Division to Cell Death (pp: 25-43). *In*: Kim SY., Funada R and Singh PA (eds). *Secondary Xylem Biology. Origins, Functions and Applications*. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00003-6>.
- Gamal R. 2005. Role of arbuscular mycorrhizal fungi in phytoremediation of soil rhizosphere spiked with poly aromatic hydrocarbons. *Microbiology*. 33:(1) 41-50.
- Gary J. H., y Handwerk G. E. 2003. Refino de petróleo: Tecnología y economía. Reverté, Loreto. Barcelona. 391p.
- Ghosh M., and Singh S.P.2005. A Review on Phytoremediation of Heavy Metals and Utilization of Its Byproducts. *Applied Ecology and Environmental Research*. 3: 1-18. <http://dx.doi.org/10.15666/aeer/0301-001018>
- Gill S.S., y N. Tuteja. 2010. "Reactiveoxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants". *Plant. Physiol. Biochem*. 48: 909-930.
- González C.M.C., Carrillo G.R., Carrillo G.r., Evangelista L. S., Brito B. R., Sanchez L. A., Perea V.Y.E. 2015. Aislamiento, inoculación y efecto de consorcios micorrízicos en *Jatropha*

- curcas: Artículo original de Investigación. Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 6(2): 5. <https://doi.org/10.7603/s40682-015-0005-2>
- González-Moscoso M., Rivera-Cruz M.C., and Trujillo-Narcía A. 2019. Decontamination of soil containing oil by natural attenuation, phytoremediation and chemical desorption and chemical desorption. *International Journal Phytoremediation*. 21(8):768-776. <https://doi.org/10.1080/15226514.2019>.
- Gupta D, Singh L.K., Gupta A.D., and Babu V. 2012. Phytoremediation: An Efficient Approach for Bioremediation of Organic and Metallic Ions Pollutants (pp: 213-240). *In: Mohee R and Mudhoo A. (eds). Bioremediation and Sustainability: Research and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. New Jersey. USA.
- Hacke U.G., and Sperry J.S. 2001. Functional and ecological xylem anatomy. *Perspectives in Plant. Ecology, Evolution and Systematic*. 4 (1): 97-115. <https://doi.org/10.1078/1433-8319-00017>
- Hasanuzzaman M., Bhuyan M. H. M. B., Zulfiqar F., Raza, A., Mohsin S. M., Mahmud J. A., Fujita M., and Fotopoulos, V. 2020. Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants*. 9(8): 681. <https://doi.org/10.3390/antiox9080681>
- Hasanuzzaman M.; Hossain M.A.; Teixeira da Silva J.A., and Fujita, M. 2012. Plant responses and tolerance to abiotic oxidative stress: Antioxidant defense is a key factor (pp. 261-316). *In: Bandi V., Shanker A.K., Shanker C., and Mandapaka M. (Eds). Crop Stress and its Management: Perspectives and Strategies*. Springer. Berlin, Germany.
- Hegazy A.K., Emam M.H., Lovett-Doust L., Azab E., and El-Khatib A.A. 2017. Response of duckweed to lead exposure: phytomining, bioindicators and bioremediation. *Desalination and Water Treatment*. 70:227-34. <https://doi.org/10.5004/dwt.2017.20545>.
- Heller J. 1996. Phytocult. *Jatropha curcas* L. Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops 1. Institute of Plant Genetics and Crops Plant Research, Gatersleben/ international Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italia.
- Hernández-Ortega H. A., Alarcón A., Ferrera-Cerrato R., Zavaleta-Mancera H. A., López-Delgado H. A., and Mendoza-López M. R. 2012. Arbuscular mycorrhizal fungi on growth, nutrient status, and total antioxidant activity of *Melilotus albus* during phytoremediation of a diesel contaminated substrate. *Journal of Environmental Management*. 95, S319-S324.
- Hiltner L. 1904. Über Neuerer Erfahrungen und problem auf dem Gebeit der bodenbakteriologie und unter besonderer berucksinchtigung der grundungung und brache. *Arbeiten Deutscher Landwirtschafts Gesellschaft*. 98: 59-78.

- Hussain I., Puschenreiter M., Gerhard S., Schöftner P., Yousaf S., Wang A., Hussain S.J., and Reichenauer T.G. 2018. Rhizoremediation of petroleum hydrocarbon-contaminated soils: improvement opportunities and field applications. *Environmental Experimental Botany*. 147:202-219. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.12.016>
- Iglesias J.D y Talón M. 2008. Auxinas. En: Azcón-Bieto J y Talón M (eds). *Fundamentos de Fisiología*. 2ª. Ed. McGraw-Hill. Interamericana. Madrid, España.651p.
- INEGI. 2001. Diccionario de datos climatológicos. (Vectorial) Esc. 1:250 000 y 1: 1 000 000. México: Sistema Nacional de Información Geográfica. 64p.
- IUSS Working Group WRB. 2015. Base referencial mundial del recurso suelo 2014, actualización 2015. Sistema internacional de clasificación de suelos para la nomenclatura de suelos y la creación de leyendas de mapas de suelos. Informes sobre recursos mundiales de suelos 106. FAO, Roma. 205p.
- Jacques R.J.S., Bento F.M., Antonioli Z.I., and Camargo F.A.O. 2007. Biorremediação de solos contaminados com hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. *Ciência Rural* 37(4):1192–1201
- Jamil S., Abhilash P.C., Singh N., and Sharma P. N. 2009. *Jatropha curcas*: A potential crop for phytoremediation of coal fly ash. *Journal of Hazardous Materials*. 172(1): 269–275. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.07.004>
- Johnson L. F., and Curl E. A. 1972. *Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens*. Burgess. Publishing Company. Mineapolis, MN, USA. 247 p.
- Joner E. J., and Leyval C. 2003. Rhizosphere gradients of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) dissipation in two industrial soils and the impact of arbuscular mycorrhiza. *Environmental Science and Technology*. 37: 2371-2375.
- Juwarkar A. A., Yadav S. K., Kumar P., and Singh S. K. 2008. Effect of biosludge and biofertilizer amendment on growth of *Jatropha curcas* in heavy metal contaminated soils. *Environmental Monitoring and Assessment*. 145(1-3): 7-15. <https://doi.org/10.1007/s10661-007-0012-9>
- Kohler J., Hernández J.A., Caravaca C.F., and Roldán A. 2008. Plant-growth-promoting rhizobacteria and arbuscular mycorrhizal fungi modify alleviation biochemical mechanisms in water-stressed plants. *Functional Plant Biology*. 35: 141-151. <http://dx.doi.org/10.1071/FP07218>
- Kummerová M., Zezulka S., Babula P., Váňová L. 2013. Root response in *Pisum sativum* and *Zea mays* under fluoranthene stress: morphological and anatomical traits. *Chemosphere*. 90: 665-673. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.09.047>

- Liang E., Balducci L., Ren P and Rossi S. 2016. Xylogenesis and Moisture Stress. In: Kim SY., Funada R and Singh PA (eds). Secondary Xylem Biology. Origins, Functions, and Applications. (pp:45-54). Elsevier Inc. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-802185-9.00003-6>.
- Liu H., Weisman D., Ye Y., Cui B., Huang Y., Colón-Carmona A., and Wang Z. 2009. "An oxidative stress response to polycyclic aromatic hydrocarbon exposure is rapid and complex in *Arabidopsis thaliana*". *Journal Plant Science*. 176 (3): 375-382. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.12.002>.
- Liu S.H., Zeng G.M., Niu Q.Y., Liu Y., Zhou L., Jiang L.H., Tan X. F., Xu P., Zhang, C., and Cheng M. 2017. Bioremediation mechanisms of combined pollution of PAHs and heavy metals by bacteria and fungi: A mini review. *Bioresource Technology*. 224: 25-33. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.11.095>
- Lluch U.J. 2008. Tecnología y margen de refino del petróleo. Ediciones Díaz de Santos. Madrid. España. 464p
- Lozano S., Brito B. R., Sánchez L. A., Perea V. Y.S. 2015. Aislamiento, inoculación y efecto de consorcios micorrízicos en *Jatropha curcas* Revista Latinoamericana de Biotecnología Ambiental y Algal. 6(2): 62-74. <https://doi.org/10.7603/s40682-015-0005-2>
- Ma B., Lv X., He I., and Xu J. 2016. Assessing adsorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on *Rhizopus oryzae* cell wall components with water-methanol cosolvent model. *Ecotoxicology Environmental Safety*. 125:55-60. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.11.032>.
- Madigan M.T., Martinko J.M., Bender K.S., Buckley D.H., and Stahl D.A. 2015. Biología de los Microorganismos. 14a edición. Pearson Educación S.A. Madrid, España. 1099 p.
- Marco-Urrea E., García-Romera I., and Aranda, E. 2015. Potential of non-ligninolytic fungi in bioremediation of chlorinated and polycyclic aromatic hydrocarbons. *New Biotechnology*. 32(6): 620-628. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2015.01.005>
- Marschner P and Rengel A. 2012. Nutrient Availability in Soils (pp: 315-328). In: Marschner p (ed). Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. Elsevier. San Diego, CA. USA
- Martínez H, J., Bautista R, E., Hernández, F.M. 2020. *Jatropha curcas* L. no tóxica: cultivo alternativo para los suelos ácidos de Tabasco, México. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias Centro de Investigación Regional Golfo Centro. Tabasco. México. 40p.
- Martínez-Herrera J., Sishuraju P., Francis G., Ortiz DG., and Becker K 2006. Chemical composition, toxic/antimetabolic constituents, and effects of different treatments on their

- levels, in four provenances of *L.* from Mexico. *Food Chemistry*. 96(1), 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2005.01.059>
- McMurry J. 2008. Química orgánica, 7a edición. Cengage Learning Editores, S.A. de C.V. México D.F. 1122 p.
- Mickelbart M. V., Hasegawa P.M and Bailey-Serres J. 2015. Genetic mechanisms of abiotic stress tolerance that translate to crop yield stability. *Nature Reviews Genetics*. 16 (4): 237-251. <https://doi.org/10.1038/nrg3901>
- Mu Z., Zhang S., Zhang L., Liang A., and Liang Z. 2006. Hydraulic conductivity of whole root system is better than hydraulic conductivity of single root in correlation with the leaf water status of maize. *Bot. Stud.* 47, 145
- Nardini C., Di Salvo L., and García D. S. I. 2011. Micorrizas arbusculares: asociaciones simbióticas e indicadores de calidad ambiental en sistemas de cultivos extensivos. *Revista Argentina de Microbiología*. 43: 311–312.
- Navarro L., Álvarez M., Grosso J.L., y Uriel Navarro U. 2004. Separación y caracterización de resinas y asfáltenos provenientes del crudo castilla. evaluación de su interacción molecular. *Ciencia, Tecnología y Futuro*. 2 (5) 53-67.
- Nero F.B. 2020. Phytoremediation of petroleum hydrocarbon contaminated soils with two plant species: *Jatropha curcas* and *Vetiveria zizanioides* at Ghana Manganese Company Ltd. *International Journal of Phytoremediation*. 23(2):171-180. <https://doi.org/10.1080/15226514.2020.1803204>
- Nogueira L., Inckot R., Santos G., Sousa L., and Bona C. 2011. Phytotoxicity of petroleum contaminated soil and bioremediated soil on *Allophylus edulis*. *Rodriguesia*. 62 (3): 459-466. <https://doi.org/10.1590/2175-7860201162302>.
- OECD.1984. Test 208. Terrestrial plant test: seed ling emergence and seed ling growth test. Organization for Economic Co-operation and Development. Guía técnica. París, Francia. 21 p.
- Oliveros-Bastidas A.J., Macías F.A., Carrera F.C., Marín D., y Molinillo J.M.G. 2009. Root exudates and their relevance to the allelopathic interactions. *Química Nova*. 32(1): 198-213.
- Orocio-Carrillo J. A., Rivera-Cruz M.C., Aranda-Ibañez M. E., Trujillo-Narcía A., Hernández-Gálvez G., and Mendoza-López R. M. 2019. Hormesis under oil-induced stress in *Leersia hexandra* Sw. Used as phytoremediator in clay soils of the Mexican humid tropic. *Ecotoxicology*. 28(9): 1063-1074. <https://doi.org/10.1007/s10646-019-02106-1>.
- Pabón L. C., y Hernández-Rodríguez P. 2012. Importancia química de *Jatropha curcas* y sus aplicaciones biológicas, farmacológicas e industriales Chemical importancia of *Jatropha*

- curcas* and su biológica, farmacología y aplicaciones industriales. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 17(2): 194-209. <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
- Paul E. A. 2015. Soil microbiology, ecology and biochemistry. 4a edition. Academic Press. Colorado State University. USA. 604p.
- PEMEX (Petróleo Mexicano). 2022. Características del petróleo crudo en México. Consultado:24,11,2022.https://www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicasdelpetroleo.html#:~:text=Es%20un%20recurso%20no%20renovable,hidr%C3%B3geno%20son%20los%20principales%20elementos.
- Pepper L.I., Gerba P.C., and Gentry J.T. 2015. Environmental microbiology. 3a edition. Academic Press, Elsevier. San Diego CA, USA. 728p.
- Peralta-Pérez M.R., y Volke-Sepúlveda, T.L. 2012. "La defensa antioxidante en las plantas: Una herramienta clave para la fitorremediación". *Revista Mexicana Ingeniería Química*.11: 75-88.
- Pérez V. A., Valdés R, O.A., García Pérez (editores).2013. Manual de buenas prácticas para el cultivo de *Jatropha curcas* L. Colegio de Postgraduados. Veracruz, México. 99 p.
- Pérez-Hernández I., Ochoa-Gaona S., Adams R. H., Rivera-Cruz M. C., Pérez-Hernández V., Jarquín-Sánchez A., Geissen V., and Martínez-Zurimendi P. 2017. Growth of four tropical tree species in petroleum-contaminated soil and effects of crude oil contamination. *Environmental Science and Pollution Research*. 24(2): 1769-1783. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-7877-5>
- Pérez-Hernández I., Ochoa-Gaona S., Adams Schroeder H.R., Rivera-Cruz M.C., and Geissen V. 2013. Tolerance of four tropical tree species to heavy petroleum contamination. *Water Air Soil Poll*. doi:10.1007/s11270-013-1637-7
- Phillips J.M. and D.S. Hayman. 1970. Improved procedures for clearing roots and staining parasitic and vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi for rapid assessment to infection. *Transactions British Mycological Society*. 55: 158-161. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(70\)80110-3](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(70)80110-3).
- Porta C.J., López-Acevedo RM y Roqueri de la BC. 2003. Edafología Para la agricultura y el medio ambiente. 3ª Edición. Mundi-Prensa. Madrid, España. 960 p.
- Pothuluri J.V. and Cerniglia C. E.1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons (pp. 92–124) *In*: Chaudhry G.R (ed). *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Portland, OR: Dioscorides. USA.

- Prashar P., Kapoor N., and Sachdeva S. 2014. Rhizosphere: Its structure, bacterial diversity and significance. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 13(1): 63-77. <https://doi.org/10.1007/s11157-013-9317-z>
- Querejeta J., Barea J.M., Allen M.F., Caravaca F., and Roldan A. 2003. Differential response of $\delta^{13}\text{C}$ and water use efficiency to arbuscular mycorrhizal infection in two arid land woody plant species. *Oecologia*. **135**: 510–515.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Rabie G.H. 2005. Role of Arbuscular Mycorrhizal Fungi in Phytoremediation of Soil Rhizosphere Spiked with Poly Aromatic Hydrocarbons. *Mycobiology*. 33(1): 41-50. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2005.33.1.041>
- Recio del B.F.H. 2013. Química orgánica. 4a edición. McGraw-Hill Interamericana. México. DF. 220p.
- Reyes F.A., Daza C.E, y Rondón H. A. 2012. Determinación de las fracciones SARA de asfaltos colombianos envejecidos al medio ambiente empleando cromatografía líquida en columna. *Revista EIA*. 17: 47-56. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1794-12372012000100005&lng=en&tlng=es.
- Reyes F.A., Daza C.E., Rondón H.A. 2012. Determinación de las fracciones sara de asfaltos colombianos envejecidos al medio ambiente empleando cromatografía líquida en columna. *Revista EIA* 17: 47-56
- Reyes Q.C.K. 2003. Fitorremediación de un suelo contaminado con petróleo empleando *Jatropha curcas* L., una planta productora de biodiesel. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Programa de Edafología, IRENAT. 96 p.
- Reyes-César A., Absalón Á. E., Fernández F. J., González J. M., and Cortés-Espinosa D. V. 2014. Biodegradation of a mixture of PAHs by non-ligninolytic fungal strains isolated from crude oil-contaminated soil. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 30(3): 999-1009. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1518-7>
- Rivera-Cruz M.C., Ferrera R., Sánchez P., Volke V., Fernández L.L., y Rodríguez R.R. 2004. Descontaminación de suelos con petróleo crudo mediante microorganismos autóctonos y pasto alemán [*Echinochloa polystachya* (H.B.K.) Hitchc.]. *Agrociencia*. 38 (1)11-12.
- Rivera-Cruz M.C., Trujillo-Narcía A., Trujillo-Rivera E. A., Arias-Trinidad A., and Mendoza-López M. R. 2016. Natural attenuation of weathered oil using aquatic plants in a farm in southeast

- Mexico. *International Journal of Phytoremediation*. 18(9): 877-884.
<https://doi.org/10.1080/15226514.2016.1156632>
- Rodríguez-Uribe M. L., Peña-Cabriales J. J., Rivera-Cruz M.C., y Délano-Frier J. P. 2021. Native bacteria isolated from weathered petroleum oil-contaminated soils in Tabasco, Mexico, accelerate the degradation petroleum hydrocarbons in saline soil microcosms. *Environmental Technology and Innovation*.
<https://doi.org/10.1016/j.eti.2021.101781>
- Saleh S., Huang XD., Greenberg BM., and Glick BR. 2004. Phytoremediation of persistent organic contaminants in the environment (pp. 115–34). *In*: Singh A and Ward O (eds). *Soil Biology: Vol. 1. Applied Bioremediation and Phytoremediation*. Springer-Verlag, Berlin, Alemania.
- Salisbury B.F y Ross W.C. 2000. Fisiología de las plantas 3. Desarrollo de las plantas y fisiología ambiental. Paraninfo S.A. 467p.
- Sari G., Trihadiningrum Y., and Ni'matuzahroh N. 2018. Petroleum hydrocarbon pollution in soil and surface water by public oil fields in Wonocolo sub-district, Indonesia. *Journal Ecology Eng*. 19(2):184-193. <https://doi.org/10.12911/22998993/82800>.
- Sarma H. 2011. Metal hyperaccumulation in plants: A review focusing on phytoremediation technology. *Journal of Environmental Science and Technology*. 4(2): 118-138.
<https://doi.org/10.3923/jest.2011.118.138>
- Schmook B., and Seralta-Peraza, L.1997. *J. curcas*: distribution and uses in the Yucatan Peninsula of Mexico. (pp: 53-57). *In*: Gübitz M.G., Mittelbach M., and Trabi M (eds). *Biofuels and industrial products from Jatropha curcas*. México D.F.
- SGM (Servicio Geológico Mexicano). 2017. Características del petróleo. www.sgm.gob.mx/Web/MuseoVirtual/Aplicaciones_geologicas/Caracteristicas-del-petroleo.html . Consultado el 10 de agosto del 2022.
- Shahriari M.H., Savaghebi-Firoozabadi G., Azizi M., Kalantari F., and Minai-Tehrani D. 2007. Study of growth and germination of *Medicago sativa* (alfalfa) in light crude oil-contaminated soil. *Res. J. Agriculture Biology and Scienses*. 3: 46-51.
- Shukry M.W., Al-Hawas G.H.S., Al-Moaik R.M.S., and El-Bendar M.A. 2013. Effect of petroleum crude oil on mineral nutrient elements and soil properties of jojoba plant (*Simmondsia chinensis*). *Acta Botanica Hungarica*. 55 (1-2): 117-133.
<https://doi.org/10.1556/ABot.55.2013.1-2.8>.
- SSS (Soil Survey Staff). 2014. Keys to Soil Taxonomy. 12a. ed. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Service. Washington, D.C. p 373.

- Taiz L., Zeiger E., Moller M.I and Murphy A. 2015. *Plant Physiology and Development*. 6^a edition, Sinauer Associates, Inc. Massachusetts, USA. 761 p.
- Thangavel P., and Subhram C. V. 2004. Phytoextraction- Role of hyper accumulators in metal contaminated soils. *Proceedings of the Indian National Science Academy. Part B*. 70(1):109-130.
- Thomas J.E., Triggia A.A., Correia C.A., Fulho C.V., Xavier D.J.A., Vieira M. J.C., Souza F.J.E., P.J.L., Milani de R.N.C., Santos P.N.E., Melo G.P.C.V., de Souza C.R., y Vinicius B.R. 2001. *Fundamentos de ingeniería de petróleo*. Interciencia, Petrobras. 270p.
- Timonen, S., and Marschner P. 2006. Mycorrhizosphere concept. *In: Mukerji K.G., Manoharachary C., and Singh J (eds.). Microbial activity in the rhizosphere*. Springer. Berlin, Germany.
- TOMBG (Tropicos.org. Missouri Botanical Garden) 2022. Missouri Botanical Garden. Saint Louis, Missouri. USA. <https://tropicos.org/name/12800067>. Consultado 19, Nov. 2022
- Toral O. C., Iglesias J., Montes O. S., Sotolongo J., García S., y Torsti M. 2008. *Jatropha curcas* L., una especie arbórea con potencial energético en Cuba. *Pastos y Forrajes*. 31(3): 191-207. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=269119697001>
- Toxfaqstm 2021. Hidrocarburos aromáticos policíclicos (Haps) [polycyclic aromatic hydrocarbons (Pahs)] | toxfaq | atsdr. 2021, enero 26. https://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts69.html
- Trujillo-Narcía A., Rivera-Cruz MC., Trujillo-Rivera EA., and Roldán GA. 2018. Reintroducing plant coverage in a tropical wetland contaminated with oil and sulfate: rhizosphere effects on *Desulfovibrio* populations. *International Journal Tropical Biology*. 66(2):908-917
- USEPA-3540C 1996. Soxhlet extraction organics. SW-846 test methods for evaluating solid waste physical/chemical methods. <http://www.epa.gov/wastes/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3540c.pdf> [accessed 2021 nov 20].
- Van, R. M. 2011. Environmental degradation of petroleum hydrocarbons. Master thesis. Utrecht University the Netherlands.
- Varjani S.J., and Upasani V.N. 2013. Comparative studies on bacterial consortia for hydrocarbon degradation. *International Journal Innovative Research Science Engineering Technology*. 2(10): 5377-5383
- Vázquez-Luna M., Montiel-Flores A., Vázquez-Luna D., Herrera-Tenorio M.F. 2011. Impacto del petróleo crudo en suelo sobre la microbiota de vida libre fijadora de nitrógeno. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*. 13 (3): 511-523.

- Verdin A., Sahraoui A. L.H., Robinson G., and Durand, R. 2005. Effect of the polycyclic aromatic hydrocarbon, benzopyrene, on the intracellular protein composition of *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum*. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 55(3): 171–174. doi:10.1016/j.ibiod.2004.11.002
- Verdin A., Sahraoui A. L.H., Newsam R., Robinson G., and Durand R. 2005. Polycyclic aromatic hydrocarbons storage by *Fusarium solani* in intracellular lipid vesicles. *Environmental Pollution*. 133(2): 283–291. doi:10.1016/j.envpol.2004.05.040
- Wade L. G. 2012. *Química orgánica*. Pearson Educación. 7a edición. Pearson Educación. México D.F. 744 p.
- Widdowson M.A., Shearer S., Andersen R.G., and Novak J.T. 2005. Remediation of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in groundwater using poplar trees. *Environmental Science and Technology*. 39: 1598-1605
- Wu Y. R., Luo Z. H., and Vrijmoed L. L. P. 2010. Biodegradation of anthracene and benz[a]anthracene by two *Fusarium solani* strains isolated from mangrove sediments. *Bioresource technology*, 101(24): 9666-9672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.07.049>
- Wyszowska J and Kucharsk J. 2000. Biochemical Properties of Soil Contaminated by Petrol. *Polish Journal of Environmental Studies*. 9(6): 479-485
- Xie W., Zhang Y., Li R., Yang H., Wu T., Zhao L., and Lu Z. 2017. The responses of two native plant species to soil petroleum contamination in the Yellow River Delta. *Environment Science Pollution Reser*. 24(31): 24438-24446. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0085-0>.
- Zambrano K., y Araujo, I. 2015. Tratamiento biológico de sedimentos contaminados con hidrocarburos. Tratamiento biológico de los sedimentos de una fosa contaminados con hidrocarburos utilizando bacterias autóctonas. <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:101:1-201506062233>
- Zubizarreta S.A., Martínez M.J., Rivas P.P., Gómez I.S., y Sanz B.A. 2018. Revisión de la literatura sobre efectos nocivos de la exposición laboral a hidrocarburos en trabajadores en ambiente externo. *Medicina, Seguridad y Trabajo*. 64 (252) 271-94.

ANEXOS

Cuadro 1. Análisis de varianza de altura de planta, diámetro basal y hojas totales en 189 tratamientos (7 dosis de Petróleo por 27 semanas)

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
<u>Altura</u>					
Petróleo	6	24289.6	4048.3	4535.236	$<2.2e^{-16}$ ***
Semana	26	16639.7	640	716.975	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: UEE	21	2131.2	101.5	113.694	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: semana	156	8888.1	57	63.829	$<2.2e^{-16}$ ***
Residuales	546	487.4	.9		
<u>Diámetro basal</u>					
Petróleo	6	2504.7	417.44	571.259	$<2.2e^{-16}$ ***
Semana	26	28172.6	1083.56	1482.823	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: UEE	21	445.8	21.23	29.048	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: semana	156	1173.6	7.52	10.295	$<2.2e^{-16}$ ***
Residuales	546	399	0.73		
<u>Hojas totales</u>					
Petróleo	6	8029.2	1338.21	1058.531	$<2.2e^{-16}$ ***
Semana	26	22141.1	851.58	673.606	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: UEE	21	1212.5	57.74	45.671	$<2.2e^{-16}$ ***
Petróleo: semana	156	2159.9	13.85	10.952	$<2.2e^{-16}$ ***
Residuales	546	690.3	1.26		

†: 1 a 27 semanas. (Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$).

‡Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 2. Análisis de varianza del crecimiento y materia seca de *J. curcas* expuesta al petróleo crudo a la semana 27.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr > F
<u>Altura (cm)</u>					
Petróleo	6	1968.5	326.4	61.52	<0.0001
Error	21	111.4	5.31		
Total	27	2070.06			
r ²	0.93				
CV	8.8				
<u>Diámetro basal</u>					
Petróleo	6	181.07	30.18	9.03	0.0001
Error	21	70.2	3.34		
Total	27	251.2			
r ²	0.64				
CV	7.43				
<u>Número de hojas</u>					
Petróleo	6	659.7	109.95	18.18	<0.0001
Error	21	127	6.05		
Total	27	786.7			
r ²	0.79				
CV	12.17				
<u>Área de hoja</u>					
Petróleo	6	14566.04	2427.67	17.74	<0.0001
Error	21	2874.10	136.86		
Total	27	1744.14			
R ²	0.84				
CV	11.62				
<u>Raíz número</u>					
Petróleo	6	83474.71	13912.45	17.05	<0.0001
Error	21	171135	815.95		
Total	27	100609.7			

r ²	.78				
CV	13				
<u>Raíz longitud</u>					
Petróleo	6	1588.97	264.83	7.55	0.0002
Error	21	736.57	35.07		
Total	27	2325.54			
r ²	0.59				
CV	19.80				
<u>Materia seca raíz</u>					
Petróleo	6	316.8	52.8	26.27	<0.0001
Error	21	42.2	2.01		
Total	27	359			
r ²	.85				
CV	17.84				
<u>Materia aérea</u>					
Petróleo	6	1592.8	265.47	12.85	<0.0001
Error	21	433.86	20.66		
Total	27	2026.67			
r ²	.72				
CV	19.1				

†Semana 27 (Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$). †: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 3. Análisis de varianza de población de bacterias heterótrofas (BH), bacterias hidrocarbonoclasticas (BHC), Actinomicetos (ACT), hongos totales (HT) en rizosfera de J. curcas después de 27 semanas de fitorremediación. Julio a diciembre 2021.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
<u>BH</u>					
Petróleo	6	3948546345113.4	658091057518.9	218.8	<0.0001
Error	21	63157792857.8	3007513945.6		
Total	27	4011704137971.3			
<u>BHC</u>					
Petróleo	6	1538240378.2	256373396.37	60.7	<0.0001
Error	21	88583544.75	4218264.04		
Total	27	1626823922.96			
<u>ACT</u>					
Petróleo	6	6712246259075.43	1118707709845.9	34.4	<0.0001
Error	21	681462332501.25	32450587261.91		
Total	27	7393708591576.68			
<u>HH</u>					
Petróleo	6	20919210.93	3486525.16	96.28	<0.0001
error	21	760475.75	36213.13		
Total	27	21679686.63			
<u>HHC</u>					
Petróleo	6	190980467.86	1997948.77	15.93	<0.0001
Error	21	41956924.25			
Total	27	232937392.11			

†Semana 27. Tukey $p \leq 0.05$, $n=12$. †: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 4. Análisis de la colonización del hongo micorrícico arbusculares (hifas, arbusculos, vesículas, esporas intraradicales y total) en simbiosis con *Jatropha curcas* expuesta a diferentes concentraciones de petróleo crudo. Semana 27.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
<u>Hifas</u>					
Petróleo	6	3100.74	516.79	3.69	0.0117
Error	21	2944.19	140		
Total	27	6044.93			
<u>Arbusculos</u>					
Petróleo	6	213.96	35.66	3.55	0.0139
Error	21	211.05	10.05		
Total	27	425.01			
<u>Vesículas</u>					
Petróleo	1	1908.07	318.01	10.55	<0.0001***
Error	21	633.13	30.15		
Total	27	2541.2			
<u>Esporas</u>					
Petróleo	6	77.59	12.93	0.62	0.7098
Error	21	435.8	20.75		
Total	27	513.39			
<u>Colonización total</u>					
Petróleo	6	817	136.17	6.37	0.0006***
Error	21	449	21.38		
Total	27	1266			

†Semana 27. Tukey $p \leq 0.05$, $n=9$), †: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 5. Análisis de varianza de Índice relativo de toxicidad (IRT) al petróleo crudo en altura de planta (AP), diámetro basal (DB), hojas totales (NHT), área de hoja (AH), número de raíces (NR), longitud de raíz (LR), materia de raíz (MSR) y materia área (MSA) de *Jatropha curcas* a la semana 27 de exposición a petróleo.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
<u>AP</u>					
Petróleo	5	0.38	0.08	37.87	<.0.0001***
Error	18	0.04	0.0002		
Total	23	0.41			
r ²	.89				
CV	8.1				
<u>DB</u>					
Petróleo	5	0.30	0.6	9.83	<.0.0001***
Error	18	0.11	0.1		
Total	23	0.42			
r ²	.66				
CV	7.7				
<u>NHT</u>					
Total	5	0.28	0.06	21.39	<.0.0001***
Petróleo	18	0.05	0.0002		
Error	23	0.32			
Total	.82				
r ²	8.1				
CV					
<u>AH</u>					
Petróleo	5	1.57	0.31	23.97	<.0.0001***
Error	18	0.24	0.01		
Total	23	1.81			
R2	.83				
CV	10.3				

<u>NR</u>					
Petróleo	5	1.47	0.29	17.27	<.0.0001***
Error	18	0.31	0.02		
Total	23	1.77			
r ²	.78				
CV	14.2				
<u>LR</u>					
Petróleo	5	3.44	0.69	15.89	<.0.0001***
Error	18	0.78	0.4		
Total	23	4.22			
r ²	.76				
CV	14.7				
<u>MSR</u>					
Petróleo	5	1.04	0.21	17.85	<.0.0001***
Error	18	0.21	0.01		
Total	23	1.25			
r ²	.79				
CV	20.3				
<u>MSA</u>					
Petróleo	5	1.22	0.24	10.97	.0.0001***
Error	18	0.40	0.02		
Total	23	1.63			
r ²	.68				
CV	21.4				

†Semana 27. Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$). †: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 6. Análisis de varianza del Índice de absoluto de toxicidad para crecimiento (IATC), índice de absoluto de toxicidad para producción (IATP) e índice total de toxicidad (ITT) al petróleo crudo que incluye IATC+IATP de *Jatropha curcas* a la semana 27.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
<u>IATC</u>					
Petróleo	5	0.61	0.12	23.81	<.0.0001***
Error	18	0.09	0.01		
Total	23	0.70			
r ²	.83				
CV	7.6				
<u>IATP</u>					
Petróleo	5	1.1	0.22	17.72	<.0.0001***
Error	18	0.22	0.01		
Total	23	1.33			
r ²	.78				
CV	18.1				
<u>ITT</u>					
Petróleo	5	0.69	0.14	24.8	<.0.0001***
Error	18	0.10	0.01		
Total	23	0.78			
r ²	0.84				
CV	8.6				

†Semana 27. (Tukey p≤0.05, n=24 para IATC; n=8 para IATP; n=32 para ITT).
‡: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.

Cuadro 7. Análisis de varianza de la remoción de hidrocarburos totales del suelo contaminado con petróleo durante julio a diciembre 2021.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	Pr> F
Remoción					
Petróleo	6	8390.44	1398.41	81.97	<0.0001***
Error	21	358.27	17.06		
Total	27	8748.7			
r ²	0.95				
CV	10.2				

†: Semana 27. Tukey $p \leq 0.05$, $n=4$). †: Significancia: *Significativo; **Muy significativo; ***Altamente significativo.