



COLEGIO DE POSTGRADUADOS
INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS TABASCO

POSTGRADO EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

ESTADOS FENOLÓGICOS TEMPRANOS DE FRIJOL [*Vigna unguiculata* (L.)
Walp], BACTERIAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: INDICADORES DE TOXICIDAD
DEL PETRÓLEO INTEMPERIZADO

ANA GUADALUPE RAMÍREZ MAY

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO
PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

H. CÁRDENAS, TABASCO

2012

La presente tesis titulada: **Estados fenológicos tempranos de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], bacterias y actividad enzimática: indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado**, realizada por la alumna Ana Guadalupe Ramírez May, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGROALIMENTARIA EN EL TRÓPICO

CONSEJO PARTICULAR

Consejera de tesis:



Dra. María del Carmen Rivera Cruz

Asesor:



Dr. David Jesús Palma López

Asesor:



Dr. Alejandro Alarcón

H. Cárdenas, Tabasco, México, 11 de Abril de 2012

La presente tesis titulada “**Estados fenológicos tempranos de frijol [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], bacterias y actividad enzimática: indicadores de toxicidad del petróleo intemperizado**”, fue dirigida por la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, Profesor Investigador del Colegio de Postgraduados Campus Tabasco.

Este estudio fue financiado con recursos del proyecto de Fondos Mixtos CONACYT-Tabasco TAB-2009-C18-122174 “Desarrollo de modelo ecotoxicológico como alternativa de evaluación de la restauración de suelos contaminados con petróleo”, y parcialmente por recursos propios del Campus-Tabasco y línea 8 de investigación del Colegio de Postgraduados Impacto y mitigación del cambio climático: Sector Agrícola y Forestal.

ESTADOS FENOLÓGICOS TEMPRANOS DE FRIJOL [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], BACTERIAS Y ACTIVIDAD ENZIMÁTICA: INDICADORES DE TOXICIDAD DEL PETRÓLEO INTEMPERIZADO

Ana Guadalupe Ramírez May
Colegio de Postgraduados, 2012

El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) al final de dos estados del crecimiento vegetal, en la densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre (BFN) en suelo-rizosfera, de asociación simbiótica (*Rhizobium*) en nódulos y la actividad enzimática de la ureasa en suelo plantado con *Vigna unguiculata*, para obtener indicadores biológicos de toxicidad. Se utilizaron dos Gleysoles del estado de Tabasco, México. Gleysol 1 (sitio 1) ubicado a 2 Km al sureste del Complejo Procesador de Gas La Venta, en el ejido José Narciso Roviroso, Huimanguillo, se colectaron en nueve puntos suelos con diferentes contenidos de HTPI (5 822, 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 23 313, 25 517, 28 465, 50 297 mg kg⁻¹). Gleysol 2 (sitio 2) del ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, Cárdenas se colectó un suelo con 2 706 mg kg⁻¹ HTP (biogénico). Se establecieron dos bioensayos en invernadero con 10 tratamientos cada uno, los cuales correspondieron a 9 dosis de HTPI y un testigo. El bioensayo uno (fase de plántula) y dos (fase de planta) se realizó por 30 y 120 días respectivamente. Se determinó la emergencia (%), la altura de planta, diámetro basal, biomásas (foliar, radical, nódulos y total), número y Leg-hemoglobina en nódulos. La densidad de BFN (BFN totales, *Azospirillum*, *Azotobacter*) y *Rhizobium* en nódulos (técnica de cuenta viable por dilución seriada en medios de cultivos selectivos), y la actividad enzimática de la ureasa en suelo (método colorimétrico de Kandeler y Gerber, 1988; Kandeler *et al.*, 1999). Se aplicó a cada variable análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, $p \leq 0.05$) según el diseño completamente al azar del programa SPSS versión 12. Los índices de impacto fitotóxico (ITIF), impacto tóxico en bacterias de vida libre (ITITBL), de asociación simbiótica (IITBS) y por actividad enzimática en suelo (IITS) se calcularon con la sumatoria de los índices relativos ($IRT = 1 - T_p/T_t$). Los resultados al día 30 y 120 evidencian diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de las variables en los dos estados del crecimiento vegetal, en la densidad de BFN totales, del grupo *Azospirillum* y *Azotobacter* en suelo-rizosfera, de *Rhizobium* en nódulos y la actividad enzimática de la ureasa. Los diferentes parámetros del crecimiento vegetativo en plántula y planta evidenciaron efectos negativos a la presencia de HTPI en suelo, pero la relación del efecto de cada parámetro no fue inversamente proporcional a la dosis de HTPI. Las BFN fueron las más sensibles a la presencia de HTPI. *Rhizobium* en la fase de plántula muestra efectos negativos a las dosis de HTPI, pero al día 120 es estimulado por dosis altas de HTPI, similares resultados se obtienen en la actividad enzimática de la ureasa en los dos periodos evaluados. Los valores de ITIF e ITITBL al día 30 y 120 mostraron efectos negativos a las dosis de HTPI, son positivos indicadores de toxicidad. El IITBS al día 30 muestra efectos negativos a la dosis de HTPI, y al día 120 los contenidos de HTPI estimulan el IITBS, por lo que la fase de plántula se considera un buen indicador de toxicidad. En el día 30 y 120 los valores de IITS no mostraron efectos negativos a las dosis de HTPI, se obtuvieron valores menores a cero, lo que indica que los contenidos de hidrocarburos en el suelo estimulan la variable respuesta.

Palabras claves: bacterias, nódulos, hidrocarburos, toxicidad.

BEAN STATES EARLY PHENOLOGICAL STAGES [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], BACTERIA AND ENZYMATIC ACTIVITY INDICATORS OF TOXICITY WEATHERED OIL

Ana Guadalupe Ramírez May
Colegio de Postgraduados, 2012

The objective of this research was to evaluate the effect of total petroleum hydrocarbon weathering (HTPI) at the end of two states of plant growth in the density of nitrogen fixing bacteria free living (BFN) in soil-rhizosphere, symbiotic association (*Rhizobium*) in nodules and enzyme activity of urease in soil planted with cowpea, for biological indicators of toxicity. We used two Gleysols from the state of Tabasco, Mexico. Gleysol 1 (site 1) located 2 km southeast of Gas Processing Complex Sale, in the ejido José Narciso Roviroza Huimanguillo, nine points were collected in soils with different contents of HTPI (5822, 6 536, 13 803 , 14 431, 15 923, 23 313, 25 517, 28 465, 50 297 mg kg⁻¹). Gleysol 2 (site 2) of the ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, Cardenas collected a soil with 2 706 mg kg⁻¹ HTP (biogenic). There were two greenhouse bioassays with 10 treatments each, which corresponded to 9 doses of HTPI and a witness. A bioassay (seedling stage) and two (plant phase) was performed for 30 and 120 days respectively. We determined the emergence (%), plant height, basal diameter, biomass (leaves, roots, nodules and total), number and Leg-hemoglobin in nodules. BFN density (BFN total, *Azospirillum*, *Azotobacter*) and *Rhizobium* nodules (viable count technique by serial dilution in selective culture media), and enzyme activity of urease in soil (colorimetric method Kandeler and Gerber, 1988; Kandeler *et al.*, 1999). Was applied to each variable and comparison analysis of variance (Tukey, $p \leq 0.05$) according to the randomized design of the program SPSS version 12. Phytotoxic impact rates (ITIF), toxic impact on free-living bacteria (ITITBL), of symbiotic (IITBS) and enzyme activity in soil (IITS) were calculated with the sum of the relative rates ($IRT = 1 - T_p/T_t$). The results at day 30 and 120 showed significant differences ($p \leq 0.05$) of the variables in the two states of plant growth in the density of total BFN, *Azospirillum* and *Azotobacter* group in soil-rhizosphere, of *Rhizobium* in nodules and activity urease enzyme. The different parameters of vegetative growth in seedling and plant showed negative effects of the presence of HTPI in soil, but the relationship of the effect of each parameter was inversely proportional to the dose of HTPI. The BFN were the most sensitive to the presence of HTPI. *Rhizobium* in the seedling stage shows adverse effects at the doses of HTPI, but at day 120 is stimulated by high doses of HTPI, similar results are obtained in the enzymatic activity of urease in the different parameters of vegetative growth in seedling and plant showed negative effects of the presence of HTPI in soil, but the relationship of the effect of each parameter was inversely proportional to the dose of HTPI. The BFN were the most sensitive to the presence of HTPI. *Rhizobium* in the seedling stage shows negative effects HTPI doses, but at day 120 is stimulated by high doses of HTPI, similar results are obtained in the enzymatic activity of urease in the two periods evaluated. The values of ITIF and ITITBL at day 30 and 120 showed adverse effects at doses of HTPI are positive indicators of toxicity. The daily IITBS 30 shows adverse effects at the dose of HTPI, and 120 days the contents of HTPI stimulate IITBS, so that the seedling stage is considered a good indication of toxicity. On day 30 and 120 IITS values showed no adverse effects at doses of HTPI, values were less than zero, which indicating that the content of hydrocarbons in soil stimulate a response variable.

Keywords: bacteria, nodules, hydrocarbons, toxicity.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento otorgado para realizar los estudios de Maestría en Ciencias en Producción Agroalimentaria en el Trópico y el desarrollo de esta investigación la cual forma parte de mi formación académica.

Al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas por la oportunidad otorgada para realizar mis estudios de Maestría en Ciencias.

A la Dra. María del Carmen Rivera Cruz, profesora investigadora del *Campus* Tabasco, encargada del Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada, quien dedicó su tiempo, paciencia, apoyo y sobre todo sus valiosas enseñanzas desde el comienzo de este proyecto de investigación, logrando bajo su dirección la culminación del mismo.

Al Dr. David Jesús Palma López por su apoyo, sugerencias realizadas y valiosas contribuciones en cada etapa de este trabajo de investigación.

Al Dr. Alejandro Alarcón por sus acertadas correcciones, importantes aportaciones y consejos para el desarrollo de la investigación y documento de tesis.

A mis compañeros del laboratorio de Microbiología, Angélica y Alfredo, por su valiosa ayuda en la realización del proyecto de investigación.

DEDICATORIA

A mi madre María Guadalupe May Pérez, por aconsejarme y apoyarme en cada etapa de mi vida, compartir las alegrías, tristezas y todos aquellos momentos que fueron claves para mi desarrollo como hija, hermana, persona y profesionalista... ¡Gracias!

Te quiero mucho

A mis hermanos, José David e Ingrid Vanessa, por ser parte importante en mi vida y estar siempre unidos a pesar de todo ¡Los quiero mucho!

A David Gustavo Vázquez Cruz, por estar conmigo en todo este tiempo, el cual ha sido muy especial, por tu apoyo, comprensión y por compartir todos los momentos que nos han ayudado a seguir adelante

Los amo y agradezco a Dios por permitirme estar con ustedes día con día.

CONTENIDO

	Pág.
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN	1
SECCIÓN II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Definición y componentes del ecosistema.....	3
2.1.1. El suelo: Definición y composición	5
2.1.1.1. Tipos de suelos según ecosistemas	7
2.2. La vegetación en el ecosistema: Las leguminosas	8
2.2.1. Rizosfera	8
2.2.1.1. Efecto de la rizosfera sobre las bacterias	10
2.3. Procesos de fijación de Nitrógeno	11
2.3.1. Proceso de fijación no simbiótica de Nitrógeno	12
2.3.1.1. Bacterias del género <i>Azotobacter</i>	13
2.3.1.2. Bacterias del género <i>Azospirillum</i> sp.....	14
2.3.2. Proceso de fijación simbiótica de Nitrógeno	14
2.3.2.1. Estructura del nódulo y proceso de fijación de Nitrógeno.....	16
2.4. Actividad enzimática en el suelo	18
2.4.1. Actividad ureasa del suelo	19
2.5. Definición y características del petróleo crudo	20
2.5.1. Tipos de petróleo crudo	22
2.5.2. Tipos de petróleo según su permanencia en el ambiente	24
2.5.2.1. Petróleo fresco	24
2.5.2.2. Petróleo intemperizado.....	25
2.6. La contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo.....	26
2.6.1. Efecto en propiedades físicas.....	26
2.6.2. Efecto en propiedades químicas	27
2.6.3. Efecto en planta	27
2.6.4. Efecto en microflora del suelo	28
2.7. Teoría de la toxicidad	29
2.7.1. La toxicidad del petróleo	31
2.7.2. Leguminosas como indicadoras de toxicidad.....	32
2.8. Discusión general de la revisión de literatura.....	32
SECCIÓN III. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo general.....	34
3.1.1. Objetivos específicos	34
SECCIÓN IV. HIPÓTESIS	35
4.1. Hipótesis general.....	35
4.1.1. Hipótesis específicas.....	35
SECCIÓN V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
5.1. Etapa 1. Trabajo de campo	37
5.1.1. Colecta y ubicación geográfica de los suelos	37
5.1.2. Análisis físicos y químicos de suelos	37
5.1.3. Material vegetal	41

	Pág.
5.1.4. Obtención de semillas y prueba de germinación	41
5.2. Etapa 2. Trabajo de invernadero	42
5.2.1. Establecimiento de bioensayo	42
5.2.1.1. Preparación de las unidades experimentales	44
5.2.2. Variables evaluadas en plántula	45
5.2.3. Variables evaluadas en planta	46
5.2.4. Variables microbiológicas en plántula y planta	46
5.2.5. Actividad enzimática ureasa en plántula y planta	49
5.3. Etapa 3. Análisis estadístico.....	50
SECCIÓN VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	52
6.1. Efecto de nueve concentraciones de petróleo intemperizado en el suelo sobre la emergencia y el crecimiento de la plántula de frijol pelón.....	52
6.1.1. Dinámica de emergencia de frijol pelón	52
6.1.2. Respuesta en crecimiento de frijol pelón (estado de plántula) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado	53
6.1.3. Biomasa seca en plántulas de frijol pelón	55
6.1.4. Número de nódulos en <i>Vigna unguiculata</i> con dosis crecientes de HTPI	57
6.1.5. Bacterias en rizosfera y suelo con petróleo intemperizado cultivado con <i>Vigna unguiculata</i>	58
6.1.5.1. Densidad de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre.....	58
6.1.5.1.1. Densidad de bacterias del género <i>Azospirillum</i> en suelo y rizosfera de <i>Vigna unguiculata</i>	60
6.1.5.1.2. Densidad de bacterias del género <i>Azotobacter</i> en suelo y rizosfera de <i>Vigna unguiculata</i>	62
6.1.5.2. Densidad de <i>Rhizobium</i>	64
6.1.6. Actividad enzimática en suelo con petróleo intemperizado.....	65
6.1.7. Relación de variables.....	66
6.1.8. Índices de toxicidad en suelo con petróleo intemperizado	67
6.1.8.1. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en <i>Vigna unguiculata</i>	67
6.1.8.2. Índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (IRITBL).....	69
6.1.8.3. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en <i>Vigna unguiculata</i>	71
6.1.8.4. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (ITITBL).....	72
6.1.8.5. Índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS).....	72
6.2. Efecto de nueve concentraciones de petróleo intemperizado en el suelo sobre el crecimiento de la planta de frijol pelón.....	74
6.2.1. Respuesta en crecimiento de frijol pelón (estado de planta) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado	74
6.2.2. Diámetro basal de <i>Vigna unguiculata</i>	77
6.2.3. Biomasa seca en plantas de frijol pelón	77

6.2.4. Número de nódulos en <i>Vigna unguiculata</i> con dosis crecientes de HTPI	79
6.2.5. Bacterias en rizosfera y suelo con petróleo intemperizado cultivado con <i>Vigna unguiculata</i>	81
6.2.5.1. Densidad de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre	81
6.2.5.1.1. Densidad de bacterias del género <i>Azospirillum</i> en suelo y rizosfera de <i>Vigna unguiculata</i>	83
6.2.5.1.2. Densidad de bacterias del género <i>Azotobacter</i> en suelo y rizosfera de <i>Vigna unguiculata</i>	84
6.2.5.2. Densidad de <i>Rhizobium</i> con dosis crecientes de HTPI	86
6.2.6. Actividad enzimática en suelo con petróleo intemperizado	88
6.2.7. Relación de variables	89
6.2.8. Índices de toxicidad en suelo con petróleo intemperizado	90
6.2.8.1. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en crecimiento de <i>Vigna unguiculata</i>	90
6.2.8.2. Índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (IRITBL)	92
6.2.8.3. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en crecimiento de <i>Vigna unguiculata</i>	93
6.2.8.4. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (ITITBL)	94
6.2.8.5. Índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS)	94
SECCIÓN VII. CONCLUSIONES	97
SECCIÓN VIII. ANEXOS	98
SECCIÓN IX. APÉNDICES	101
9.1. Efecto a los 30 días de exposición al petróleo intemperizado en plántulas de <i>Vigna unguiculata</i>	101
9.2. Efecto a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado en plantas de <i>Vigna unguiculata</i>	107
SECCIÓN X. LITERATURA CITADA	113

LISTA DE CUADROS

		Pág.
Cuadro 1.	Suelos dominantes en el estado de Tabasco.....	7
Cuadro 2.	Clasificación simplificada de microbios fijadores de N de interés agrícola y forestal.....	12
Cuadro 3.	Sistemas fijadores de N ₂ de vida libre y asociación simbiótica...	13
Cuadro 4.	Valores medios de fijación de Nitrógeno de algunas leguminosas.....	15
Cuadro 5.	Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo a la gravedad API.	23
Cuadro 6.	Clasificación de los tipos de petróleo crudo en México de acuerdo a la gravedad API.....	23
Cuadro 7.	Propiedades de los petróleos crudos producidos en México.....	24
Cuadro 8.	Características físicas y químicas de los suelos estudiados.	40
Cuadro 9.	Tratamientos con plántula y planta de <i>Vigna unguiculata</i>	44
Cuadro 10.	Valores de biomasa seca en <i>Vigna unguiculata</i> al día 30 de exposición al petróleo intemperizado.	56
Cuadro 11.	Número y viabilidad de nódulos en <i>Vigna unguiculata</i> con dosis crecientes de HTPI al día 30.....	57
Cuadro 12.	Densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado, 30 días después de la siembra de frijol pelón (<i>Vigna unguiculata</i>).	59
Cuadro 13.	Densidad del grupo de bacterias del género <i>Azospirillum</i> en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.	61
Cuadro 14.	Densidad de <i>Azotobacter</i> en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.	63
Cuadro 15.	Densidad de <i>Rhizobium</i> en nódulos con hidrocarburos del petróleo intemperizado en <i>Vigna unguiculata</i> al día 30.....	64
Cuadro 16.	Actividad enzimática de la ureasa en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.	65
Cuadro 17.	Correlación entre variables de crecimiento y actividad microbiana en <i>Vigna unguiculata</i> a los 30 días de exposición al petróleo intemperizado.....	66
Cuadro 18.	Índices relativos de impacto fitotóxico (IRIF) para el crecimiento de <i>Vigna unguiculata</i> al día 30.....	67
Cuadro 19.	Índices relativos de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en la rizosfera de suelos contaminados con petróleo intemperizado a los 30 días.....	70
Cuadro 20.	Índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS) con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 30 días.....	73
Cuadro 21.	Diámetro de tallos en <i>Vigna unguiculata</i> a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.	77

	Pág.
Cuadro 22. Biomasa seca en <i>Vigna unguiculata</i> a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.	78
Cuadro 23. Número y viabilidad de nódulos en planta de <i>Vigna unguiculata</i> con dosis crecientes de HTPI a los 120 días.	80
Cuadro 24. Densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre totales en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.	82
Cuadro 25. Densidad del grupo de bacterias del género <i>Azospirillum</i> en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 120 días.	84
Cuadro 26. Densidad microbiana de <i>Azotobacter</i> en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 120 días.	85
Cuadro 27. Densidad de <i>Rhizobium</i> en nódulos de <i>Vigna unguiculata</i> con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.	87
Cuadro 28. Actividad enzimática de la ureasa en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.	88
Cuadro 29. Correlación entre variables de crecimiento y actividad microbiana en <i>Vigna unguiculata</i> a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.	89
Cuadro 30. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) para el crecimiento de <i>Vigna unguiculata</i> a los 120 días.	91
Cuadro 31. Índices relativos de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en la rizosfera de suelos contaminados con petróleo intemperizado a los 120 días.	92
Cuadro 32. Índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS) con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.	96

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1.	Agrupación de componentes del ecosistema de acuerdo con los enfoques biótico y funcional.	5
Figura 2.	Composición del suelo y distribución de las colonias bacterianas.....	6
Figura 3.	Regiones de la rizosfera.....	9
Figura 4.	Tipos de nódulos.....	16
Figura 5.	Zonas del nódulo en leguminosas.....	17
Figura 6.	Interacción entre sustrato, comunidad microbiana y la producción extracelular de enzimas.....	18
Figura 7.	Hidrocarburos del petróleo crudo.	21
Figura 8.	Variaciones de la respuesta por desviaciones de la dosis.	30
Figura 9.	Flujograma de actividades de la investigación.	36
Figura 10.	Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el ejido José Narciso Roviroso, municipio de Huimanguillo, Tabasco y ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, municipio de Cárdenas, Tabasco.	38
Figura 11.	Ubicación de puntos de muestreo en el ejido José Narciso Roviroso, La Venta, Huimanguillo, Tabasco.	39
Figura 12.	Bioensayo de toxicidad con diferentes dosis de HTP1 en <i>Vigna unguiculata</i>	42
Figura 13.	Distribución al azar de unidades experimentales.	43
Figura 14.	Determinación de Leg-hemoglobina en nódulos de <i>Vigna unguiculata</i>	46
Figura 15.	Medición de altura de plantas.	46
Figura 16.	Procedimiento de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre en suelo y rizosfera.	47
Figura 17.	Procedimiento de aislamiento de rizobios de los nódulos de leguminosas.	48
Figura 18.	Unidades formadoras de colonias (UFC) de <i>Rhizobium</i>	49
Figura 19.	Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática ureasa.	50
Figura 20.	Dinámica de emergencia de frijol pelón (<i>Vigna unguiculata</i>) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado en mg kg ⁻¹ (n=8) al día 30.	53
Figura 21.	Altura en plántulas de <i>Vigna unguiculata</i> por dosis de hidrocarburos del petróleo intemperizado en dos tiempos (15 y 30 días).	54
Figura 22.	Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en el crecimiento de plántulas de frijol pelón (<i>Vigna unguiculata</i>).	71
Figura 23.	Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (ITITBL) en la fase de plántula (30 días).	72

	Pág.
Figura 24. Variación de la altura a través del tiempo en plantas de <i>Vigna unguiculata</i> en suelos con diferentes concentraciones de petróleo intemperizado hasta los 120 días.....	76
Figura 25. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en el crecimiento de la planta de frijol pelón (<i>Vigna unguiculata</i>) al día 120.....	93
Figura 26. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (ITITBL) en la fase de planta (120 días).	95

SECCIÓN I. INTRODUCCIÓN

En el estado de Tabasco se han reportado suelos que rebasan los límites máximos permisibles de hidrocarburos fracción ligera, mediana y pesada establecidos en la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005), que ocasionan cambios físicos, químicos y biológicos en el suelo (De la Cruz, 2010).

La porción del suelo de importancia agrícola es la zona donde se acumulan las raíces (rizosfera), es decir, los primeros 30 cm para la mayoría de los cultivos (Porta *et al.*, 1999). Atlas y Bartha (2002), mencionan que las interacciones entre las raíces y los microorganismos de la rizosfera se basan principalmente en la modificación del ambiente del suelo por procesos como captación de agua por la planta, liberación de compuestos orgánicos al suelo por las raíces, producción microbiana y captura de nutrientes minerales por parte de los microorganismos.

En la rizosfera de leguminosas se hospedan bacterias fijadoras de N atmosférico de vida libre y bacterias fijadoras de N de asociación simbiótica. En el primer tipo de bacterias (géneros *Azotobacter* y *Azospirillum*) la fijación asimbiótica de N se manifiesta en la reducción enzimática de N atmosférico (N_2) a amonio (NH_4) (Echegaray-Alemán, 1995). El segundo tipo de bacterias son de asociación simbiótica (género *Rhizobium*) los cuales tienen la característica de infectar la raíz, formando el nódulo, donde el nitrógeno atmosférico llega a éstos a través del suelo, donde es subsecuentemente reducido a amonio por la nitrogenasa de los bacteroides de *Rhizobium* (FAO, 1995).

Varios factores tienen influencia en la actividad enzimática de los suelos, los factores naturales (cambios climáticos, condiciones geográficas, profundidad, propiedades físicas, químicas y biológicas) y los factores antropogénicos (contaminación, manejo agrícola). Con el desarrollo de la civilización los factores antropogénicos han tomado el papel principal en los cambios que pueden sufrir los ecosistemas (Cerón y Melgarejo, 2005).

Los índices biológicos de toxicidad del petróleo son parámetros que permiten mostrar de manera visible el daño causado a un ser vivo. Rivera-Cruz *et al.* (2005) señalan que la falta de nodulación, la mínima diferenciación morfológica de nódulos y la necrosis severa de éstos son promovidas a concentraciones $\geq 50\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$ de hidrocarburos totales del petróleo (HTP).

La toxicidad de los hidrocarburos del petróleo sobre los organismos en el suelo se ha estudiado en zonas petroleras del mundo, en México y en el estado de Tabasco. Al respecto, estudios realizados por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004) encontraron una disminución de hasta 50% en la diversidad vegetal y la biomasa de cinco especies vegetales creciendo en concentraciones de $79\ 457\ \text{mg kg}^{-1}$ de petróleo intemperizado en el suelo. En la leguminosa zarza (*Mimosa pigra*) la altura fue menor en el petróleo intemperizado ($79\ 457\ \text{mg kg}^{-1}$) que en concentraciones con petróleo nuevo (150, 50 000, 100 000 y $150\ 000\ \text{mg kg}^{-1}$) y presentó mayor sensibilidad en el número de nódulos en las raíces.

Los procesos en suelos y rizosfera de leguminosas, así como la propia planta cultivada en suelos con hidrocarburos del petróleo, pueden proponerse como indicadores de toxicidad, por lo que en la presente investigación se busca evaluar y obtener los indicadores biológicos de toxicidad más representativos en dos estados fenológicos de la planta de frijol pelón (*Vigna unguiculata*), entre los que se encuentran: el comportamiento fisiológico de planta, nodulación, actividad enzimática de la ureasa y, bacterias fijadoras de N de vida libre y de asociación simbiótica que sobreviven en la rizosfera-suelo con hidrocarburos del petróleo.

SECCIÓN II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Definición y componentes del ecosistema

Lindeman (1942) definió al ecosistema como un sistema compuesto de procesos físico-químico-biológicos que operan como parte de una unidad espacio-temporal. El ecosistema es reconocido como una unidad fundamental de organización en el ámbito ecológico, y es una unidad estructural de la biósfera.

El concepto de ecosistema es enunciado por Odum (1972) como un sistema ecológico donde los organismos vivos y su ambiente inerte (abiótico) están inseparablemente ligados y actúan recíprocamente entre sí. Cualquier unidad que incluya la totalidad de los organismos (comunidad) de un área determinada, que actúan en reciprocidad con el medio físico de modo que una corriente de energía conduzca a una estructura trófica, una diversidad biótica y a ciclos materiales (intercambio de materiales entre las partes vivas y las inertes).

De acuerdo con Maass y Martínez-Yrizar (1990), los ecosistemas se caracterizan por:

- Ser sistemas abiertos, debido a que presentan entrada y salida de materia y energía.
- Estar formados por elementos tanto bióticos como abióticos.
- Mecanismos de retroalimentación, donde cada elemento, componente o unidad de un sistema puede existir en diferentes estados, de tal forma que el estado seleccionado se determina basándose en las interacciones con los demás elementos del sistema.
- Presentar interacciones que establecen redes tróficas (alimenticias) e informacionales.

- Estar estructurados jerárquicamente, ya que la gran diversidad de procesos ecológicos ocurren dentro de un amplio espectro de escalas de tiempo y espacio, y están asociados a diferentes niveles de organización del ecosistema.
- Cambiar en el tiempo, ya que los ecosistemas no evolucionan, pero si el medio cambia, éste lo hará también.
- Poseer propiedades emergentes, por la estabilidad funcional y estructural de los ecosistemas, pues es mayor que la de las poblaciones individuales.

Los ecosistemas son sistemas naturales que pueden estudiarse en dos enfoques operativos: biótico y funcional (Figura 1). El enfoque biótico se basa en las interacciones entre poblaciones, donde el tipo de alimentación, los depredadores, competidores y las enfermedades son condicionantes biológicos que rivalizan por las mismas condiciones.

Los productores, llamados autótrofos, son organismos vivos que fabrican su propio alimento orgánico, es decir, la vegetación con clorofila que realiza el proceso fotosintético.

Los consumidores o heterótrofos, son organismos que no pueden sintetizar otros compuestos orgánicos, por lo que se alimentan de otros seres vivos. Por último, los descomponedores son bacterias y hongos que se encargan de consumir los desechos orgánicos de productores y consumidores muertos. Su función es esencial, pues convierten la materia muerta en moléculas inorgánicas simples, el cual es absorbido otra vez por los productores, y reciclado en la producción de materia orgánica, siendo un ciclo cerrado de la materia, vinculado estrechamente con el flujo de energía (O'Neill *et al.*, 1986).

Los mismos autores mencionan que el enfoque funcional se basa en la materia y energía, como la captura de energía por medio de la fotosíntesis, la retención de

nutrientes en el suelo y las tasas de regulación por parte de los consumidores y descomponedores.

Los componentes o elementos que conforman el ecosistema son de origen biótico como abiótico. Los primeros incluyen a todos los seres vivos. Los componentes abióticos son entidades tales como el suelo, la atmósfera, la roca madre, el agua, etc. Estos pueden tener origen orgánico como el humus o la capa de hojarasca sobre la superficie del suelo, o de origen inorgánico como los minerales y arcillas que constituyen el suelo (Maass y Martínez-Yrizar, 1990).

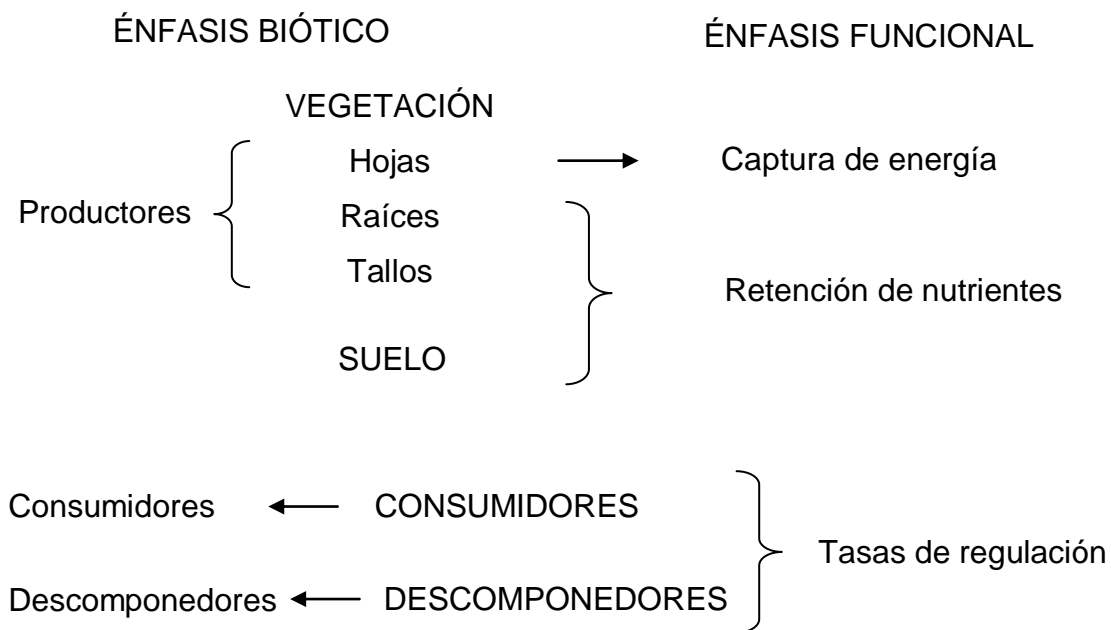


Figura 1. Agrupación de componentes del ecosistema de acuerdo con los enfoques biótico y funcional (O'Neill *et al.*, 1986).

2.1.1. El suelo: Definición y composición

El suelo es un componente abiótico del ecosistema y es definido por la Soil Survey Staff (2010), como un cuerpo natural que comprende sólidos como minerales y materia orgánica, así como líquidos y gases, los cuales ocupan un espacio y se caracterizan por horizontes o capas de la superficie terrestre de una profundidad variable y posee

características propias, según Álvarez (2006) estas se originan por adiciones, pérdidas, transferencias transformaciones de energía y materia, y que sustentan la vida vegetal.

Los fisiólogos vegetales y microbiólogos definen al suelo como aquel que sustenta la vida vegetal y de la cual las plantas obtienen soporte mecánico, los nutrientes necesarios para su desarrollo, y contiene una gran cantidad de sustancias orgánicas (Alexander, 1994). Para esta investigación se considera al suelo como un hábitat complejo donde un gran número de poblaciones microbianas interactúan con los diversos sustratos y se encuentran asociadas a la rizosfera de las plantas (Reyes *et al.*, 2006).

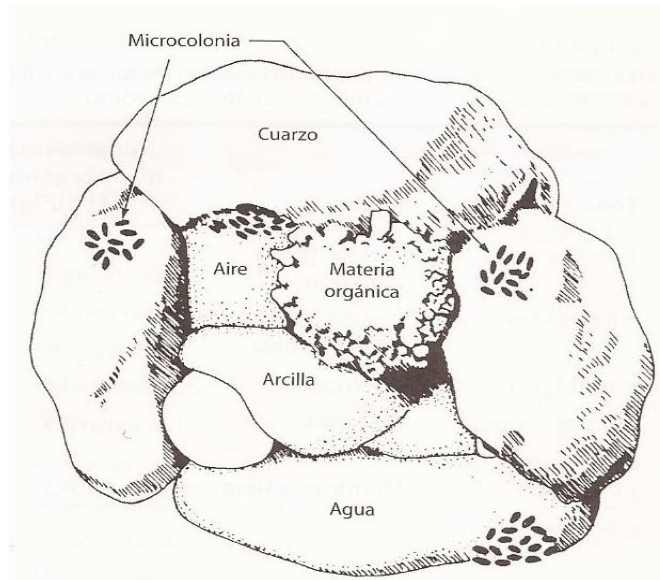


Figura 2. Composición del suelo y distribución de las colonias bacterianas.

Fuente: Atlas y Bartha, 2002.

La composición del suelo está integrada por una mezcla de materia mineral, materia orgánica, agua y aire (Ortiz-Villanueva y Ortiz-Solorio, 1990). El suelo se compone de al menos cuatro componentes (Figura 2), que son: 1) material mineral inorgánico, normalmente en torno al 40% del volumen del suelo; 2) materia orgánica el 5%; 3) aire y agua el 50% y 4) organismos vivos, tanto microorganismos como macroorganismos (Madigan *et al.*, 2009). La cantidad de éstos últimos varía en gran medida por la humedad del suelo. La mayor parte de la materia orgánica (más del 99%) está formada

por materiales que provienen de plantas y animales en descomposición, mientras que la mínima parte de la materia orgánica está representada por microorganismos (Rick, 2000).

2.1.1.1. Tipos de suelos según ecosistemas

Existen diferentes tipos de suelos determinados por el tipo de ecosistema en el que se encuentren, en el Cuadro 1 se observan los doce tipos de suelos predominantes en el estado de Tabasco, México.

Cuadro 1. Suelos dominantes en el estado de Tabasco.

Tipo de suelo	Ecosistema
Histosoles (HS)	Humedales de zonas templadas y boreales, a partir de la acumulación de vegetación hidrófila. Áreas pantanosas.
Leptosoles (LP)	Regiones cálidas; comunes en regiones montañosas.
Vertisoles (VR)	Zonas tropicales, planas y arcillosas.
Fluvisoles (FL)	Planicies aluviales, abanicos de ríos, valles y marismas costeras.
Solonchaks (SC)	Suelos inundables cercanos a la costa y presentan inundación por agua salina una buena parte del año. Vegetación halófila (principalmente mangle).
Gleysoles (GL)	Áreas deprimidas y posiciones bajas del paisaje con agua freática somera. Partes aledañas a los pantanos.
Plintosoles (PT)	Áreas llanas a suavemente inclinadas con agua freática fluctuante o agua superficial estancada (selva lluviosa y/o zona de sabana).
Arenosoles (AR)	Lomeríos de baja altitud y zona de costas (bordos de playa y dunas de arena).
Ferralsoles (FR)	Tierras llanas a onduladas de edad Pleistocena o más antigua. Trópicos húmedos.
Acrisoles (AC)	Superficies con topografía con colinas u ondulada, en regiones con clima húmedo tropical/monsónico, subtropical o templado cálido. El tipo de vegetación natural es sabana.
Luvissoles (LV)	Zona de sierra, lomeríos y llanura aluvial en regiones templadas frescas y cálidas. La vegetación original es selva.
Cambisoles (CM)	Terrenos llanos a montañosos en todos los climas cálidos; amplio rango de tipo de vegetación.

Fuente: Soil Survey Staff, 2010; IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007; Palma-López *et al.*, 2008.

2.2. La vegetación en el ecosistema: Las leguminosas

Los organismos productores en el ecosistema son diversos y para describirlos se utilizan dos elementos: el número de especies y el número de individuos que tiene cada especie (Chediack, 2009). Entre estos organismos se localizan a las leguminosas y/o Fabáceas que aparecieron en la tierra hace unos 60 millones de años y han sido la base de la alimentación humana (Lavin *et al.*, 2005).

La familia Fabaceae es de distribución cosmopolita, comprende 600 géneros, con 12 000 a 17 000 especies, divididas en tres subfamilias: Caesalpinioideae, Mimosoideae y Papilionoideae (Bosisio, 2007). De estas especies unas 200 son de consumo humano y animal (Goyoaga, 2005). Las leguminosas pueden ser de crecimiento determinado o indeterminado, donde éstas últimas requieren el uso de espalderas o tutor, los cuales tienen por objeto mantener las plantas erguidas, para facilitar la cosecha así como la aplicación de pesticidas, por lo que dicho crecimiento está en función del tiempo de permanencia en el ecosistema y madurez fisiológica (Villarreal, 1980).

La importancia de las leguminosas en el ecosistema es la mejora de la fertilidad del suelo, debido a que fijan cantidades apreciables de nitrógeno cuando presentan nódulos y cuando el follaje verde se rota en el suelo (Valdés y Medina, 2005).

2.2.1. Rizosfera

Para Pelczar *et al.* (1982), la rizosfera se considera como la región donde el suelo y las raíces hacen contacto, generalmente la población microbiana es mayor en esta zona. Según Adams *et al.* (2008), son los primeros 30 cm del suelo en donde se acumula las raíces de la mayoría de los cultivos, es ahí donde se acumula los nutrientes y humedad que le son útil a la planta.

En la rizosfera se reconocen tres áreas (Figura 3): 1) ectorrizosfera, que es la zona alrededor de las raíces; 2) rizoplano, zona de la superficie de la raíz, y 3) endorrizosfera, involucra la epidermis y las células corticales de la raíz. Una forma de medir la importancia de la rizósfera considerando la cantidad de población microbiana

que se hospeda en ella es el efecto rizósfera, el cual se obtiene de la relación rizosfera suelo a distancia (Campell y Greaves, 1990).

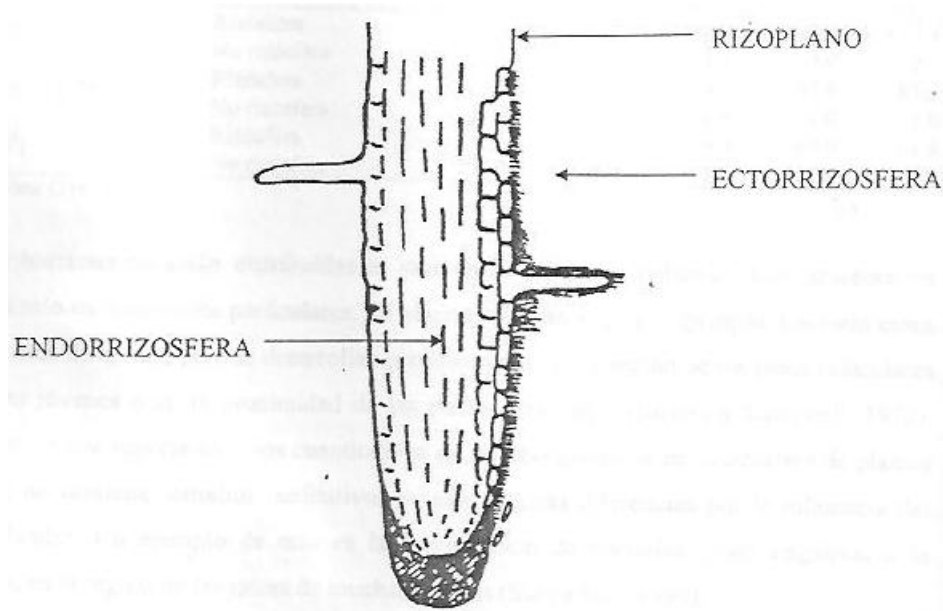


Figura 3. Regiones de la rizosfera.

Fuente: Campell y Greaves, 1990.

La rizosfera es química, física y biológicamente completa. Cerca del 20% de los asimilados fotosintéticos solubles en agua, azúcar, compuestos aminos, ácidos, ester de fosfatos de azúcar, hormonas, vitaminas, se localizan en ella. La rizosfera de muchos cultivos puede favorecer el proceso por la exudación de materiales carbonados. Estos cultivos no se desarrollan normalmente en suelos salinos, con alto nivel de sulfatos, anegados y donde la temperatura es alta y los pH neutros. El proceso es retardado por aireación o el agregado de nitratos, sales férricas o mangánicas, que permiten elevar el potencial de óxido-reducción (Frioni, 1999).

Se sabe que en la rizosfera la interacción entre las bacterias y las raíces de las plantas puede ser beneficiosa, en este caso se puede considerar la rizosfera como una zona de amortiguación microbiológica en donde la microbiota sirve de protección a la planta frente al ataque de patógenos. Se estima que los exudados rizosféricos pueden llegar a contener entre 10 y 44% del carbono asimilado y otra serie de compuestos, lo que

contribuye generalmente a un incremento de las densidades poblacionales de los microorganismos (Calvo *et al.*, 2008).

Dependiendo de la naturaleza de la planta, siempre hay diversidad en la cantidad disponible de exudados de la raíz. Las leguminosas muestran un efecto rizosfera alto cuando la población microbiana se expresa sobre la base del peso de la rizosfera del suelo, pero son en gran medida superados por gramíneas cuando el recuento de la rizosfera se expresa sobre la base de la superficie de la raíz (Lal, 1988).

2.2.1.1. Efecto de la rizosfera sobre las bacterias

El sistema radical de las plantas causa un efecto directo sobre la microbiota colindante, los microorganismos de la rizosfera ejercen una marcada influencia en el crecimiento de las plantas. En ausencia de las poblaciones microbianas rizosféricas apropiadas, el crecimiento de las plantas puede verse perjudicado (Atlas y Bartha, 2002).

El espacio rizosférico hospeda cerca de 1 600 especies de bacterias del suelo, 200 de éstas están clasificadas como patógenas y otras tienen importancia agrícola para la fertilidad del suelo, como el reciclaje de sustancias orgánicas, la fijación de nitrógeno atmosférico y la solubilización de fósforo. Las bacterias de interés agrícola normalmente se desarrollan a pH de entre 6 y 8, entre 30 y 70% de humedad (González-López, 1992).

En la rizosfera hay una mayor proporción de bacilos Gram negativos y una menor proporción de bacilos y cocos Gram positivos, así como formas pleomórficas, comparado con el suelo que carece de raíces. El microaerófilo *Azospirillum* (anteriormente *Spirillum lipoferum*) y el aerobio *Azotobacter paspali* son bacterias de vida libre en el suelo fijan nitrógeno asociadas normalmente a la rizosfera de ciertas plantas herbáceas tropicales. Estas bacterias utilizan los exudados de las raíces como fuente de energía para fijar gran cantidad de nitrógeno (Atlas y Bartha, 2002).

2.3. Procesos de fijación de Nitrógeno

En la rizosfera de las leguminosas existen varios grupos de microorganismos benéficos. Algunos de ellos constituyen interacciones simbióticas bien desarrolladas, en la cual se forman organismo particulares como los nódulos de raíz en donde sucede la fijación del N₂ atmosférico (Goyoaga, 2005; Garrido, 2007).

La actividad de fijación de N de estas plantas sigue un patrón más o menos constante, caracterizándose por una etapa inicial de fijación creciente, con nódulos aumentando en número y tamaño hasta media floración, para posteriormente iniciar una etapa donde ocurren cambios degenerativos en la población de nódulos, declinando la actividad de fijación (Goyoaga, 2005).

Los microorganismos en la asociación con la raíz fijan nitrógeno para la planta en forma simbiótica y no simbiótica o de vida libre que proporcionan al medio compuestos nitrogenados como amonio, aprovechados por los vegetales (Mantilla *et al.*, 2007).

En los Cuadros 2 y 3, se describe las bacterias más empleadas para la fijación de nitrógeno; destacan las bacterias de los géneros *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Rhizobium*, donde los primeros dos géneros tienen asociación con la raíz y se les llama bacterias fijadoras de N de vida libre y el ultimo genero denominado de asociación simbiótica, se encuentra en los nódulos radicales (Rodríguez *et al.*, 1984).

La capacidad fijadora de nitrógeno en las bacterias, radica principalmente en la presencia de una enzima (Nitrogenasa), dando como producto de la reacción bioquímica el amoniaco (NH₃), el cual queda a disposición en el ecosistema de la raíz (lugar donde ocurre habitualmente la reacción), este producto tiene una gran demanda en la formación de estructuras y moléculas esenciales, tanto para la vida de la bacteria como para la planta (González, 2003).

Cuadro 2. Clasificación simplificada de microbios fijadores de N de interés agrícola y forestal.

Forma de vida	Tipo de microbio	Género de microbio	Tipo de planta	Localización de microbio
Libre	Bacteria	Numerosos		
	Alga	Numerosas		
Asociación (rizocenosis)	Bacteria	<i>Azospirillum</i> <i>Azotobacter</i>	Gramíneas: sorgo, maíz	Zona de la raíz
	Bacteria	<i>Rhizobium*</i>	Leguminosas: lentejas, veza, garbanzo haba, guisante, alfalfa, soja, etc.	Nódulo radical
Simbiótica	Actinomiceto	<i>Frankia*</i>	Árboles y arbustos: alisio, Casuarina, etc.	Nódulo radical

*Existen rizobios de crecimiento lento y cepas de *Frankia* que fijan Nitrógeno, en un ambiente microaeróbico, *ex planta*.

Fuente: Rodríguez *et al.*, 1984.

2.3.1. Proceso de fijación no simbiótica de Nitrógeno

En el proceso de fijación no simbiótica de N son interacciones microbios-plantas-plantas y se realiza por microorganismos aeróbicos, microaerofílicos, anaeróbicos facultativos y anaeróbicos (Cuadro 3). Entre los géneros de bacterias aeróbicas sobresalen seis, en los microaerofílicos tres, cinco anaeróbicos y tres anaeróbicos facultativos. Se estima que la cantidad de nitrógeno fijado por el proceso no simbiótico fluctúa entre 22.4 y 56 kg ha⁻¹ anualmente, pero esta cantidad puede variar dependiendo las condiciones peculiares del suelo (Pelczar *et al.*, 1982).

Estas bacterias tienen importancia particular en la calidad de las plantas y la fertilidad del suelo y se les denomina promotoras del crecimiento (BPC) e inducen el crecimiento

de la planta y sus efectos son medidos a través de una variedad de mecanismos como son los exudados o excreciones de las raíces que contienen aminoácidos, azúcares, vitaminas y ácidos orgánicos juntos con la porción en descomposición del sistema radicular, sirven como fuentes de energía para la multiplicación de *Azotobacter* y *Azospirillum* (Kavimandan *et al.*, 1978).

Cuadro 3. Sistemas fijadores de N₂ de vida libre y asociación simbiótica

Géneros y grupos de vida libre			
Aerobios	Microaerófilos	Anaerobios facultativos	Anaerobios
<i>Azotobacter</i>	<i>Corynebacterium</i>	<i>Klebsiella</i>	<i>Clostridium</i>
<i>Beijerinckia</i>	<i>Azospirillum</i>	<i>Bacillus</i>	Bacterias fototróficas
<i>Azomonas</i>	Algas verde-azules	<i>Citrobacter</i>	<i>Desulfovibrio</i>
<i>Azotococcus</i>	<i>Rhizobium</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Desulfotomaculum</i>
Oxidantes de metano		<i>Enterobacter</i>	
Algas verde-azules heterocísticas			
<i>Thiobacillus</i>			

Fuente: Lal, 1988.

2.3.1.1. Bacterias del género *Azotobacter*

Beijerinck fue el primero en aislar y describir bacterias *Azotobacter* (*A. chroococum* y *A. agilis*). Las primeras especies fueron descritas como especies habitantes del suelo y más tarde como organismos nacidos del agua (Silva, 2007). La bacteria *Azotobacter* es un organismo Gram-negativo, colonias de diámetro entre 4 a 7 mm, aspectos mucilaginosas similar al de las levaduras, móvil en el suelo, aerobios estrictos, poseen la tasa respiratoria más alta, está presente generalmente en suelos con pH arriba de 7.5, pero raramente se registran en suelos con pH por debajo de 6.5 (Lal, 1988). Forma quistes que actúan como cuerpos en reposo y de manera habitual la población en el

suelo oscila entre 10^1 a 10^3 y no aporta al suelo demasiado nitrógeno fijado (Coyne, 2000).

Las células de *Azotobacter* no se encuentran usualmente en el rizoplasma, pero son abundantes en la rizosfera. La dominancia de *Azotobacter* en la rizosfera de la planta ha sido demostrada en forma consistente por varios investigadores, aunque algunas plantas como el trigo son conocidas por albergar un mayor número de clostridias de bacterias anaeróbicas en su rizosfera que *Azotobacter* (Kavimandan *et al.*, 1978).

2.3.1.2. Bacterias del género *Azospirillum* sp.

La bacteria del género *Azospirillum* es un habitante común de suelos tropicales. La aparición de la bacteria en el suelo depende del pH. Un suelo con pH entre 5.6 y 7.2 registra actividad de la nitrogenasa, pero con un pH debajo de 5.6 la actividad de la nitrogenasa no se realiza en las raíces (Silva, 2007). La nitrogenasa es la enzima responsable del proceso de fijación de nitrógeno atmosférico (Quintero, 1998).

Azospirillum representa la mejor caracterización de géneros de bacterias promotoras del crecimiento vegetal. Cuatro aspectos de la interacción *Azospirillum*-raíz son importantes: a) el hábitat natural (son bacterias colonizando la superficie de la raíz), b) la interacción con la raíz (el flagelo polar de *Azospirillum* es reconocido como una glicoproteína por la raíz, es absorbido y posteriormente se ancla), c) la fijación de nitrógeno (se encuentra inactiva en condiciones de exceso de este elemento) y d) la biosíntesis de hormonas de crecimiento vegetal (Steenhoudt y Vanderleyden, 2000).

2.3.2. Proceso de fijación simbiótica de Nitrógeno

Los nódulos son estructuras asociadas a las plantas leguminosas que se forman por la invasión de los rizobios en las raíces de las leguminosas, y el *Rhizobium* en su forma de bacterioide está involucrado en la fijación biológica de nitrógeno atmosférico de una forma combinada (amónio) que puede ser utilizado por la planta huésped (FAO, 1995). La familia *Rhizobiaceae* es conocidos en cinco géneros de diazótrofos simbióticos:

Rhizobiaceae, *Azorhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium* y *Allorhizobium* (Garrido, 2007).

La asociación de fijación de nitrógeno (diazotrofas) entre rizobio y planta leguminosa tiene una gran importancia en el ciclo global del nitrógeno y en la agricultura (Atlas y Bartha, 2002). En el Cuadro 4, se observa la cantidad de nitrógeno fijado dependiendo de la cepa o estirpe de bacteria, de la planta hospedadora, y de las condiciones ambientales.

Cuadro 4. Valores medios de fijación de Nitrógeno de algunas leguminosas.

Leguminosa	Nitrógeno fijado (Kg ha ⁻¹ año ⁻¹)
Alfalfa (<i>Medicago sativa</i>)	200-250
Altramuz (<i>Lupinus albus</i>)	150
Trébol rojo (<i>Trifolium pratense</i>)	100-150
Meliloto (<i>Melilotus officinalis</i>)	100-125
Veza (<i>Vicia sativa</i>)	100-120
Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	100
Lenteja (<i>Lens culinaris</i>)	100
Soja (<i>Glycine max</i>)	80-90
Garbanzo (<i>Cicer arietinum</i>)	60-80
Judía (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	50

Fuente: Rodríguez *et al.*, 1984.

Los rizobios son bacterias mesófilas que funcionan en regiones subárticas, templadas y tropicales. Diversos tipos de rizobios difieren notablemente en su tolerancia a elevadas temperaturas (alrededor de 40°C). La importancia del agua como un factor ambiental en la ecología de los rizobios del suelo se ha considerado sólo desde el punto de vista de la supervivencia. El rango de pH ácido afecta significativamente el crecimiento y la supervivencia de las bacterias en lugar de la simbiosis (Lal, 1988).

2.3.2.1. Estructura del nódulo y proceso de fijación de Nitrógeno

La forma de los nódulos está determinada por la planta hospedera, no por la cepa de *Rhizobium*; por lo que hay nódulos esféricos en plantas de soya y judía, elipsoides en trébol, digitados (haba, garbanzo) y los que envuelven a la raíz (altramuz), etcétera (Nadal *et al.*, 2004).

Existen dos tipos de nódulos que se encuentran en las raíces de las leguminosas herbáceas. El tipo indeterminado se caracteriza por un nódulo de meristemo persistente, mientras que el tipo de nódulo determinado carece de un meristemo (Figura 4). El término “meristemo” es reservado a un grupo de células que, por mitosis, dan lugar a derivados, algunos de los cuales se diferencian en tipos celulares específicos, mientras que otras (iniciales) permanecen como parte del meristemo. “Meristemo” por lo tanto difiere de la “región meristemática”, que se refiere a un área o zona de células que se dividen activamente por un tiempo y posteriormente se diferencian (Hirsch, 1992).

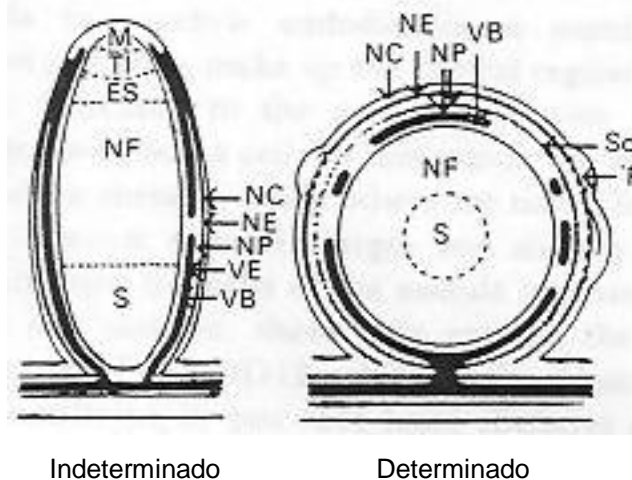


Figura 4. Tipos de nódulos.

Donde: M, meristemo; TI, zona de invasión del hilo; ES, zona simbiótica temprana; NF, zona fijadora de nitrógeno; S, zona senescente; NC, corteza del nódulo; NE, endodermis del nódulo; NP, parénquima del nódulo; VE, endodermis vascular; VB, haz vascular; Sc, esclerénquima; P, peridermis (Hirsch, 1992).

La FAO (1995) menciona que al hacer un examen microscópico se observa un hilo de infección que se ramifica entre las células corticales de la raíz, posteriormente estalla y libera bacterias en las células para formar el primordio del nódulo. Las células de la planta huésped se multiplican ocasionando también la multiplicación de los rizobios en cada una de las células hijas. Finalmente, el nódulo aparece como un órgano con cinco zonas (Figura 5).

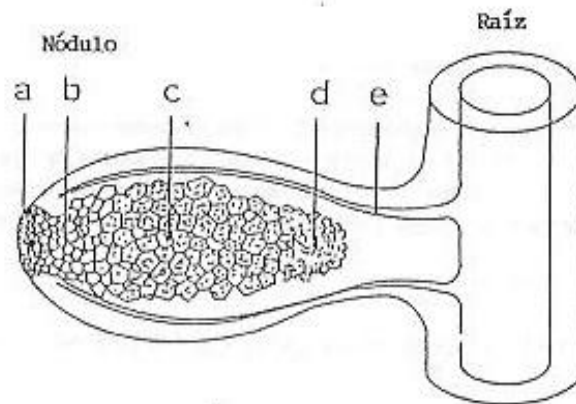


Figura 5. Zonas del nódulo en leguminosas (FAO, 1995).

- a) Un *meristemo* formado de pequeñas células no contaminadas por *Rhizobium*, que es la zona de crecimiento del nódulo.
- b) La *zona del hilo de infección*, donde las células en esta zona se multiplican activamente y están contaminadas con *Rhizobium*, pero no ocurre fijación.
- c) La *zona de fijación*, donde las células de la planta huésped están llenas con *Rhizobium* que toman una forma ensanchada o pleomórfica y son llamados *bacteroides*. En esta forma, los rizobios contienen una enzima, *nitrogenasa*, que hace posible la fijación del nitrógeno atmosférico. Esta enzima contiene *hierro* y *molibdeno*, metales necesarios para el transporte de electrones para la reducción del N_2 . Estas células se colorean de rojo por la *leghemoglobina*, un pigmento que transporta oxígeno al bacteroide.

- d) La *zona degenerativa* que se colorea de verde o marrón. Aquí las células de la planta huésped se degeneran y no ocurre fijación.
- e) El *sistema vascular*, derivado de los vasos del cilindro central, irriga el nódulo, suministrando los carbohidratos necesarios para la fijación y transportando los compuestos nitrogenados que han sido formados a las hojas.

La masa nodular, contenido de Leg-hemoglobina en nódulos, suministro de carbohidratos a la raíz, contenido de ureidos, reducción de acetileno y varias modificaciones del método Kjeldahl, son medidas indirectas que se han empleado como indicadores de la fijación de N₂ (Grageda-Cabrera *et al.*, 2003).

2.4. Actividad enzimática en el suelo

En el suelo las enzimas están asociadas a la fuente de carbono y a los microorganismos, según Sinsabaugh *et al.* (2002), explican que el proceso de descomposición es sucesivo, lo realizan las comunidades microbianas que seleccionan al sustrato y producen enzimas extracelulares que lo degradan y lo modifican (Figura 6).

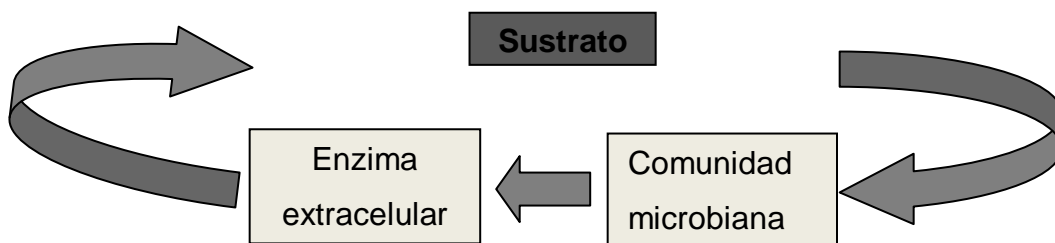


Figura 6. Interacción entre sustrato, comunidad microbiana y la producción extracelular de enzimas (Sinsabaugh *et al.*, 2002).

La eficiencia con la cual una enzima actúa sobre su sustrato es afectada por factores como: contacto entre la enzima y el sustrato, concentración de la enzima y el sustrato, temperatura, pH, presencia de coenzimas o de activadores e inhibidores (Quintero *et al.*, 2003).

La medición de la actividad de una determinada enzima es, en general, una mezcla de actividades que pertenecen a dos o más categorías. Las enzimas pueden, por supuesto, pertenecer a más de una categoría y cambian de una clase a otra con el tiempo (Quintero *et al.*, 2003). Dentro de estas según Burns (1986), se distinguen cinco categorías:

- Enzimas asociadas con células metabólicamente activadas, principalmente hidrolasas. Si el componente relevante de la población microbiana es identificado, debería haber buena correlación entre la actividad y el número de microorganismos.
- Enzimas asociadas con células viables pero no proliferantes, como células vegetativas en reposo: endosporas bacterianas, esporas fúngicas, quistes de protozoarios e incluso semillas de plantas.
- Enzimas asociadas, al menos brevemente, con sustratos en complejos enzima-sustrato.
- Enzimas unidas a células muertas, a células en reposo o que se han difundido fuera de las células muertas o que se han lisado. Varias de estas enzimas pueden haber tenido una localización funcional original en la célula, sin embargo, pueden estar activas por un corto tiempo cuando son liberadas a la fase acuosa del suelo.
- Enzimas están en forma temporal inmovilizadas o permanente sobre las superficies reactivas de los coloides húmicos de las vermicompostas y compostas.

2.4.1. Actividad ureasa del suelo

La enzima ureasa pertenece a la categoría uno, debido a que cataliza la hidrólisis de la urea a amonio y dióxido de carbono. La enzima se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, en microorganismos, células animales y vegetales Burns (1986).

La ureasa es una proteína hexamérica que contiene dos iones de Ni (II) por subunidad. El mecanismo de reacción propuesto para la hidrólisis de urea es aquel en que un ion Ni^{2+} polariza el grupo carbonilo de la urea para facilitar el ataque nucleófilo por un anión OH^- que es activado por el segundo Ni^{2+} (Andrews *et al.*, 1984).

La actividad enzimática del suelo es debida a enzimas que pueden tener diferente localización en el suelo. Puede estar asociada a células proliferantes y no proliferantes, pero también con células muertas o desechos de células, o estar inmovilizadas en arcillas y coloides húmicos (Burns, 1982). La enzima ureasa se encuentra predominantemente en microunidades estructurales con un diámetro menor a 50 μm (Pérez-Mateos y González-Carcedo, 1988).

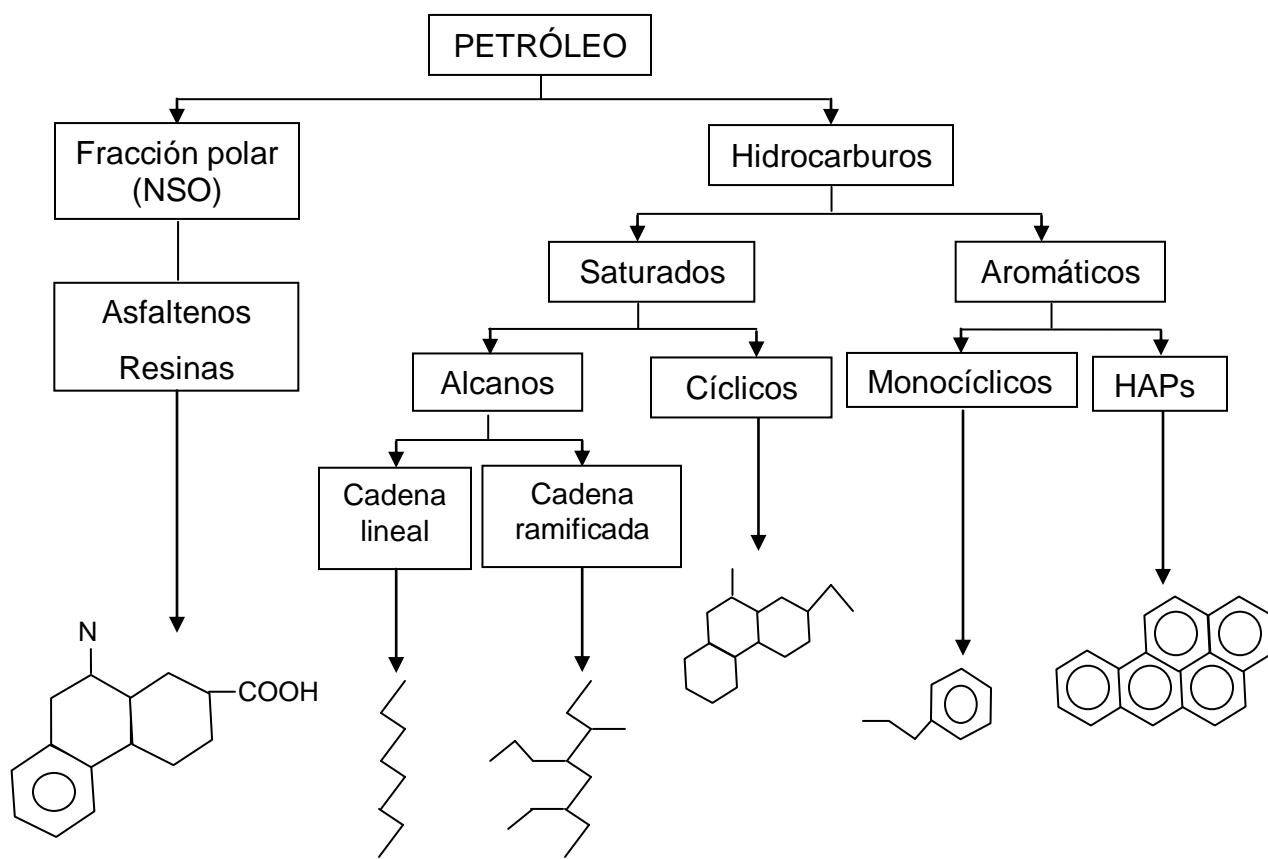
La actividad de la ureasa es una de las más estudiadas junto con otro grupo de hidrolasas porque son enzimas básicas en estudios de calidad, fertilidad y en la evolución del impacto de contaminantes en el suelo. El interés de esta actividad se debe a su relación en el ciclo del N y por el uso de urea como fertilizante en la agricultura (Sastré y Lobo, 2003).

2.5. Definición y características del petróleo crudo

El petróleo es el resultado de la degradación anaeróbica de materia orgánica, durante largos períodos de tiempo y bajo condiciones de alta temperatura y presión, que la convierte en gas natural, crudo y derivados del petróleo (Vargas *et al.*, 2004).

Marroquín (2007) define al petróleo crudo como una mezcla compleja de muchos hidrocarburos que está constituido principalmente de carbón (76-87%) e hidrógeno (13-24%). Asume los tres estados físicos de la materia: sólido, líquido y gaseoso, según su composición, temperatura y presión a la que se encuentre. Los constituyentes del petróleo se agrupan en cuatro grupos orgánicos (Figura 7): saturados, aromáticos, resinas y asfaltenos (Delgado, 2006).

Hidrocarburos saturados (C_nH_{2n+2}): Estos hidrocarburos son alcanos lineales y ramificados (parafinas) y cicloalcanos (naftenos). Los primeros cuatro n-alcenos son gases (metano, etano, propano y butano), los trece siguientes (C_5-C_{17}) son líquidos, y todos aquellos con 18 o más átomos de carbono en su molécula son sólidos. Son solubles en disolventes no polares como benceno, éter y cloroformo; insolubles en agua y otros disolventes con alta polaridad y también actúan como disolventes de compuestos de baja polaridad (Botello, 1996).



Fracción polar NSO: Nitrógeno (N), Azufre (S) y Oxígeno (O)

HAPs: Hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Figura 7. Hidrocarburos del petróleo crudo (Huesemann, 1994).

Hidrocarburos aromáticos (C_nH_{2n-6}): Los hidrocarburos aromáticos son compuestos cíclicos mono, di y polinucleararomáticos, basados en anillos bencénicos fusionados en arreglos lineales, angulares o agrupados. Algunos hidrógenos pueden reemplazarse por grupos alquilo, tienen al menos seis átomos de hidrógeno por anillo. Todos los

hidrocarburos aromáticos son líquidos o sólidos a temperatura ambiente y sus puntos de ebullición están cercanos a los de cicloalcanos correspondientes. Son poco polares o no polares (Leahy y Colwell, 1990).

Resinas: Agregados con una gran cantidad de estructuras policíclicas de alto peso molecular, tales como piridinas, quinolinas, carbazoles, tiofenos, sulfóxidos y aminas (Leahy y Colwell, 1990). Las resinas son sustancias semilíquidas (algunas veces casi sólidas) café oscuro a negro, tienen una gravedad específica alrededor de 1.0 y peso molecular de 500 a 2000 (Marroquín, 2007).

Asfaltenos: Moléculas complejas de alto peso molecular y con altos niveles de aromáticos polinucleares que se encuentran en los crudos pesados y residuos. El nitrógeno, el oxígeno y también el azufre se encuentran en el asfalteno, los metales también pueden encontrarse dentro de estos compuestos en forma de porfirinas. La concentración de asfaltenos se incrementa a medida que el petróleo crudo es más pesado (Marroquín, 2007), se incrementa también la aromaticidad y el número de heteroátomos. La estructura de los asfaltenos consiste en un núcleo aromático condensado con cadenas alquílicas laterales y heteroátomos incorporados en muchas de las estructuras cíclicas; el sistema aromático condensado puede tener desde 4 hasta 20 anillos bencénicos (Delgado, 2006).

Los diferentes tipos de heteroátomos presentes en los asfaltenos están organizados en grupos funcionales como: carboxilo, cetonas, aldehídos, benzotiofenos, dibenzotiofenos, naftenobenzotiofenos, sulfuros alquílicos, sulfuros alquil-arílicos y sulfuros arílicos (Delgado, 2006).

2.5.1. Tipos de petróleo crudo

Los diferentes tipos de petróleo crudo se clasifican dependiendo sus propiedades físicas y químicas, sin embargo, para clasificar un petróleo crudo, se expresa en una escala normalizada por el Instituto Americano del Petróleo (American Petroleum Institute, API), denominado como gravedad API (Marroquín, 2007). En base a la

gravedad API, el petróleo crudo se clasifica en: extrapesado, pesado, mediano, ligero y extraligero (Cuadro 5). Mientras menor sea la gravedad API el crudo es más pesado. Los crudos pesados son de color oscuro a negro y se definen como los crudos con gravedad API < 22.

México es reconocido a nivel mundial como productor de petróleo crudo, y se clasifica de acuerdo con la gravedad API (American Petroleum Institute) (Cuadro 6). Las propiedades físicas y químicas se cuantifican de acuerdo con el tipo de petróleo crudo (Cuadro 7), que en base a la cantidad de contaminantes se ordenan de esta forma: Olmeca < Istmo < Maya < 12° API (Marroquín, 2007).

Cuadro 5. Clasificación de los tipos de petróleo crudo de acuerdo a la gravedad API.

Petróleo crudo	Densidad (g/mL)	Gravedad API
Extrapesado	≥ 1.0	≤ 10.0
Pesado	0.92 – 1.01	10.1 – 22.3
Mediano	0.87 – 0.91	22.4 – 24.1
Ligero	0.83 – 0.86	24.2 – 29.0
Extraligero	≤ 0.83	≥ 29.0

Fuente: Marroquín, 2007.

Cuadro 6. Clasificación de los tipos de petróleo crudo en México de acuerdo a la gravedad API.

Clasificación	Petróleo crudo	Gravedad API
Pesado	Maya	22
Ligero	Istmo	33
Extraligero	Olmeca	39

Fuente: Marroquín, 2007.

2.5.2. Tipos de petróleo según su permanencia en el ambiente

2.5.2.1. Petróleo fresco

El petróleo fresco es aquel extraído recientemente del yacimiento subterráneo, contiene un 100% de las diferentes fracciones de los hidrocarburos del petróleo. La extracción se realiza a través de ductos, se transporta en oleoductos a las baterías de separación, después se deposita en tanques de almacenamiento en las refinerías donde se fracciona en diferentes subproductos (Morales, 2007). Agnello (2000), menciona que los hidrocarburos presentes en el petróleo crudo recién extraído del pozo de petróleo contienen cuatro fracciones de hidrocarburos: saturados, aromáticos, nafténicos y parafínicos.

Cuadro 7. Propiedades de los petróleos crudos producidos en México.

Propiedades	Petróleo crudo			
	Olmecca	Istmo	Maya	12° API
Peso específico 20/4 °C	0.8286	0.8560	0.9212	0.9815
Gravedad API	38.6	33.4	21.6	12.23
Azufre total, % peso	1.20	1.68	3.60	5.01
Nitrógeno total, ppm	780	1461	3400	4895
Viscosidad cinemática a 21.1 °C, cSt	6.0	12.93	285	20751 (25 °C)
Cenizas, % peso	0.017	0.024	0.051	0.09
Contenido de sal, lb/1000 bbl	5.6	48	15	9.25
Temperatura de escurrimiento, °C	< -42	-33	-21	+9
Carbón ramsbottom, % peso	2.45	4.23	11.68	15.6
Metales Ni/V, ppm	1.5/8	20/63	50/290	88.4/412
Contenido de asfaltenos, % peso	1.31	3.06	11.32	21.21
Rendimiento a 538 °C, % vol.	89.10	82.50	62.50	52.0

API: American Petroleum Institute. Marroquín, 2007.

2.5.2.2. Petr6leo intemperizado

Al conjunto de cambios f6sicos y qu6micos que sufre el petr6leo cuando es derramado o introducido al ambiente se le denomina intemperismo. Estos cambios son originados por la acci3n conjunta de factores f6sicos, qu6micos y biol3gicos (temperatura, luz, viento, corrientes, mareas, acci3n biol3gica, difusi3n, diluci3n, foto-oxidaci3n, evaporaci3n, emulsificaci3n y sedimentaci3n) (Botello, 1996).

Velasco (2004) menciona que en los suelos contaminados por largos per6odos (suelos intemperizados), los contaminantes llegan a ser inaccesibles (no disponibles) para los microorganismos que se desarrollan entre los contaminantes y la materia org6nica del suelo. Por su parte, Adams *et al.* (2008), indican que el suelo presenta hidrocarburos residuales meteorizados o intemperizados, que son aquellos expuestos a la intemperie por un largo per6odo. El t6rmino "meteorizaci3n" comprende, de forma gen6rica, procesos como la volatilizaci3n, la disoluci3n y la biodegradaci3n (O'Reilly y Thorsen, 2010).

Botello (1996), menciona que sin provenir de derrames recientes, la mayor6a de las muestras ambientales contienen hidrocarburos del petr6leo intemperizado, los cuales presentan caracter6sticas 6nicas para su interpretaci3n, entre las que se resumen:

- a) La proporci3n de alcanos normales/isoprenoides que en los petr6leos crudos es mayor a 1, decrece con la biodegradaci3n y el valor es igual a 1 o cercano a la unidad, por lo tanto, el pristano, fitano y farnesano se presentan como los hidrocarburos saturados dominantes en los petr6leos intemperizados.
- b) Los fenantrenos y dibenzotiofenos sustituidos (alquilados) se presentan como los compuestos arom6ticos m6s caracter6sticos del petr6leo intemperizado.
- c) La cantidad de componentes polares (N, S, O) se incrementa con la degradaci3n en el petr6leo intemperizado, debido a reacciones de oxidaci3n.

2.6. La contaminación del suelo por hidrocarburos del petróleo

Las operaciones petroleras como la prospección sísmica, perforación, extracción y construcción de oleoductos impactan al suelo y la biodiversidad, debido a que el principal riesgo ocasionado son los derrames y el alto grado de toxicidad (Bravo, 2007).

El petróleo le causa al suelo daños físicos, químicos y biológicos. Estos daños son irremediables, pues los procesos de descontaminación no alcanzan a cubrir todas las áreas afectadas y se realizan mucho tiempo después de que el crudo ha penetrado el suelo (Vargas *et al.*, 2004).

2.6.1. Efecto en propiedades físicas

Según SEMARNAP (1996), las propiedades físicas del suelo más afectadas por derrames de hidrocarburos son: la estructura del suelo debido a la ruptura de los agregados, aumento de la retención del agua en la capa superficial y del potencial hídrico.

Martínez y López (2001), mencionan que un factor determinante en los posibles efectos por hidrocarburos, es la textura del suelo, por la presencia proporcional de partículas de arenas, limos o arcillas, así como la densidad real y la porosidad. También hay efectos en la densidad aparente, proporción del tamaño de partícula, consistencia y color del suelo. Estos efectos son ocasionados por la propiedad aceitosa del petróleo, el cual aglutina las partículas del suelo generando estructuras más gruesas, cubriendo la superficie de las partículas y del espacio poroso, disminuyendo la aireación del suelo y el color de la matriz del suelo se hace más oscuro (Li *et al.*, 1997).

En el estudio realizado por Martínez y López (2001) en la textura del suelo, los valores de la arena tienden a aumentar y de la arcilla a disminuir en presencia de diesel y combustóleo, mientras que los limos permanecen sin variación importante. Para la materia orgánica se presentaron variaciones importantes, ya que aumenta de manera proporcional a la concentración de hidrocarburos, gasolina y combustóleo. El diesel es

el hidrocarburo que causa un mayor aumento en concentraciones de 30 000 mg kg⁻¹, obteniendo incrementos de hasta 347%, comparado con suelo sin hidrocarburos.

2.6.2. Efecto en propiedades químicas

Las propiedades químicas del suelo que se afectan con la presencia de petróleo en el suelo producto de los derrames son: a) Aumento de carbono orgánico, ya que el 75% del carbono del petróleo crudo es oxidable, b) Disminución del pH, debido a la acumulación del carbono orgánico y generación de ácidos orgánicos, c) Aumento del manganeso y hierro intercambiable, d) Aumento del fósforo disponible (Ortínez *et al.*, 2003).

Según Ellis y Adams (1960), reportan que suelos contaminados con petróleo crudo mostraron incrementos en materia orgánica, carbono total y nitrógeno comparado con suelos normales. La capacidad de intercambio catiónico muestra tendencias irregulares en presencia de diferentes concentraciones de petróleo crudo de acuerdo con estudios realizados por Martínez y López (2001).

2.6.3. Efecto en planta

Zavala (2004) menciona que los hidrocarburos pueden afectar adversamente las plantas, dependiendo del tipo y concentración de petróleo, de la especie de planta y de las propiedades del suelo. La contaminación con hidrocarburos del petróleo fresco e intemperizado puede inhibir la germinación, inducir un inadecuado desarrollo y comportamiento radicular, provocando achaparramiento, clorosis, amorfismo en las hojas, etcétera (Méndez-Natera *et al.*, 2004).

Anderson *et al.* (1993), indican que las plantas que crecen en suelos contaminados por hidrocarburos pueden presentar síntomas similares al efecto de la sequía, ya que alrededor de la raíz se forma una película grasosa que impide la entrada de agua; este efecto no sucede en todas las especies vegetales, siendo las gramíneas las que se adaptan mejor a las condiciones mencionadas. Lindau y Delaune (2000) concluyeron

que los hidrocarburos del petróleo incrementaron la biomasa y densidad de tallos de *Spartina lancifolia*, con respecto a sitios control.

Estudios realizados por Rivera-Cruz *et al.* (2005) demostraron que la altura de la planta fue severamente afectada por las tres concentraciones más altas de los petróleos intemperizado (79 457 mg kg⁻¹ HTP) y nuevo (100 000 y 150 000 mg kg⁻¹ de HTP), donde la mayor reducción en la altura se presentó en las leguminosas dormilona (*Mimosa* sp.) y zarza (*Mimosa pigra*), las cuales no lograron sobrevivir al efecto de la concentración más alta de petróleo (150 000 mg kg⁻¹ HTP) a los 150 días de exposición. En cuanto a la producción de biomasa seca total, las especies más tolerantes fueron las leguminosas guaje (*Leucaena* sp.) y zarza (*Mimosa pigra*) donde la concentración de 50 000 mg kg⁻¹ HTP redujo la biomasa total solo 31 y 25%, respectivamente. Por otro lado, pruebas de ecotoxicidad demostraron que altos contenidos de HTP (>20 000 mg kg⁻¹) no afectan la germinación de semillas maíz (Li *et al.*, 1997).

2.6.4. Efecto en microflora del suelo

La actividad microbiana es regulada por las características físicas y químicas del suelo, por la composición de los materiales orgánicos y por la naturaleza de la comunidad microbiana. Estos factores varían con los cambios en el uso de la tierra, con la fertilidad del suelo y con la contaminación por hidrocarburos del petróleo (Alexander, 1994).

Las concentraciones tóxicas del petróleo fresco e intemperizado en el suelo inducen cambios en las poblaciones de microorganismo. Los suelos que recientemente reciben petróleo fresco disminuyen las poblaciones de bacterias y hongos que son importantes en los ciclos biogeoquímicos del ecosistema, afectando la productividad del mismo (Rhodes y Hendricks, 1990).

Los microorganismos aislados en suelos poseen actividades de peroxidasas y oxigenasas, que permiten la oxidación de algunas fracciones del petróleo (Rich *et al.*, 2000). Esta oxidación cambia las propiedades de los compuestos haciéndolos

susceptibles a ataques secundarios y facilitando su conversión a bióxido de carbono y agua (Benavides *et al.*, 2006).

Vargas *et al.* (2004), mencionan que los suelos contaminados contienen gran cantidad de microorganismos que pueden incluir un número de bacterias y hongos capaces de utilizar hidrocarburos. Por su parte, Pérez *et al.* (2008), indican que no existe consenso sobre el grado de afectación de los microorganismos ante la presencia de hidrocarburos en el suelo, por lo que recomiendan realizar estudios específicos para cada tipo de suelo, contaminante, concentración, etc., y así entender el comportamiento microbiano.

Para Contreras (2005), las comunidades microbianas presentes en suelos contaminados tienden a estar dominadas por aquellas bacterias que pueden sobrevivir a la toxicidad presente en el ambiente siendo capaces de utilizar al contaminante para crecer; en este sentido el contaminante desbalancea, más que provocar toxicidad en las comunidades ecológicas del suelo.

2.7. Teoría de la toxicidad

Las sustancias químicas puede ser tóxicas y peligrosas para la salud y el ecosistema si alcanza una concentración determinada y la exposición se prolonga el tiempo suficiente para ejercer sus efectos, esto es relación dosis-tiempo-respuestas (Ortiz, 2001). A su vez, la relación entre la concentración de un contaminante y el porcentaje de respuesta de un grupo de organismos que ha sido expuesto se conoce como dosis-respuesta y corresponde a un modelo sigmoideo (Figura 8) (Villamar y Tapia, 2003).

Es importante destacar que las sustancias pueden ser tóxicas y peligrosas, pero estas no son intercambiables. Las sustancias peligrosas pueden tener propiedades intrínsecas y extrínsecas. Por ejemplo las propiedades extrínsecas de explosividad, inflamabilidad y reactividad no están referidas a la toxicidad química. Por lo tanto la toxicidad denota la capacidad de una sustancia para producir alguna alteración o daño,

mientras que peligroso, alude a la probabilidad de que el daño resulte por el uso o contacto con la sustancia (Espíndola y Fernández, 1994).

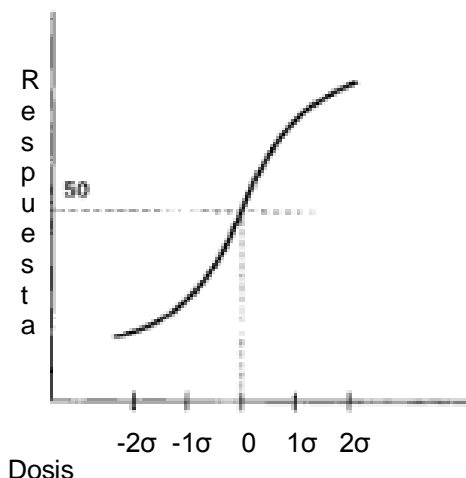


Figura 8. Variaciones de la respuesta por desviaciones de la dosis.

Fuente: Repetto, 1997.

Según Montoya (2010), la toxicidad de una sustancia se puede medir de la siguiente manera:

Dosis letal mínima (DL_{min}): cantidad mínima de una sustancia que mata a una población bajo un conjunto de condiciones definidas (Repetto, 1997).

Dosis letal media (DL_{50}): dosis calculada estadísticamente, de un agente químico o físico, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo condiciones definidas (Repetto, 1997). Cantidad mínima de una sustancia, capaz de matar a la mitad de una población. Es el método que más se emplea en estudios de toxicidad aguda y algunos de toxicidad subaguda y crónica (Montoya, 2010).

Las exposiciones a concentraciones que producen la muerte en 96 horas o menos se les denomina exposiciones agudas, mientras que las exposiciones de mayor duración a concentraciones subletales se les denomina exposiciones crónicas. La duración de estas exposiciones crónicas experimentales puede ser por un período del desarrollo,

pueden ser permanentes o extenderse por períodos de más de una generación (Peña *et al.*, 2001), teniendo efectos irreversibles a largo plazo por absorción de pequeñas dosis acumulativas (Porta *et al.*, 2003).

La toxicidad se evalúa mediante bioensayos que consisten en exponer organismos vivos (algas, bacterias, vegetales y fauna en general) a sustancias tóxicas a diferentes concentraciones y registrar los efectos sobre los mismos (Fernández *et al.*, 2006).

2.7.1. La toxicidad del petróleo

El petróleo crudo, como se indicó anteriormente, es una mezcla compleja de hidrocarburos, con algunos derivados del azufre, compuestos nitrogenados y metales como fierro, níquel, cromo, vanadio y cobalto, aunque en menor proporción. El grupo de los hidrocarburos alifáticos como aromáticos, es muy variable pero, en general, aquellos de menor peso molecular son más tóxicos y cancerígenos para los organismos vivos (Schwarzenbach y Westall, 1981). Los hidrocarburos de la fracción ligera, generalmente entre 5 y 10 carbonos, son muy tóxicos pero muy volátiles y no perduran en un ambiente tropical (Adams *et al.*, 2008).

En el suelo, los hidrocarburos del petróleo son adheridos a las partículas minerales y orgánicas e impiden el intercambio gaseoso con la atmósfera, iniciando una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración que, dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad, textura del suelo y cantidad vertida, puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad (Benavides *et al.*, 2006).

El suelo orgánico posee mayor capacidad de retención de los hidrocarburos, debido a la capacidad de adhesión y sorción de la materia orgánica (Schwarzenbach y Westall, 1981). Cuando predomina clase textural finas el petróleo forma una estructura gruesa en el exterior alrededor del conglomerado haciéndola impermeable (Li *et al.*, 1997).

2.7.2. Leguminosas como indicadoras de toxicidad

El grupo de plantas de las leguminosas se han utilizado en pruebas de toxicidad de los hidrocarburos del petróleo crudo fresco e intemperizado. Las especies que comúnmente se han utilizados son; *Pisum sativum*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Medicago sativa*, *Mimosa pigra*, *Mimosa sp* y *Crotalaria incana* (Liste y Alexander, 2000; Hernández, 2002; White *et al.*, 2003; Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004; Rivera-Cruz *et al.*, 2005; Vázquez, 2006).

Los resultados obtenidos por diferentes investigadores en pruebas de toxicidad del petróleo con leguminosas, indican alteración en diferentes parámetros fisiológicos de la planta y de la interacción de microorganismos de vida libre y de asociación simbiótica. Entre éstos se mencionan la disminución de la biomasa total y nodulación en la leguminosa zarza (*Mimosa pigra*), la cual es la especie más sensible a la presencia de petróleo intemperizado en suelo, de acuerdo a estudios realizados por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004).

Rivera-Cruz *et al.* (2005) reportaron que en concentraciones de 50 000 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo (HTP), la leguminosa chipilín silvestre (*Crotalaria sp.*) no formó nódulos, en cambio, el guaje (*Leucaena sp.*) fue la especie más tolerante a la exposición del petróleo, ya que formó nódulos en concentraciones altas de petróleo nuevo (100 000 mg kg⁻¹ HTP) e intemperizado (79 457mg kg⁻¹ HTP).

Los indicadores más sensibles para medir el impacto toxicológico del petróleo en el suelo son el número de nódulos, los cuales se localizan en el sistema radical dependiendo de la especie hospedante y de las condiciones ambientales (CIAT, 1988).

2.8. Discusión general de la revisión de literatura

Con base en la revisión de literatura, se demuestra el valor que representa el crecimiento y desarrollo de las leguminosas, sus interacciones simbióticas (*Rhizobium*) y no simbióticas con bacterias fijadoras de N en la rizósfera (*Azotobacter* y *Azospirillum*), la actividad enzimática de la ureasa del suelo predominantemente en

microagregados estructurales para estudiar la calidad, la fertilidad, la evaluación del impacto del contaminantes en el suelo y planta en el ecosistema.

El impacto de los contaminantes como es el caso de los hidrocarburos derivados del petróleo crudo intemperizado puede evaluarse a través de la respuesta de organismos vivos y sus interacciones con otros organismos.

El petróleo intemperizado está integrado por asfaltenos, resinas e hidrocarburos del grupo de los fenantrenos y dibenzotiofenos sustituidos (alquilados), es un factor antropogénico presente en el suelo de los ecosistemas con uso ganadero y con influencia petrolera en el trópico húmedo su presencia puede inducir hormesis y/o la muerte de los organismos vivos.

El nivel de toxicidad potencial de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado sobre los organismos vivos de los ecosistemas del trópico y sobre todo en el desarrollo temprano del crecimiento de leguminosas e interacciones con bacterias del grupo fijador de N de vida libre y de asociación simbiótica, así como la actividad enzimática de la ureasa en el suelo han sido poco estudiados y validados como indicadores de toxicidad de la calidad de estos suelos.

El obtener indicadores de toxicidad biológicos de los ecosistemas del trópico húmedo, permite indicar el desequilibrio potencial e inducir estrategias para que en el proceso de recuperación de estos ambientes se consideren parámetros de calidad biológicas.

No existen indicadores biológicos de toxicidad de petróleo intemperizado en México no existen, el generarlos usando leguminosas y sus interacciones con bacterias de vida simbiótica y no simbiótica, es de gran importancia para la normatividad ambiental mexicana.

SECCIÓN III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado al final de dos estados del crecimiento vegetal, en la densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre, de asociación simbiótica y la actividad enzimática de la ureasa en suelo-rizosfera de la planta de frijol pelón (*Vigna unguiculata*), para obtener indicadores biológicos de toxicidad del petróleo intemperizado.

3.1.1. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) en el crecimiento vegetativo de dos etapas fenológicas del frijol pelón *Vigna unguiculata* y obtener los índices del impacto fitotóxico (IIF).
2. Obtener el efecto de los HTPI en la densidad de bacterias de vida libre de rizosfera-suelo al final de cada etapa fenológica y obtener los índices de impacto toxico de bacterias de vida libre (ITITBL).
3. Medir el efecto de los HTPI en la densidad de bacterias de asociación simbiótica en nódulos al final de cada una de las dos etapas vegetativas y obtener los índices de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS).
4. Cuantificar los efectos de los HTPI en la actividad enzimática de la ureasa en suelo a los días 30 y 120 del crecimiento vegetativo de *Vigna unguiculata* y obtener en cada tiempo los índices de impacto tóxico en suelo (IITS).

SECCIÓN IV. HIPÓTESIS

4.1. Hipótesis general

El comportamiento fisiológico del frijol pelón, la densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre y de asociación simbiótica en suelo-rizosfera de *Vigna unguiculata*, así como la actividad enzimática de la ureasa en suelo al final de cada una de las dos fases fenológicas, se relacionan con los contenidos de hidrocarburos totales del petróleo intemperizado y son indicadores de la toxicidad.

4.1.1. Hipótesis específicas

1. Conforme los HTPI en el suelo aumentan inhibe el crecimiento y la formación de nódulos de manera diferencial según el estado vegetativo de la planta de frijol pelón e inducen índices de impacto fitotóxico superiores a cero.
2. Las densidades de bacterias fijadoras de N de vida libre, el grupo *Azotobacter* y *Azospirillum* en la rizosfera y suelo son afectadas de manera negativa al aumentar los contenidos de HTPI e inducen índices de impacto toxico de bacterias de vida libre (ITITBL) superiores a cero, afectando la variable.
3. La densidad de *Rhizobium* en las raíces de la planta de frijol pelón por estado vegetativo, es afectada de manera negativa al aumentar los contenidos de HTPI en suelo y permiten obtener índices de impacto toxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS).
4. La actividad enzimática de la ureasa en suelo a los días 30 y 120 del crecimiento vegetativo de *Vigna unguiculata* es afectada por las diferentes dosis de HTPI presente en el suelo, permite un proponer indicadores del impacto de toxicidad en suelo (IITS).

SECCIÓN V. MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo de investigación se realizó en el invernadero, así como en el Laboratorio de Microbiología Ambiental y Aplicada del Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. El estudio se llevó a cabo en tres etapas sucesivas (Figura 9). Se utilizó la especie leguminosa [*Vigna unguiculata* (L.) Walp], evaluada en dos estados fenológicos (plántula y planta).

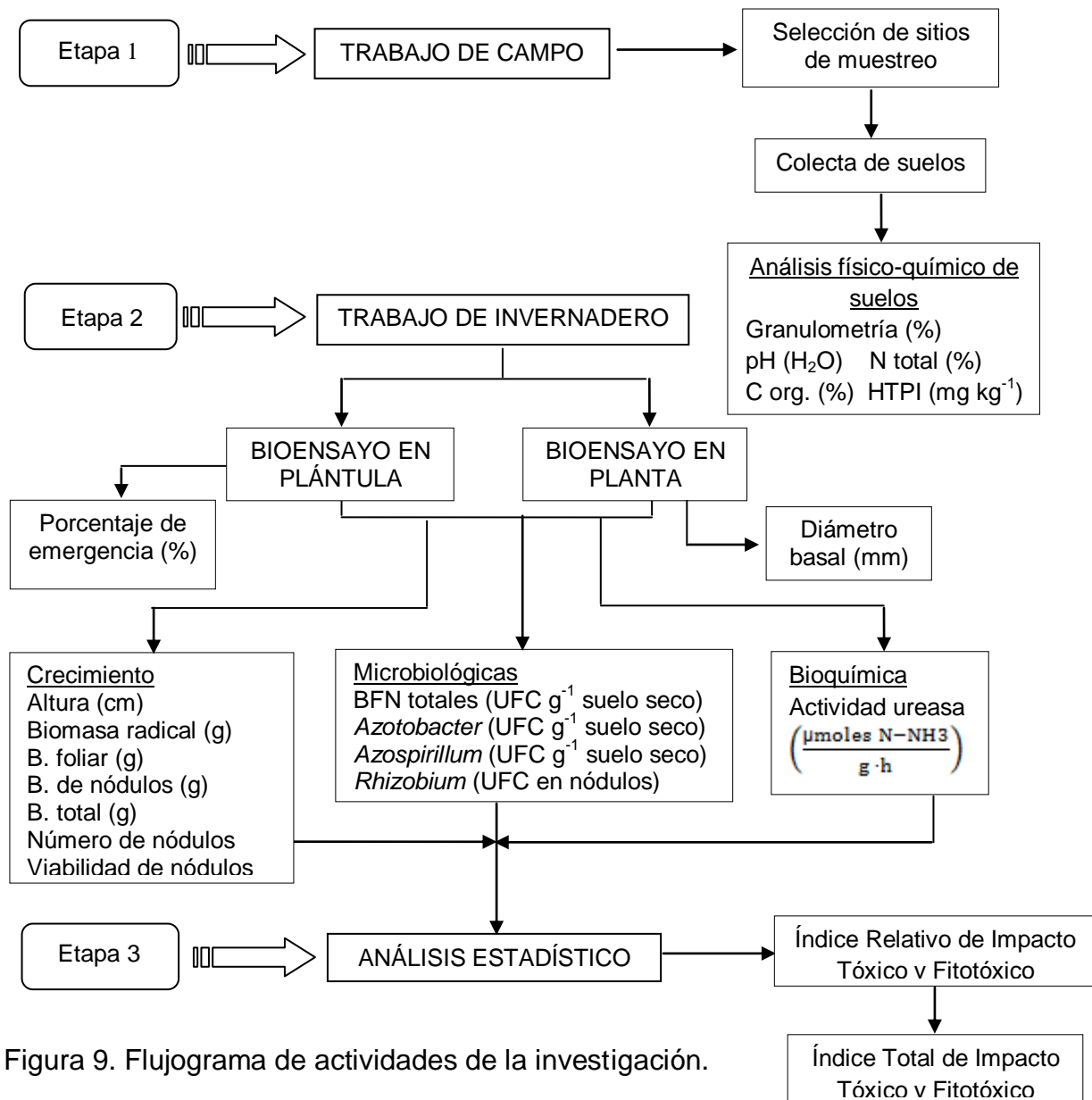


Figura 9. Flujograma de actividades de la investigación.

5.1. Etapa 1. Trabajo de campo

5.1.1. Colecta y ubicación geográfica de los suelos

En esta investigación se utilizaron suelos clasificados como Gleysoles de dos sitios del estado de Tabasco, México. Sitio 1, con suelo que contiene diferentes contenidos de hidrocarburos del petróleo intemperizado ubicado a 2 Km al sureste del Complejo Procesador de Gas la Venta, en el ejido José Narciso Rovirosa, municipio de Huimanguillo (Figura 10), con coordenadas geográficas Latitud Norte 18° 04' 54" y Longitud Oeste 94° 02' 31", a una altitud de 20 msnm (Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía, 2004), ubicado en un área aledaña a la ex-batería "La Venta Sureste". En este sitio, con una superficie de 44 321.199 m², se ubicaron geográficamente nueve puntos (Figura 11) y se colectó suelo de cada uno de ellos.

Sitio 2, suelo testigo sin hidrocarburos totales del petróleo, ubicado en el ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, municipio de Cárdenas, Tabasco (Figura 10), con coordenadas geográficas 17° 59' 50" de Latitud Norte y 93° 24' 59" de Longitud Oeste. Solo se hizo un muestreo de suelo.

La colecta de suelo en los nueve puntos del sitio 1 y en el punto del sitio 2 para el bioensayo y los análisis químicos se realizaron en el primer horizonte, en el espesor de 0-30 cm, se tomaron 50 kg, se introdujeron en bolsas de plástico, se trasladaron al laboratorio, se secaron bajo sombra, se molió con mazo de madera y tamizó en una malla metálica inoxidable de 5 mm de apertura.

5.1.2. Análisis físicos y químicos de suelos

Los análisis físicos y químicos realizados antes de establecer los bioensayos en invernadero en los diez suelos utilizados, se llevaron a cabo con las rutinas analíticas indicadas en la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002). Se determinaron, el pH por Potenciometría indicado en el método AS-02, el tamaño de partícula por el método AS-09 de Bouyoucos, carbono orgánico determinado por el método AS-07 de Walkley y Black a partir de la materia orgánica y dividiéndolo entre un factor de conversión de

1.724, y nitrógeno total a través del método AS-25 por procedimiento de digestado semi-micro Kjeldahl.

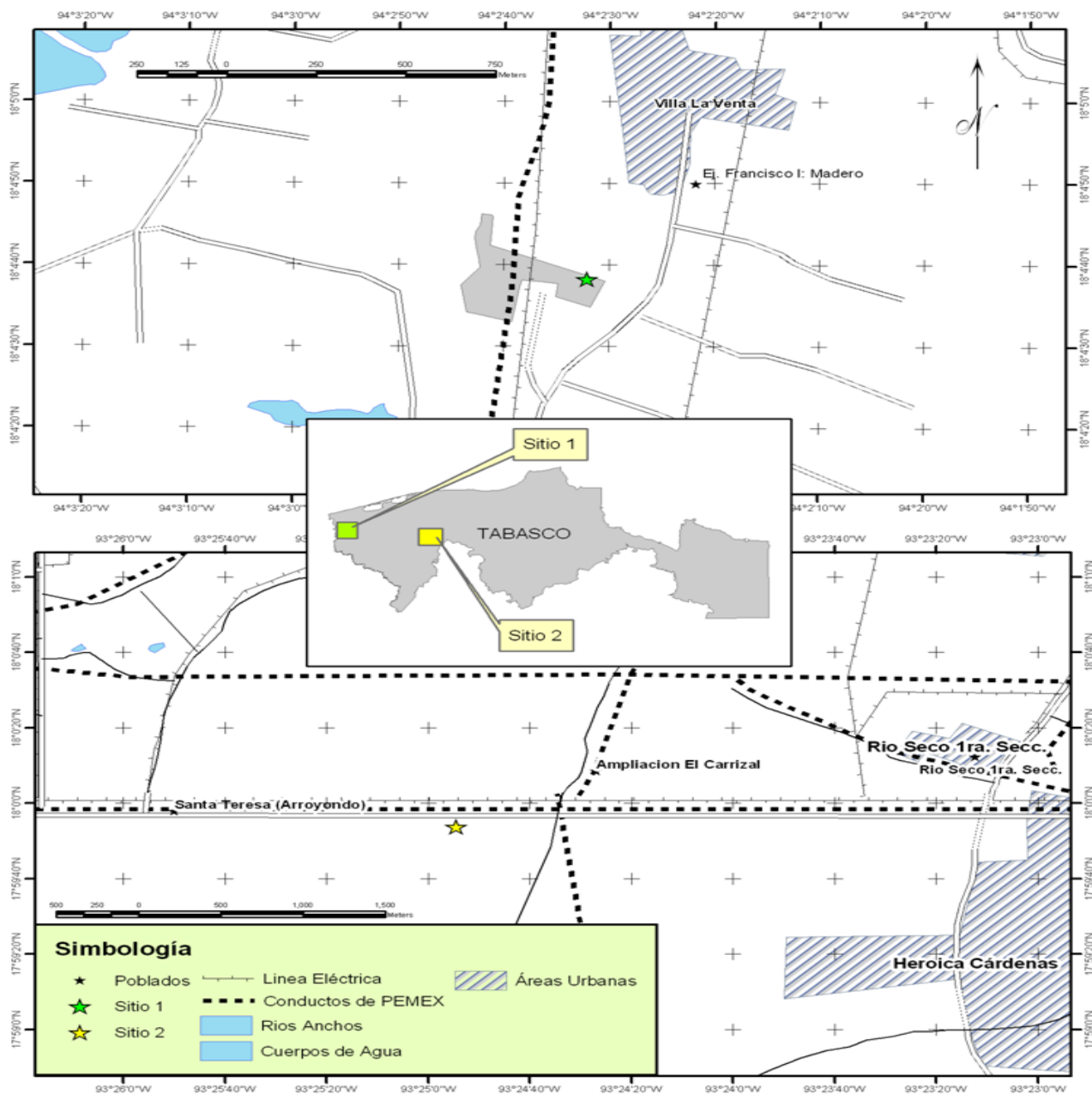


Figura 10. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo en el ejido José Narciso Rovirosa, municipio de Huimanguillo, Tabasco y ejido Arroyo Hondo Santa Teresa, municipio de Cárdenas, Tabasco (Maldonado, 2006).

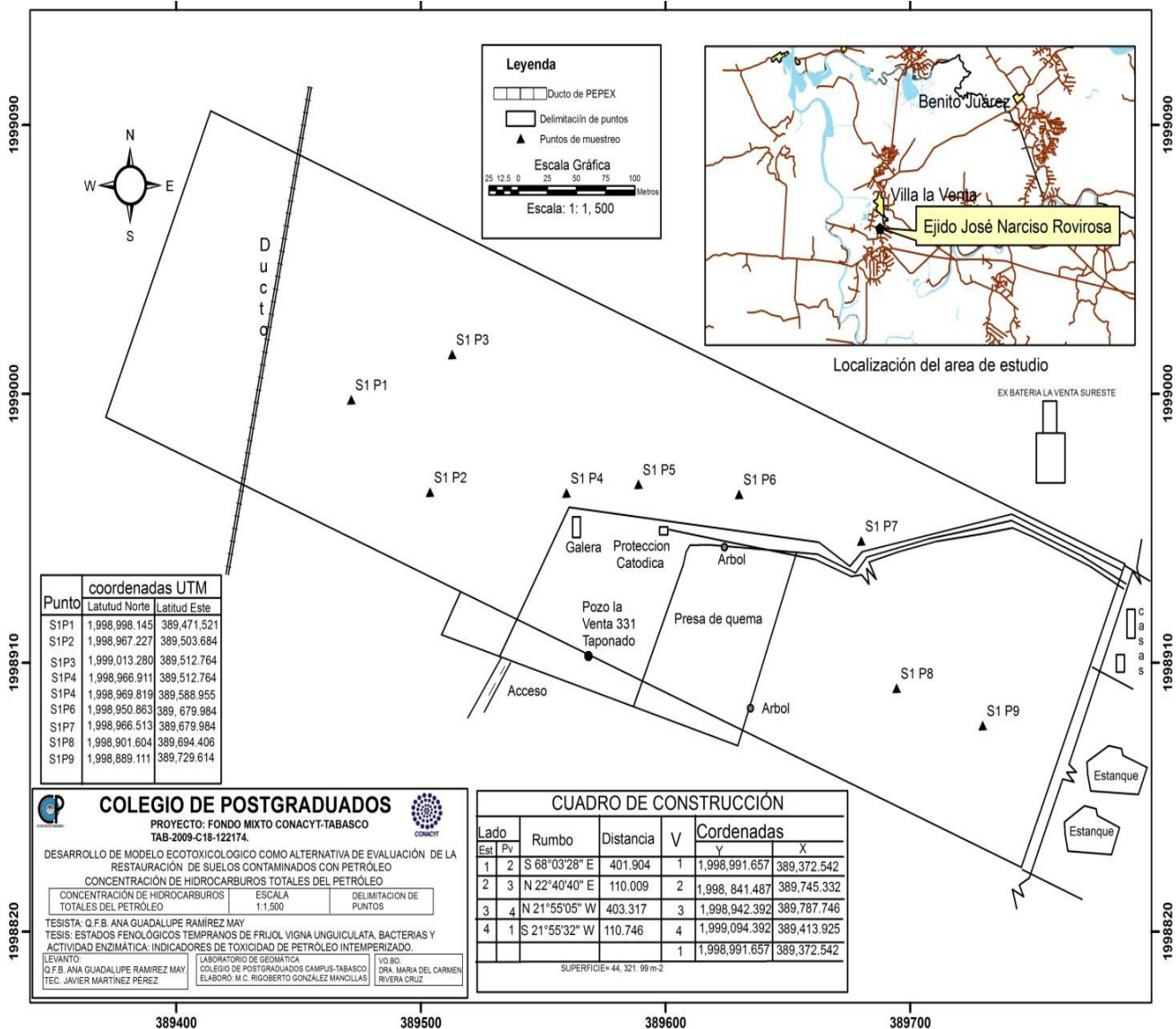


Figura 11. Ubicación de puntos de muestreo en el eje José Narciso Rovirosa, La Venta, Huimanguillo, Tabasco.

La extracción y cuantificación de los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) se realizó mediante el método analítico 418.1 modificado para suelos y sedimentos (EPA, 1986). La extracción de los hidrocarburos se realizó con diclorometano en equipo Soxhlet y la cuantificación de éstos se calculó por métodos gravimétricos.

El Cuadro 8 muestra las propiedades físicas y químicas de los 10 suelos. La textura francosa predominó en seis suelos existiendo equilibrio en las fracciones de arena, limo y arcilla, pero en cuatro suelos predominó la fracción arcillosa. El pH en el suelo testigo es neutro y los nueve suelos que contienen HTPI son moderadamente ácidos según lo indica la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002).

Cuadro 8. Características físicas y químicas de los suelos estudiados.

Tratamiento (suelo)	Sitio/punto	Textura	pH _{1:2H₂O}	C org. (%)	N _{total} (%)	HTPI (mg kg ⁻¹)
1	S2 ^{††} Testigo [§]	Franco arcilloso	6.98	5.92	0.42	2 706
2	S1 [†] P3 [¶]	Franco arcillo arenoso	5.21	11.35	0.61	5 822
3	S1P5	Arcilloso	6.09	12.75	0.43	6 536
4	S1P1	Franco arcilloso	5.71	13.43	0.59	13 803
5	S1P6	Arcilloso	6.49	9.31	0.35	14 431
6	S1P4	Arcilloso	6.14	13.72	0.34	15 923
7	S1P2	Franco arcillo arenoso	5.36	9.53	0.50	23 313
8	S1P8	Arcilloso	6.43	16.75	0.32	25 517
9	S1P9	Franco arcilloso	5.78	8.33	0.31	28 465
10	S1P7	Franco limoso	6.18	8.21	0.51	50 297

[†]: Sitio 1. Ejido José Narciso Rovirosa, municipio de Huimanguillo, Tabasco. [¶]: Punto según la Figura 11.

^{††}: Sitio 2. Ejido Arrollo Hondo. H. Cárdenas, Tabasco. [§]: Punto según la Figura 10.

HTPI: Hidrocarburos totales del petróleo intemperizado.

El Carbón orgánico en los diez suelos es muy alto, los hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI) están contenidos en nueve suelos por arriba los límites máximos permisibles que indica la NOM-138-SEMARNAT/SS-2003 (DOF, 2005), el suelo testigo contiene 2 706 mg kg⁻¹ de HTP de origen biogénico, posiblemente fueron incorporados por el hombre durante el proceso de quema de los residuos vegetales. La quema de los residuos vegetales en los humedales del estado de Tabasco es frecuentemente realizada en la época de sequía con el fin de agregar nutrimentos al suelo y cultivarlos.

El contenido de N total, considerado como un índice de las reservas orgánicas de Nitrógeno en el suelo de los diez tratamientos es de categoría muy alta, según los rangos de fertilidad para suelos que establece la NOM-021-SEMARNAT-2000 (DOF, 2002). Dentro de esta clase, los contenidos de N total más altos se registraron en dosis de 5 822 y 13 803 mg kg⁻¹ de HTPI, considerando que la presencia de hidrocarburos totales de petróleo intemperizado en los suelos no es un factor determinante para los contenidos de N total.

5.1.3. Material vegetal

El material vegetal escogido para ser utilizado en la prueba de fitotoxicidad fue la planta leguminosa frijol pelón (*Vigna unguiculata*), sus características agronómicas son:

Descripción: Es una leguminosa de crecimiento indeterminado, ya que necesita el uso de espalderas o tutores para mantenerse erguidas pudiendo llegar a medir hasta 1,600 m desde el nivel del mar. El ciclo agrícola de esta especie es entre 70 a 140 días (Peters *et al.*, 2003).

Hábitat. Es una leguminosa que se adapta bien a diferentes suelos y climas, tiene un alto rango de adaptación pluvial a precipitación entre 700 a 2000 mm pero prefiere suelos bien drenados. Tiene un mejor desarrollo en suelos un poco ácidos, y se adapta a diferentes zonas, siendo tolerante a la sequía (Bernal, 2007).

5.1.4. Obtención de semillas y prueba de germinación

Las semillas de frijol pelón se compraron con un productor agrícola de H. Cárdenas, Tabasco. Se seleccionaron semillas uniformes, las cuales se depositaron en un vaso de precipitado con agua, las semillas que flotaron se eliminaron y las que precipitaron se seleccionaron para las pruebas de germinación y su utilización en el bioensayo de fitotoxicidad.

La prueba de germinación fue *in vitro*, colocando las semillas viables previamente húmedas en hojas de papel, y metiéndolas a una incubadora a 28 °C durante 48 h para

observar la germinación, donde se obtuvo un $70\% \pm 2$ de germinación de *Vigna unguiculata*.

5.2. Etapa 2. Trabajo de invernadero

Esta etapa consistió en el establecimiento de dos bioensayos de toxicidad en los suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado y la medición de las variables.

5.2.1. Establecimiento de bioensayo

Los bioensayos de fitotoxicidad se realizaron sobre mesas metálicas instaladas bajo un túnel invernadero de plástico del área de Ciencias Ambientales, Laboratorio de Microbiología Ambiental y aplicada (Figura 12). Se establecieron dos bioensayos de acuerdo a los criterios indicados en el protocolo para la evaluación de plantas terrestres No.208 de la Organización para la Cooperación y Desarrollo Económico (OCDE), modificado por Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004). El bioensayo uno se realizó durante 30 días de exposición a hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (del 7 de Junio del 2011 al 7 de Julio del 2011). El bioensayo dos se estableció en la misma fecha que el bioensayo uno, pero se cosechó a los 120 días posteriores a la siembra (del 7 de Junio del 2011 al 7 de Octubre del 2011).



Figura 12. Bioensayo de toxicidad con diferentes dosis de HTPI en *Vigna unguiculata*.

En ambos bioensayos se uso semilla de frijol pelón (*Vigna unguiculata*). Los dos bioensayos se establecieron bajo diseño completamente al azar donde los tratamientos estuvieron constituidos por una planta y diez concentraciones diferentes de petróleo intemperizado [2 706, 5 822, 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 23 313, 25 517, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de hidrocarburos totales del petróleo intemperizado (HTPI)], en total diez tratamientos con ocho repeticiones, lo que representa 80 unidades experimentales. El experimento uno fue con plántula (30 días) y el experimento dos fue con planta (120 días).

Se evaluaron dos estados fenológicos (plántula y planta) (Cuadro 9). Para cada uno de los ciclos (plántula y planta) se utilizaron 40 unidades experimentales respectivamente. En la Figura 13 se observa la distribución de las unidades experimentales completamente al azar.

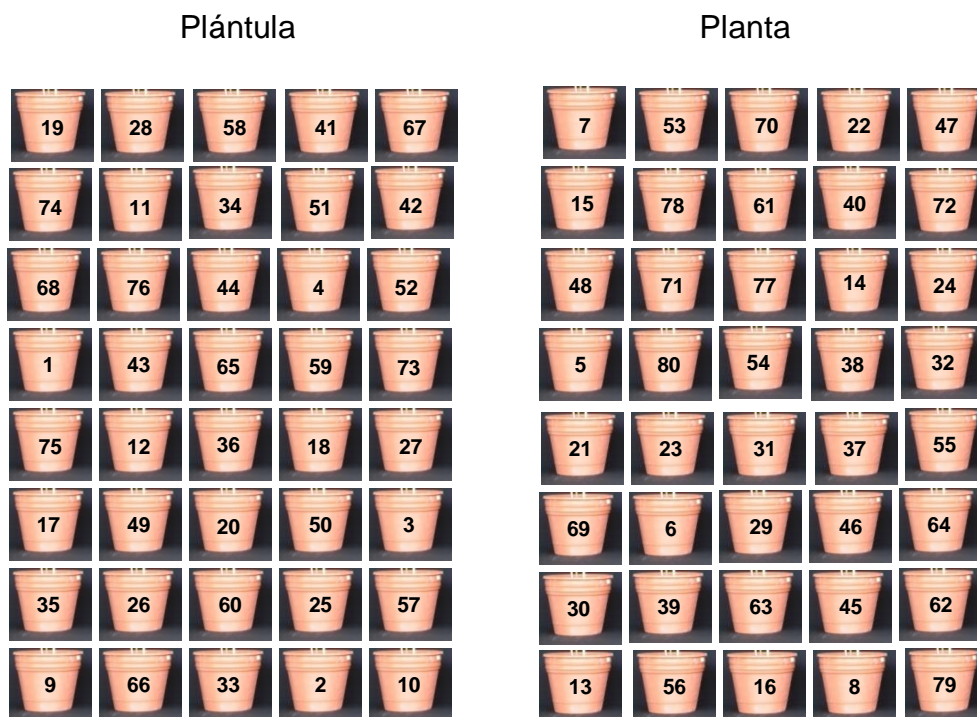


Figura 13. Distribución al azar de unidades experimentales.

5.2.1.1. Preparación de las unidades experimentales

La unidad experimental fue una maceta de plástico con dimensiones de 21.5 cm de ancho y 19 cm de profundidad, en las que se colocaron 2 kg de suelo seco en cada maceta. El suelo con petróleo intemperizado y testigo se depositaron directamente en la maceta. Se muestrearon 20 g de suelo de cada unidad experimental para evaluar hidrocarburos totales del petróleo, se adicionó agua hasta una humedad aprovechable del 30%. Se sembraron en cada contenedor ocho semillas de frijol pelón, el riego se realizó diariamente con agua de la llave y se mantuvo una humedad en el suelo del 28%.

Cuadro 9. Tratamientos con plántula y planta de *Vigna unguiculata*.

Tratamiento	Tipo de suelo	Dosis de HTPI (mg kg ⁻¹ s.s.)	Estado fenológico	
			Plántula	Planta
Unidades experimentales				
1	S2 ^{††} Testigo [§]	2 706	1, 2, 3, 4	5, 6, 7, 8
2	S1 [†] P3 [¶]	5 822	9, 10, 11, 12	13, 14, 15, 16
3	S1 [†] P5	6 536	17, 18, 19, 20	21, 22, 23, 24
4	S1 [†] P1	13 803	25, 26, 27, 28	29, 30, 31, 32
5	S1 [†] P6	14 431	33, 34, 35, 36	37, 38, 39, 40
6	S1 [†] P4	15 923	41, 42, 43, 44	45, 46, 47, 48
7	S1 [†] P2	23 313	49, 50, 51, 52	53, 54, 55, 56
8	S1 [†] P8	25 517	57, 58, 59, 60	61, 62, 63, 64
9	S1 [†] P9	28 465	65, 66, 67, 68	69, 70, 71, 72
10	S1 [†] P7	50 297	73, 74, 75, 76	77, 78, 79, 80

[†]: Sitio 1. Ejido José Narciso Roviroza, municipio de Huimanguillo, Tabasco. [¶]: Punto según la Figura 11.

^{††}: Sitio 2. Ejido Arrollo Hondo. H. Cárdenas, Tabasco [§]: Punto según la Figura 10.

HTPI: Hidrocarburos totales del petróleo intemperizado.

s.s.: Suelo seco.

5.2.2. Variables evaluadas en plántula

Se colocaron ocho semillas de *Vigna unguiculata* en cada maceta de plástico, donde se mantuvieron a una temperatura de 28 °C y humedad a capacidad de campo para evaluar durante cinco días el porcentaje de emergencia.

% de emergencia: se evaluó cada 24 h hasta los cinco días y se calculó con la diferencia entre el número de semillas sembradas y las plántulas obtenidas a los 30 días después de la siembra.

Altura de plántula: se evaluó cada 15 días hasta llegar al día 30, que se midió con una regla graduada en centímetros. La determinación de la biomasa radical, foliar y total se realizó conforme a las recomendaciones de Alcántar *et al.* (1992), donde se separó la parte aérea y radical de cada planta, para lavarlas posteriormente con agua de la llave y colocarlas en bolsas de papel etiquetadas, se metieron en estufa a 75 °C durante 48 h, después se pesó el material en una balanza analítica para obtener los valores de materia seca.

Biomasa de nódulos: los nódulos se separaron de las raíces de las plántulas, se lavaron con agua y se colocaron en cajas Petri, se secaron en estufa a 75 °C durante 48 h, se pesó en balanza analítica y se obtuvieron los datos de biomasa seca.

Número de nódulos: se evaluó por conteo directo, se separaron los nódulos de cada una de las raíces de las 40 unidades que integraron el experimento, se contaron, se colocaron en cajas Petri, se lavaron y almacenaron a 4 °C por 24 horas para determinar posteriormente la densidad de *Rhizobium* (unidades formadoras de colonias por gramo de nódulo).

Viabilidad de nódulos: se determinó partiendo el nódulo a la mitad con bisturí y observando que el interior fuera de color rojo (Figura 14), lo que indica la presencia de Leghemoglobina (CIAT, 1988).

5.2.3. Variables evaluadas en planta

La altura de las plantas se midió después de los 30 días, cada 15 días hasta los 120 días, con una regla graduada en centímetros (Figura 15). A los 120 días se evaluó el diámetro basal (cm) con vernier. La biomasa radical, foliar, de nódulos, total, número y viabilidad de nódulos se realizó con el mismo procedimiento indicado en la fase de plántula, pero a los 120 días.



Figura 14. Determinación de Leg-hemoglobina en nódulos de *Vigna unguiculata*.



Figura 15. Medición de altura de plantas.

5.2.4. Variables microbiológicas en plántula y planta

La determinación de la densidad de *Rhizobium* en nódulos, bacterias totales fijadoras de N de vida libre, bacterias del grupo *Azospirillum* sp. y *Azotobacter* sp. en rizosfera y

suelo a distancia, se realizó con el método de cuenta viable por dilución seriada en medios de cultivos específicos (Madigan *et al.*, 2009). Para Bacterias Fijadoras de Nitrógeno totales se empleó el medio de cultivo Carbón combinado o Rennie (1981) (Anexo, Cuadro 1), para *Azospirillum* el medio de cultivo Rojo Congo (Rodríguez, 1982) (Anexo, Cuadro 2), para *Azotobacter* el medio de cultivo Ashby (Rao, 1999) (Anexo, Cuadro 3) y en *Rhizobium* se empleó el medio de cultivo Extracto de Levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (CIAT, 1988) (Anexo, Cuadro 4). Las determinaciones de la densidad de bacterias fijadoras de N₂ de vida libre totales y del grupo de bacterias *Azotobacter* y *Azospirillum* en rizósfera y suelo a distancia se realizaron con el procedimiento señalado en la Figura 16.



Pesar 10 g suelo húmedo



Diluir 10 g de suelo en 90 mL de agua destilada estéril



Agitar durante 15 minutos



Rastrilleo e incubación durante 7-15 días a 28 °C



Conteo de UFC de acuerdo al peso seco de la muestra

Figura 16. Procedimiento de conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre en suelo y rizosfera.

La densidad de *Rhizobium* en nódulos se evaluó de la siguiente manera: 1) pesar 1 g de nódulos; 2) colocar los nódulos en etanol 95% durante un minuto (primer lavado), después en hipoclorito de sodio 3% durante tres minutos (segundo lavado), enseguida lavar en agua destilada estéril 5 a 6 veces (Figura 17); 3) macerar los nódulos con varilla de vidrio estéril; 4) diluir 1 g de nódulos en 9 ml de agua destilada estéril. Posteriormente, hacer diluciones de 10^1 a 10^4 en tubos con 9 ml de agua destilada estéril. Entre cada dilución las muestras de los tubos se agitan en vórtex durante 15 minutos (Martínez, 1998); 5) se coloca cada caja Petri con 0.1 ml de la muestra previamente diluida y agitada en el rehilete y se rastrilla con un rastrillo fabricado de varilla de vidrio, después se incuban a 28 °C durante 7 a 15 días; 6) observar el crecimiento de las colonias de *Rhizobium* en cada caja Petri (Figura 18) y, 7) contar la densidad de *Rhizobium* de cada caja Petri [unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo de nódulo].

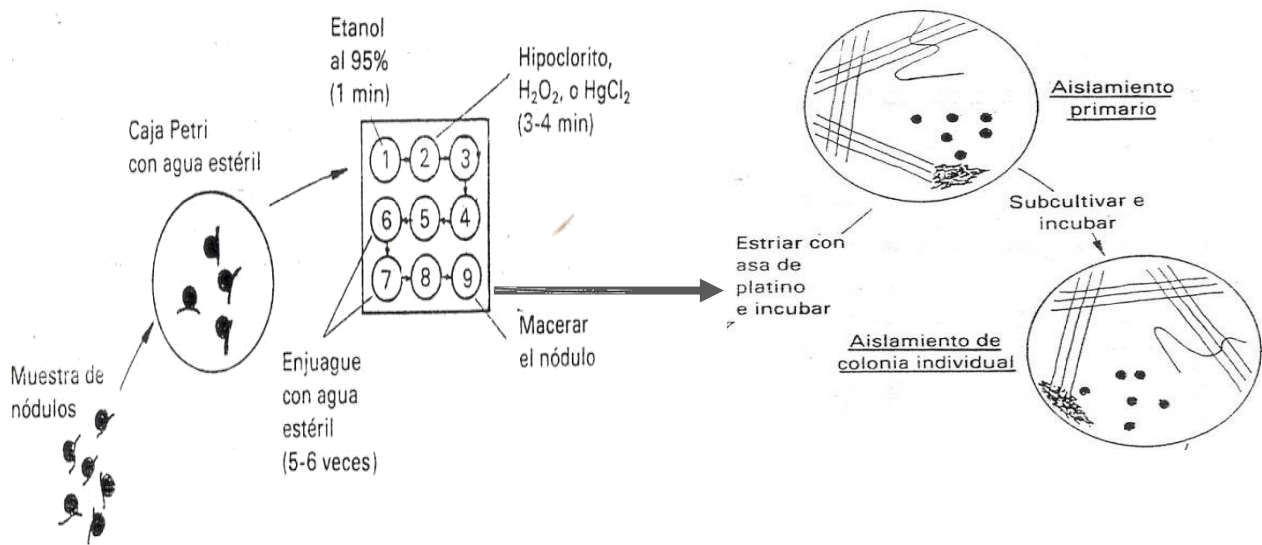


Figura 17. Procedimiento de aislamiento de rizobios de los nódulos de leguminosas (CIAT, 1988).

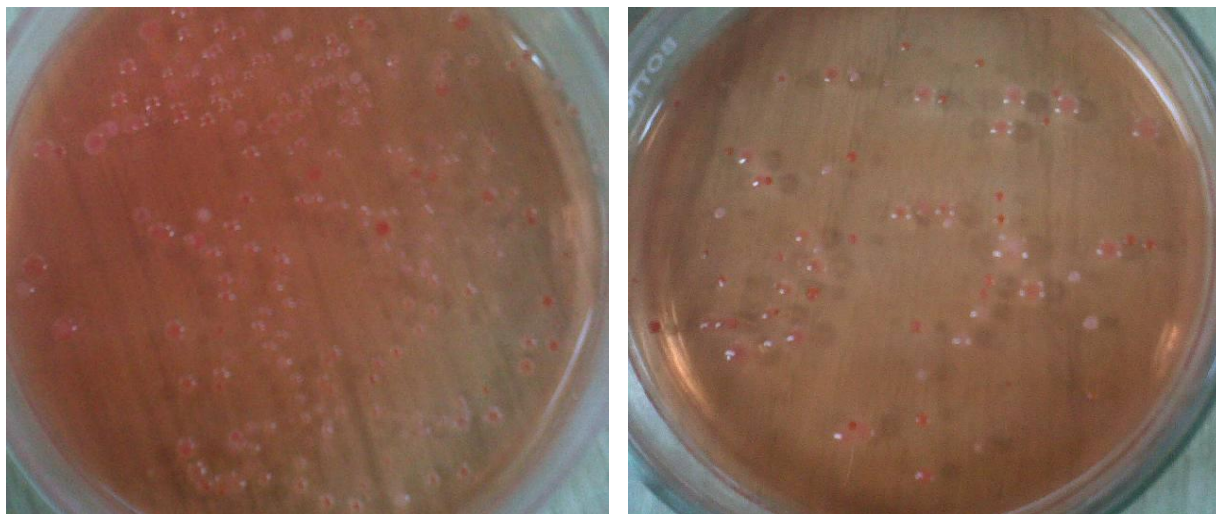


Figura 18. Unidades formadoras de colonias (UFC) de *Rhizobium*.

5.2.5. Actividad enzimática ureasa en plántula y planta

La actividad enzimática de la ureasa en suelo se determinó de acuerdo con el método colorimétrico de Kandeler y Gerber (1988) modificado por Kandeler *et al.* (1999), utilizando muestras y controles, en ambos se utilizaron blancos para la curva de calibración, en la cual se empleó cloruro de amonio (NH_4Cl).

El suelo se pasó por tamiz de 2 mm, tomando 0.5 g y se le agregaron 2 mL de tampón fosfato 0.1 M y de pH 7, a las muestras se les agregó 0.5 mL de urea (99.7% de pureza, marca J.T. Baker), los controles no contenían urea, y se colocaron en baño María durante 1.30 h a 30 °C (Figura 19a). Transcurrido ese tiempo se sacaron del baño María agregando 7.5 mL de agua destilada estéril a las muestras y 8 mL a los controles (Figura 19b). Se centrifugaron durante 8 min a 3400 revoluciones por minuto (rpm) (Figura 19c), posteriormente se tomó 1 mL del sobrenadante colocándolo en tubos de ensaye y se agregó 5.8 mL de agua destilada estéril más 0.8 mL de citrato sódico (99% de pureza, marca Merck), 1.6 mL de mezcla de salicilato sódico (99.5% de pureza, marca Meyer) con nitroprusiato sódico (99% de pureza, marca Fluka Analytical) y 0.8 mL de mezcla de dicloro isocianomurato (98% de pureza, marca Aldrich Chemistry) con hidróxido de sodio (97.4% de pureza, marca J.T. Baker) (Figura 19d).

Las muestras y los controles se dejaron durante 45 minutos en oscuridad (Figura 19e), y finalmente se leyeron en espectrofotómetro a 690 nm (Figura 19f).



Figura 19. Procedimiento para la determinación de la actividad enzimática ureasa.

5.3. Etapa 3. Análisis estadístico

Se realizó el análisis de varianza (ANOVA) para cada una de las variables evaluadas, de acuerdo al modelo lineal del diseño experimental propuesto como diseño completamente al azar (DCA).

$$Y_{ij} = \mu + T_i + e_{ij} \quad \begin{array}{l} i = 1, 2, \dots, t \\ j = 1, 2, \dots, r \end{array}$$

Donde:

Y_{ij} : Respuesta observada en la j -ésima repetición del tratamiento i -ésimo.

μ : Efecto medio general.

T_i : Efecto del i -ésimo tratamiento.

e_{ij} : Error experimental.

La comparación de medias se realizó de acuerdo con la prueba de Tukey, se aplicó un nivel de significancia de 5% ($p \leq 0.05$). Los datos se procesaron en el programa estadístico SPSS versión 12 para el análisis de varianza. El análisis de correlaciones se realizó con el test de Pearson (Camacho, 2006).

El índice relativo de toxicidad se obtuvo a partir de restar una unidad al índice de tolerancia de Porta *et al.* (1999). Este índice evalúa la respuesta de la planta expuesta a suelo contaminado. Se realizó una modificación para determinar el grado de toxicidad del suelo contaminado con petróleo intemperizado mediante un índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) y un índice relativo de impacto tóxico en bacterias de vida libre (IRITBL) para cada una de las variables de estudio en cada estado fenológico. Se determinó el índice total de impacto fitotóxico (ITIF), el índice total de impacto tóxico en bacterias de vida libre (ITITBL), índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) y un índice de impacto tóxico en suelo (IITS) por tratamiento. El cálculo se realizó con las medias de las variables de respuesta por tratamiento de acuerdo con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). El cálculo de los índices relativos y absolutos de toxicidad se llevaron a cabo de la siguiente manera:

$$IRIF \text{ o } IRIT = 1 - \left(\frac{T_p}{T_t} \right)$$

Donde:

IRIF o IRIT: Índice relativo de impacto fitotóxico o tóxico

T_p : Tratamiento con petróleo

T_t : Tratamiento testigo

$$ITIF \text{ o } ITIT = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n IRIF \text{ o } IRIT_i$$

Donde:

ITIF o ITIT: Índice total de impacto fitotóxico o tóxico

n: número de tratamientos

IRIF o IRIT: Índice relativo de impacto fitotóxico o tóxico

SECCIÓN VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Efecto de nueve concentraciones de petróleo intemperizado en el suelo sobre la emergencia y el crecimiento de la plántula de frijol pelón

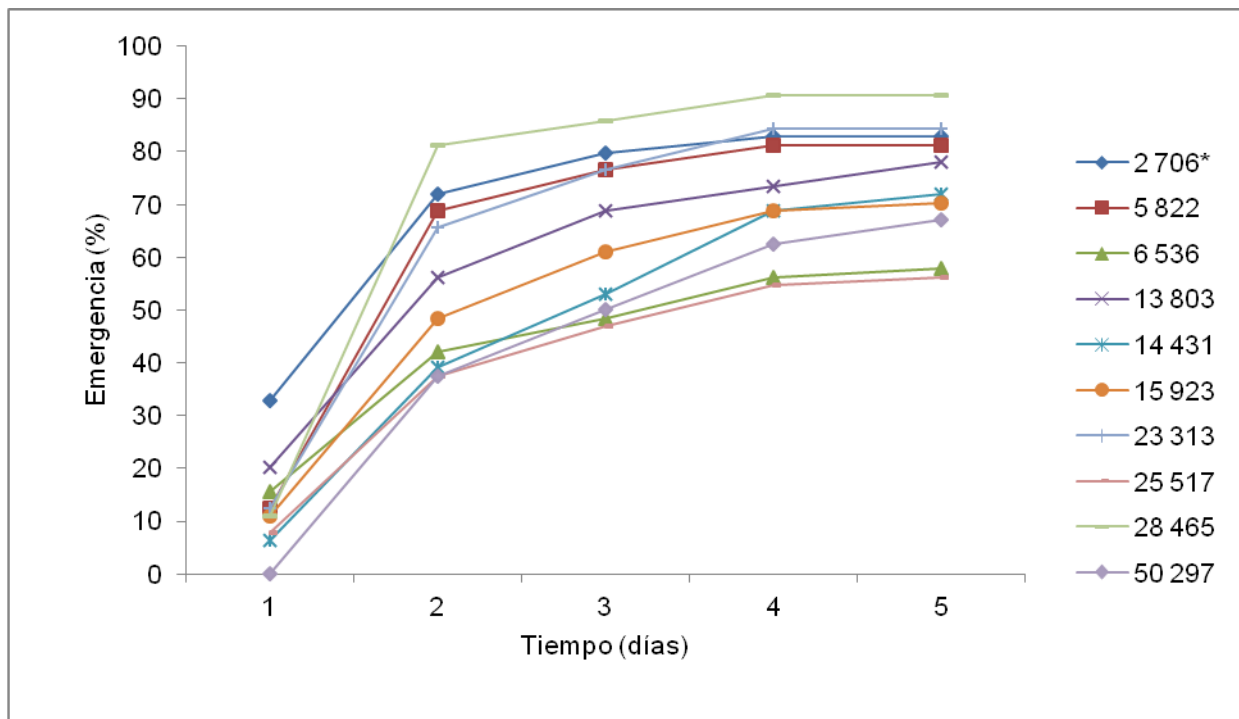
6.1.1. Dinámica de emergencia de frijol pelón

La emergencia de las semillas se determinó en cinco tiempos sucesivos después de establecido el bioensayo en el invernadero. Se observó en cada uno de los tiempos diferencias estadísticas significativas (Tukey $p \leq 0.05$) entre los 10 tratamientos por efecto de los hidrocarburos del petróleo intemperizado (HTPI) (Figura 20) (Apéndice, Cuadro 1).

Al día uno la mayor emergencia con 32.81% fue en el tratamiento testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTP biogénico) y la menor (0%) en el tratamiento con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI. Al día dos, tres, cuatro y cinco el porcentaje de emergencia presentó un comportamiento irregular respecto a la dosis de los HTPI en el suelo, debido a que esta no disminuyó conforme la dosis aumentó. Este comportamiento posiblemente sucede por el bajo potencial tóxico del petróleo intemperizado para los seres vivos, que según Adams *et al.* (2008) en las zonas tropicales las tasas de biodegradación de hidrocarburos es más alta que en zonas templadas, por lo que la duración de afectación es menor (2-3 meses), debido a que la característica de este petróleo es que contiene la fracción estable y con baja disponibilidad.

En el día cinco, el mayor porcentaje de emergencia (90.63%) se presentó en suelo con 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI, lo cual representa 9.43% mayor emergencia que en el suelo con 2 706 mg kg⁻¹ de HTP de origen biogénico (tratamiento testigo), así mismo el suelo con 23 313 mg kg⁻¹ (84.38%) tiene 1.89% mayor emergencia, pero la menor emergencia (56.25%) fue localizada en suelo con 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI, siendo 32.08% menor que el tratamiento testigo (82.81%), presentándose la misma tendencia irregular entre los tratamientos con las dosis de HTP intemperizado (Figura 20).

Al respecto, la leguminosa *Phaseolus vulgaris* L. en dosis mayores a $4\,500\text{ mg kg}^{-1}$ de petróleo fresco se inhibe el porcentaje de emergencia hasta un 74% respecto al tratamiento sin contenidos de hidrocarburos del petróleo (Arias, 2008). Resultados similares fueron reportados por Quiñones *et al.* (2003) en dos variedades de maíz, las cuales fueron expuestas en suelo con $35\,000\text{ mg kg}^{-1}$ de petróleo, lo que provocó un retraso en la emergencia.



*Tratamiento testigo

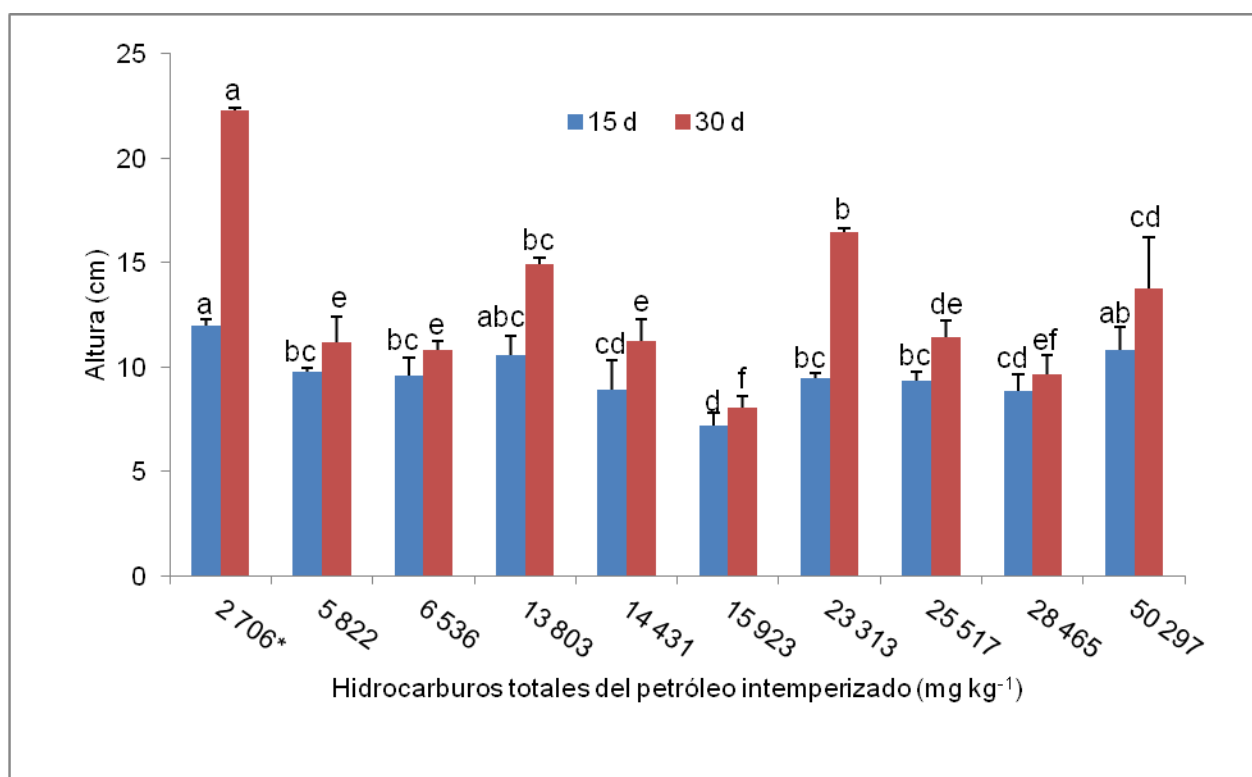
Figura 20. Dinámica de emergencia de frijol pelón (*Vigna unguiculata*) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado en mg kg^{-1} ($n=8$) al día 30.

6.1.2. Respuesta en crecimiento de frijol pelón (estado de plántula) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado

La altura de las plántulas de frijol pelón (*Vigna unguiculata*) se midió en dos tiempos, a los 15 y 30 días después de establecido el bioensayo. En los dos tiempos se encontraron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos por efecto del factor dosis de HTPI en el suelo (Figura 21) (Apéndice, Cuadro 2).

Al día 15, la mayor altura registrada fue de 12 cm en suelo testigo (Figura 21). La dosis mayor de HTPI utilizada en este experimento ($50\ 297\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$) afectó únicamente un 9.75%, pero dosis de 5 822, 6 536, 14 431 y 15 923, afectan un 18.58, 20, 25.58 y 40.25% respectivamente el crecimiento de las plántulas de *Vigna unguiculata*.

En el día 30, al igual que en los 15 días, las alturas presentaron comportamientos similares en los diferentes tratamientos. La mayor altura (22.27 cm) se localizó en suelo testigo, así mismo la dosis de $50\ 297\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ indujo menor efecto respecto a dosis menores. Las reducciones de altura fueron de 49.70, 51.35, 33.08, 49.55, 63.77, 26.05, 48.65, 56.74 y 38.33% a dosis de 5 822, 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 23 313, 25 517, 28 465 y $50\ 297\ \text{mg}\ \text{kg}^{-1}$ de HTPI, respectivamente (Figura 21).



Medias con la misma letra dentro de cada tiempo no tienen diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$).

*Tratamiento testigo

Figura 21. Altura en plántulas de *Vigna unguiculata* por dosis de hidrocarburos del petróleo intemperizado en dos tiempos (15 y 30 días).

El comportamiento anterior del crecimiento de la plántula de *Vigna unguiculata* basado en la altura en los dos tiempos, indica que dosis superiores a 5 822 mg kg⁻¹ de HTPI en el suelo causan efecto negativo, pero este efecto no es inversamente proporcional a la dosis, como sucede con la altura de diferentes leguminosas expuestas a dosis de petróleo fresco. Al respecto Rivera-Cruz *et al.* (2005) encontraron tendencias inversamente proporcionales al exponer cuatro leguminosas (chipilín silvestre, guaje, dormilona y zarza) a diferentes contenidos de hidrocarburos del petróleo fresco.

6.1.3. Biomasa seca en plántulas de frijol pelón

Para el efecto de la dosis de HTPI en el suelo a los 30 días sobre la biomasa seca del frijol pelón, el análisis de varianza reportó diferencias estadística significativas (Tukey $p \leq 0.05$) para biomasa foliar (peso seco de hojas y tallos), biomasa radical (peso seco de raíces), biomasa de nódulos (peso seco de nódulos) y biomasa total (foliar, radical y de nódulos) de frijol pelón (Apéndice, Cuadro 3).

En el Cuadro 10 se presentan los resultados de diez tratamientos, para biomasa radical, foliar, de nódulos y total, se observa que el tratamiento testigo (2 706 mg kg⁻¹ HTP) fue el mayor, sugiriendo que este contenido de hidrocarburos no es tóxico para el desarrollo de *Vigna unguiculata*.

Los menores valores de biomasa foliar y radical se encontraron en los tratamientos con 5 822, 6 536, 14 431, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ HTPI, mientras que en los tratamientos con 5 822, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ HTPI no se reportaron valores de biomasa de nódulos por la ausencia de éstos en las raíces de *Vigna unguiculata*.

La biomasa total en el tratamiento testigo reportó un valor de 3.288 g, así mismo los tratamientos con 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI provocaron menor efecto en esta variable respecto a los demás tratamientos con dosis menores de petróleo intemperizado, sin embargo son 43.80 y 44.71% menores al tratamiento testigo, respectivamente. Los valores más bajos de biomasa total se registraron en los tratamientos con 6 536 y 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI, presentando los efectos más tóxicos

para *Vigna unguiculata*, ya que fueron 93.70 y 95.50% menores con respecto al tratamiento testigo, se observa tendencias irregulares entre dosis de hidrocarburos de petróleo intemperizado.

Cuadro 10. Valores de biomasa seca en *Vigna unguiculata* al día 30 de exposición al petróleo intemperizado.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Biomasa (g)			
		Foliar	Radical	Nódulos	Total
1	2 706	2.710 a*	0.483 b	0.095 a	3.288 a
2	5 822	0.428 de	0.040 d	0.000 d	0.468 de
3	6 536	0.140 e	0.050 d	0.017 c	0.207 e
4	13 803	1.050 c	0.170 cd	0.014 c	1.234 c
5	14 431	0.623 d	0.073 d	0.079 b	0.775 cd
6	15 923	0.093 e	0.043 d	0.013 c	0.149 e
7	23 313	1.528 b	0.300 c	0.020 c	1.848 b
8	25 517	0.207 e	0.073 d	0.017 c	0.297 de
9	28 465	0.320 de	0.098 d	0.000 d	0.418 de
10	50 297	1.048 c	0.770 a	0.000 d	1.818 b

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

Estos resultados difieren a los de Adams *et al.* (2008), quienes registraron que el incremento en la concentración de hidrocarburos está directamente relacionado con la reducción en la capacidad de campo, lo cual disminuye la producción de biomasa vegetal en pastos, efecto que ocurre en concentraciones mayores a 6 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo intemperizado.

Por su parte, Rivera *et al.* (2011) encontraron que en dosis de 78 400 mg kg⁻¹ de petróleo intemperizado se produce un impacto negativo del 59.19% en la producción de biomasa total del pasto *Brachiaria mutica*, mientras que para la leguminosa *Leucaena leucocephala* esta dosis de petróleo intemperizado produce una disminución de biomasa total en un 97.34%. García (2005) registró reducción en el peso seco de

plántulas de arroz a los 25 días de exposición a dosis de 90 000 mg kg⁻¹ de petróleo intemperizado.

6.1.4. Número de nódulos en *Vigna unguiculata* con dosis crecientes de HTPI

El número de nódulos presentó diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) a los 30 días de exposición a diferentes dosis de petróleo intemperizado (Cuadro 11) (Apéndice, Cuadro 4), donde el tratamiento testigo (2 706 mg kg⁻¹) con 59 nódulos fue el mayor, en cambio, en la mayoría de los tratamientos, al aumentar el contenido de hidrocarburo en el suelo, el número de nódulos disminuyó, siendo cero en algunos tratamientos (Cuadro 11).

Cuadro 11. Número y viabilidad de nódulos en *Vigna unguiculata* con dosis crecientes de HTPI al día 30.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Número de nódulos	Viabilidad de nódulos (%)
1	2 706	59 a*	46.39 c
2	5 822	0 d	0 e
3	6 536	4 d	0 e
4	13 803	18 c	87.27 a
5	14 431	42.75 b	18.41 d
6	15 923	6.25 d	0 e
7	23 313	17.25 c	65.55 b
8	25 517	6.25 d	52.78 bc
9	28 465	0 d	0 e
10	50 297	0 d	0 e

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$)

La viabilidad de nódulos fue mayor en el tratamiento con 13 803 mg kg⁻¹ HTPI. Esta variable presentó alta heterogeneidad entre los tratamientos, ya que no hubo viabilidad

en los tratamientos con 5 822 mg kg⁻¹, 6 536 mg kg⁻¹, 15 923 mg kg⁻¹, 28 465 mg kg⁻¹ y 50 297 mg kg⁻¹, donde algunos de éstos si presentaron nódulos (Cuadro 11).

La respuesta anterior se puede explicar con lo que indica González (2003), ya que posiblemente el suelo con petróleo intemperizado carece de Molibdeno (Mo), el cual es un elemento básico para la fijación simbiótica de N₂ por las leguminosas, especialmente en suelos ácidos como el existente en el tratamiento con 5 822 mg kg⁻¹ de HTPI el cual presentó un pH de 5.2, siendo el más bajo respecto a los demás tratamientos, siendo clasificado de acuerdo a la NOM-021-RECNAT-2000 (DOF, 2002) como moderadamente ácido.

6.1.5. Bacterias en rizosfera y suelo con petróleo intemperizado cultivado con *Vigna unguiculata*

6.1.5.1. Densidad de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre

La densidad de bacterias fijadoras de N (BFN) atmosférico de vida libre al día 30 en suelo a distancia y rizósfera de frijol pelón, de acuerdo con la comparación de medias en diez tratamientos, uno testigo (sin contaminación) y nueve contaminados con diferentes dosis de HTPI, mostró diferencias estadísticas significativas (Tukey, p≤0.05) por efecto de la dosis de HTPI. En rizósfera de frijol pelón la densidad mayor de BFN (1 492 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) fue observada en el tratamiento testigo, y las menores (93, 58 y 50 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) en los tratamientos 2, 3 y 6, respectivamente. En suelo a distancia la mayor densidad de BFN (582 x 10³ UFC g⁻¹ s.s) fue en el tratamiento sin HTPI (testigo). La menor densidad con la misma significancia estadística se localizó en cinco tratamientos (3, 6, 7, 9 y 10), pero aritméticamente la menor (36 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.) fue en el suelo con 6 536 mg kg⁻¹ de HTPI (Cuadro 12).

La respuesta que se observa de la densidad de BFN a las dosis de HTPI en rizosfera y suelo es irregular, no existe una tendencia convencional de dosis-respuesta inversamente proporcional, pero es evidente que la presencia del petróleo intemperizado induce reducción de la densidad de BFN (Cuadro 12; Apéndice, Cuadro 5). Estos resultados son similares a los obtenidos por Vázquez (2006), quien encontró

las poblaciones más grandes de bacterias fijadoras de N de vida libre en la leguminosa *Leucaena leucocephala* en suelos con 79 457 mg kg⁻¹ de petróleo intemperizado. A su vez, Dobson y Wilson (1964) observaron mayor actividad microbiológica en suelos contaminados con hidrocarburos.

Cuadro 12. Densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado, 30 días después de la siembra de frijol pelón (*Vigna unguiculata*).

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	BFN totales (10 ³ UFC g ⁻¹ suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [†]	
1	2 706	1 492 a*	582 a	2.56
2	5 822	93 f	150 cd	0.62
3	6 536	58 f	36 d	1.61
4	13 803	1 060 b	225 bc	4.71
5	14 431	724 c	307 b	2.36
6	15 923	50 f	85 d	0.59
7	23 313	157 ef	81 d	1.94
8	25 517	393 de	569 a	0.69
9	28 465	258 def	72 d	3.58
10	50 297	501 cd	43 d	11.65

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

†: Rizósfera. [†]: Suelo a distancia. [§]: Efecto rizósfera.

Por otro lado Rhodes y Hendricks (1990), mencionan que el petróleo tiene efecto sobre la composición biológica del suelo, por lo que las concentraciones tóxicas del petróleo en el suelo inhiben el crecimiento de las poblaciones de microorganismos y mesofauna, alterando los ciclos biogeoquímicos del ecosistema, afectando su productividad.

Se observa en el Cuadro 12 la existencia del efecto rizosfera en los diez tratamientos, indicando que la presencia de la planta estimula el aumento de la densidad de BFN en suelo sin y con petróleo intemperizado. El valor más alto (11.65) en el efecto rizosfera

se encontró en el tratamiento 10, el cual presenta el mayor contenido de HTPI (50 297 mg kg⁻¹), y el menor en el tratamiento 6 que contiene 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI.

Algunos factores ecológicos físicos como humedad y temperatura influyen en la microbiota de la rizosfera modificando la cantidad de exudados radicales. El incremento de la humedad puede alterar el equilibrio microbiano (Fenchel *et al.*, 2000), alterando el efecto rizosférico, ya que de acuerdo con Atlas *et al.* (1991), las poblaciones microbianas resienten el efecto de la contaminación del suelo, lo que se manifiesta en la disminución de las poblaciones microbianas por el estrés ambiental.

Rivera (2001) comparó poblaciones de bacterias inoculadas con hongos en suelo rizosférico y suelo no rizosférico de pasto alemán a los 30 días, donde la mayor población se encontró en el suelo rizosférico sin contaminación del petróleo, aunque también encontró valores similares en dosis de 50 000 y 100 000 mg kg⁻¹ de petróleo crudo, resultado causado por los altos contenidos de carbono en suelo y rizosfera.

Atlas *et al.* (1991) mencionan que las bacterias fijadoras de nitrógeno de vida libre encontradas a diferentes concentraciones de petróleo crudo, se consideran cepas especializadas y degradadoras de petróleo, con capacidad de multiplicarse en suelos con concentraciones altas de petróleo.

6.1.5.1.1. Densidad de bacterias del género *Azospirillum* en suelo y rizosfera de *Vigna unguiculata*

La media de la densidad de bacterias del grupo *Azospirillum* en términos estadísticos (Tukey, p≤0.05) presentó diferencias significativas en rizosfera de frijol pelón al día 30 en suelo a distancia sin y con petróleo intemperizado (Cuadro 13) por efecto de dosis de HTPI (Apéndice, Cuadro 6).

En la rizosfera de *Vigna unguiculata* las mayores densidades de *Azospirillum* (1 900 y 1 919 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) se registraron en los tratamientos 1 y 10 que corresponden al suelo testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTP biogénico) y con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI,

respectivamente, mientras que las menores densidades ($173, 97, 74$ y 212×10^3 UFC g^{-1} s.r.) se encontraron en los tratamientos 2, 3, 6 y 8, con dosis de $5\ 822, 6\ 536, 15\ 923$ y $25\ 517$ $mg\ kg^{-1}$ de HTPI (Cuadro 13). Por el contrario, para suelo a distancia la mayor densidad en *Azospirillum* (558×10^3 UFC g^{-1} s.s.) se registró en el tratamiento 8 que corresponde a la dosis de $25\ 517$ $mg\ kg^{-1}$ de HTPI y la menor densidad se observó en el tratamiento 3 ($6\ 536$ $mg\ kg^{-1}$ de HTPI) con un valor de 42×10^3 UFC g^{-1} s.s. (Cuadro 13).

Cuadro 13. Densidad del grupo de bacterias del género *Azospirillum* en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.

Tratamiento	HTPI ($mg\ kg^{-1}$ base seca)	<i>Azospirillum</i> (10^3 UFC g^{-1} suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [¶]	
1	2 706	1 900 a*	150 cde	12.67
2	5 822	173 e	184 cd	0.94
3	6 536	97 e	42 e	2.31
4	13 803	706 c	325 b	2.17
5	14 431	608 cd	80 de	7.6
6	15 923	74 e	115 cde	0.64
7	23 313	1 126 b	140 cde	8.04
8	25 517	212 e	558 a	0.38
9	28 465	471 d	220 bc	2.14
10	50 297	1 919 a	317 b	6.05

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, $p \leq 0.05$)

†: Rizósfera. ¶: Suelo a distancia. §: Efecto rizósfera.

Los datos de densidad en rizosfera y suelo a distancia fueron heterogéneos con respecto a las dosis de petróleo intemperizado, pero en ambos casos hubo efecto del petróleo en las poblaciones de *Azospirillum*. Lakshni *et al.* (1977) demostraron que suelos ricos en materia orgánica favorecen la existencia de esta bacteria, razón por la cual en los suelos contaminados (Cuadro 8) se pudo haber presentado la alta densidad

bacteriana, o por la volatilización de los compuestos presentes en el petróleo intemperizado.

Por su parte, Oliveira *et al.* (2004), determinaron que el aumento en la humedad del suelo favorece el crecimiento y el mantenimiento de la población de los microorganismos diazotróficos en diferentes cultivos, posiblemente debido a mecanismos que permiten su sobrevivencia durante largos períodos de tiempo en condiciones adversas.

El efecto rizosférico indica una mayor actividad microbiana en el suelo testigo (12.67), mientras que los menores efectos rizosféricos (0.94, 0.64 y 0.38) se registraron en los tratamientos 2, 6 y 8, con dosis de 5 822, 15 923 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI. Bravo (2007), menciona que los impactos típicos generados por la industria petrolera en el suelo incluyen, la compactación del suelo, daño o destrucción de la rizosfera y suelo superficial, erosión y pérdida de suelo, debido a la pérdida de vegetación, contaminación con compuesto inorgánicos (sulfatos y sales) y orgánicos (especialmente hidrocarburos).

6.1.5.1.2. Densidad de bacterias del género *Azotobacter* en suelo y rizosfera de *Vigna unguiculata*

Las densidades de *Azotobacter* presentaron diferencias estadísticas significativas (Tukey, $p \leq 0.05$) en rizosfera y suelo a distancia (Cuadro 14; Apéndice, Cuadro 7). La mayor densidad en rizosfera se registró en suelo testigo y con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (1 194 y 1 203 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) correspondientes a los tratamientos 1 y 8, mientras que los menores valores se encontraron en las dosis de 5 822 y 6 536 mg kg⁻¹ de HTPI (35 y 66 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) que pertenecen a los tratamientos 2 y 3 (Cuadro 14).

En suelo a distancia las densidades más altas (357 y 372 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.) fueron registrados en los tratamientos 1 y 8, pertenecientes al suelo testigo y con 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI. La menor densidad se encontró en el tratamiento 3 (6 536 mg kg⁻¹ de HTPI) con un valor de 26 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.

Los resultados obtenidos indican que en estos tratamientos existen factores que inhiben el crecimiento de las poblaciones de *Azotobacter*. Mishustin y Shilnikova (1969) mencionan que los contenidos de materia orgánica influyen positivamente en el crecimiento de *Azotobacter*, por lo que pudo existir crecimiento bacteriano en los tratamientos con contenidos elevados de hidrocarburos.

Cuadro 14. Densidad de *Azotobacter* en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	<i>Azotobacter</i> (10 ³ UFC g ⁻¹ suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [¶]	
1	2 706	1 194 a*	357 a	3.34
2	5 822	35 d	57 de	0.61
3	6 536	66 d	26 e	2.54
4	13 803	869 b	209 b	4.16
5	14 431	1 106 ab	131 c	8.44
6	15 923	218 cd	78 cde	2.79
7	23 313	889 b	95 cd	9.36
8	25 517	432 c	372 a	1.16
9	28 465	367 c	45 de	8.16
10	50 297	1 203 a	97 cd	12.40

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

†: Rizósfera. ¶: Suelo a distancia. §: Efecto rizósfera.

El efecto rizosférico fue mayor (12.40) en el tratamiento 10 con dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, mientras que el menor efecto rizosférico fue de 0.61 en el tratamiento 2 con 5 822 mg kg⁻¹ de HTPI, siendo estos efectos muy heterogéneos respecto a las dosis expuestas, evidenciando que no hay efecto negativo de acuerdo con las concentraciones de petróleo intemperizado presente en el suelo.

6.1.5.2. Densidad de *Rhizobium*

La densidad de bacterias fijadoras de Nitrógeno de asociación simbiótica *Rhizobium* presentó diferencias estadísticas significativas en los diez tratamientos con dosis de hidrocarburos del petróleo intemperizado en suelo y rizósfera (Apéndice, Cuadro 8).

Las poblaciones microbianas más altas se encontraron en los nódulos formados en el tratamiento 7 con dosis de 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI registrando un valor de 9 533 x 10³ UFC g⁻¹ nódulo (Cuadro 15). Los nueve tratamientos restantes fueron estadísticamente iguales, pero los tratamientos 2, 9 y 10 (5 822, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI) fueron aritméticamente los menores, ya que no hubo nodulación en estos tratamientos. Vargas *et al.* (2004) mencionan que los suelos contaminados con hidrocarburos contienen más microorganismos que los suelos no contaminados, pero su diversidad microbiana es más reducida.

Cuadro 15. Densidad de *Rhizobium* en nódulos con hidrocarburos del petróleo intemperizado en *Vigna unguiculata* al día 30.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Densidad de <i>Rhizobium</i> (10 ³) (UFC g ⁻¹ nódulo)
1	2 706	857 b*
2	5 822	0 b
3	6 536	77 b
4	13 803	4 b
5	14 431	41 b
6	15 923	51 b
7	23 313	9 533 a
8	25 517	104 b
9	28 465	0 b
10	50 297	0 b

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

Kirk *et al.* (2002) mencionan que las leguminosas normalmente tienen un sistema

radical poco ramificado pero profundo, lo que les permite actuar sobre los contaminantes del suelo en las capas más profundas. La simbiosis con *Rhizobium* las libera de la necesidad de absorber N, lo que las hace más competitivas en suelos con baja fertilidad, ya que la contaminación del suelo por hidrocarburos afecta la disponibilidad del N.

6.1.6. Actividad enzimática en suelo con petróleo intemperizado

La actividad enzimática de la ureasa en suelo presentó diferencias estadísticas significativas, por efecto de los contenidos de HTPI (Apéndice, Cuadro 9). La mayor actividad de esta enzima se presentó en los suelos con dosis de 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (Cuadro 16).

Cuadro 16. Actividad enzimática de la ureasa en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 30.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Ureasa $\left(\frac{\mu\text{moles N-NH}_3}{\text{g-h}}\right)$
1	2 706	18.491 bc*
2	5 822	10.697 cd
3	6 536	14.863 cd
4	13 803	11.510 cd
5	14 431	18.917 bc
6	15 923	12.286 cd
7	23 313	9.759 d
8	25 517	23.600 b
9	28 465	33.527 a
10	50 297	34.005 a

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

Estos suelos fueron colectados al este y noreste respectivamente de la presa de quema y del pozo La Venta, Tabasco 331 taponado, lo cual indica que el contenido de hidrocarburos del petróleo intemperizado no afecta la actividad de la ureasa en el

suelo, por el contrario estimula su aumento. Estos resultados no coinciden con lo que mencionan Tabatabai y Bremner (1972), quienes indican que la ureasa es una de las enzimas básicas en estudios de calidad, fertilidad y en la evolución del impacto de contaminantes en el suelo, ya que no se observó un impacto negativo en el contenido de hidrocarburos en el suelo.

6.1.7. Relación de variables

La correlación estadística de altura (AP), biomasa foliar (BF), biomasa radical (BR), biomasa de nódulos (BNOD), biomasa total (BT) y número de nódulos (NNOD) de *Vigna unguiculata* a los 30 días, con las densidades microbianas de BFN, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, así como los contenidos de HTPI y actividad enzimática se observan en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Correlación entre variables de crecimiento y actividad microbiana en *Vigna unguiculata* a los 30 días de exposición al petróleo intemperizado.

	BF	BR	BNOD	BT	NNOD	BFN	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Rhizobium</i>	Ureasa	HTPI
AP	.945**	.599**	.560**	.926**	.663**	.743**	.759**	.660**	.354	-.112	-.171
BF		.652**	.609**	.985**	.733**	.722**	.830**	.699**	.370 [†]	-.058	-.131
BR			.124	.773**	.195	.396 [†]	.910**	.688**	.157	.413**	.538**
BNOD				.554**	.963**	.678**	.379 [†]	.541**	.015	-.126	-.456**
BT					.670**	.700**	.903**	.748**	.336 [†]	.050	.010
NNOD						.745**	.463**	.611**	.102	-.172	-.442**
BFN							.610**	.721**	-.166	.055	-.196
<i>Azospirillum</i>								.838**	.241	.317 [†]	.357 [†]
<i>Azotobacter</i>									.210	.250	.310
<i>Rhizobium</i>										-.334*	.089
Ureasa											.676**

** Correlación altamente significativa (p<0.01)

[†] Correlación significativa (p<0.05)

Las variables de crecimiento y los microorganismos presentan una relación positiva, mientras que las variables altura y biomasa foliar presentaron relación negativa al contenido de HTPI. La biomasa de nódulos fue la variable más sensible al contenido de hidrocarburos, presentando una relación negativa significativa. Al respecto, Rivera-Cruz y Trujillo-Narcía (2004) encontraron una relación inversa de la biomasa vegetal con los

contenidos de petróleo intemperizado. Donde se pudo observar un efecto positivo pero no significativo fue entre la biomasa de nódulos y el número de nódulos con *Rhizobium*.

Se observó una tendencia irregular ente la relación de las variables de crecimiento con actividad enzimática, ya que en la mayoría se observan efectos negativos, siendo la ureasa la variable que se relaciona positivamente de forma altamente significativa con los contenidos de hidrocarburos de petróleo intemperizado en el suelo.

6.1.8. Índices de toxicidad en suelo con petróleo intemperizado

6.1.8.1. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en *Vigna unguiculata*

Los valores relativos del índice de impacto fitotóxico (Cuadro 18) presentan diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con diferentes dosis de hidrocarburos de petróleo intemperizado (Apéndice, Cuadro 10). Se calcularon índices de crecimiento en planta como emergencia, altura, biomasa foliar, biomasa radical, biomasa de nódulos, biomasa total, número de nódulos y viabilidad de nódulos.

Cuadro 18. Índices relativos de impacto fitotóxico (IRIF) para el crecimiento de *Vigna unguiculata* al día 30.

HTPI (mg kg ⁻¹)	Emergencia	Altura	Biomasa				Número de nódulos	Viabilidad de nódulos
			Foliar	Radical	Nódulos	Total		
5 822	0.015 g*	0.497 d	0.843 e	0.920 a	1.000 a	0.859 e	1.000 a	1.000 a
6 536	0.289 b	0.513 c	0.948 b	0.899 c	0.817 e	0.937 b	0.933 b	1.000 a
13 803	0.048 f	0.331 h	0.614 g	0.648 g	0.856 c	0.626 g	0.701 e	-0.911 e
14 431	0.125 e	0.496 e	0.772 f	0.853 d	0.173 g	0.766 f	0.270 g	0.602 b
15 923	0.152 d	0.638 a	0.966 a	0.915 b	0.863 b	0.955 a	0.894 d	1.000 a
23 313	-0.024 h	0.260 i	0.430 i	0.373 h	0.787 f	0.432 i	0.700 f	-0.407 d
25 517	0.318 a	0.487 f	0.924 c	0.848 e	0.822 d	0.910 c	0.896 c	-0.164 c
28 465	-0.104 i	0.567 b	0.884 d	0.798 f	1.000 a	0.874 d	1.000 a	1.000 a
50 297	0.185 c	0.383 g	0.614 h	-0.593 i	1.000 a	0.448 h	1.000 a	1.000 a

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRF mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRF menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

Las ocho variables permiten indicar el efecto de las diferentes dosis de petróleo intemperizado, sin observarse una tendencia convencional de dosis-respuesta, ya que en algunas variables se presentaron valores de IRIF que estimularon el crecimiento de la planta, como emergencia, biomasa radical y viabilidad de nódulos.

Los IRIF obtenidos en emergencia no reflejaron efectos muy tóxicos, ya que en las concentraciones con 23 313 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI los valores fueron menores a cero, lo que indica que éstas dosis de petróleo intemperizado estimulan el crecimiento de *Vigna unguiculata*, mientras que los tratamientos restantes oscilan entre 0.01 y 0.32, los cuales no llegan a LD₅₀, pero si pueden representar un efecto dañino en el crecimiento de *Vigna unguiculata*.

Los valores de altura en fase de plántula de los tratamientos que presentaron mayor toxicidad (0.513, 0.638, 0.567) fueron las dosis de 6 536, 15 923 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI, ya que presentaron valores por encima de LD₅₀. Wang y Bartha (1990) y Marwood *et al.* (1998) reportaron una reducción en la tasa de germinación de semillas de soja 14 semanas después de un derrame de combustible para calefacción y también se encontró un aumento de la toxicidad en un suelo biorremediado, sobre la germinación de semillas y la emergencia de las plántulas.

En los valores de biomasa se observa una alta sensibilidad a los contenidos de hidrocarburos, presentándose en la biomasa de nódulos el mayor efecto negativo, donde las dosis de 5 822, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI llegaron a valores de uno. En la biomasa total los valores más altos de toxicidad relativa (0.937, 0.955 y 0.910) se encontraron en dosis de 6 536, 15 923 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI, los cuales representan toxicidades que sobrepasan la LD₅₀, mientras que los valores más bajos (0.432 y 0.448) y que representan menos del 50% de toxicidad se registraron en dosis de 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI.

En el número de nódulos hubo efecto negativo en todos los tratamientos, en donde el menor efecto se vio reflejado en la dosis de 14 431 mg kg⁻¹ de HTPI, mientras que los valores más tóxicos se presentaron en dosis de 5 822, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, observando una tendencia poco convencional de dosis-respuesta, pero es evidente que el contenido de petróleo intemperizado provoca daños en la producción de nódulos. La FAO (1995) menciona que el peso de los nódulos de una planta está directamente relacionado a la actividad de fijación de nitrógeno, el número de nódulos, por su parte, es una indicación de las condiciones de la raíz para la infección por rizobios.

La viabilidad de nódulos presentó alta variación entre los tratamientos, ya que en dosis como 13 803, 23 313 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI los valores de IRIF fueron menores a cero (-0.911, -0.407 y -0.164) lo cual indica una estimulación en el crecimiento de *Vigna unguiculata*. Los tratamientos restantes se vieron afectados, ya que llegaron a valores de 1 (100% efecto negativo por toxicidad).

6.1.8.2. Índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (IRITBL)

Los valores relativos del índice de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con diferentes dosis de HTPI (Apéndice, Cuadro 11). Los IRITBL evidenciaron efectos negativos en los tres géneros bacterianos, para las BFN totales los valores más altos de toxicidad (0.937, 0.961 y 0.966) se encontraron en las dosis de 5 822, 6 536 y 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI provocando un efecto negativo en aproximadamente el 100% de la población de BFN totales, mientras que para la dosis de 13 803 mg kg⁻¹ de HTPI se reportó el valor más bajo de toxicidad (0.298), el cual no sobrepasa la LD₅₀, pero evidenciando una tendencia negativa de dosis-respuesta (Cuadro 19).

En los IRITBL de *Azospirillum* se reportaron los mayores valores de toxicidad (0.909, 0.948 y 0.961) en las dosis de 5 822, 6 536 y 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI. En *Azotobacter* los índices relativos de toxicidad más altos (0.969 y 0.944) se registraron en las dosis

de 5 822 y 6 536 mg kg⁻¹ de HTPI. En el tratamiento con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI se registraron valores menores a cero en *Azospirillum* y *Azotobacter* (-0.016 y -0.056) (Cuadro 19), lo que indica que a esta concentración de petróleo intemperizado se estimula en desarrollo de estas bacterias en la fase de plántula de *Vigna unguiculata*.

Cuadro 19. Índices relativos de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en la rizosfera de suelos contaminados con petróleo intemperizado a los 30 días.

HTPI (mg kg ⁻¹)	IRITBL		
	BFN totales	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
5 822	0.937 c*	0.909 c	0.969 a
6 536	0.961 b	0.948 b	0.944 b
13 803	0.298 i	0.627 g	0.249 f
14 431	0.512 h	0.675 f	0.046 h
15 923	0.966 a	0.961 a	0.807 c
23 313	0.894 d	0.402 h	0.216 g
25 517	0.734 f	0.887 d	0.630 e
28 465	0.824 e	0.747 e	0.680 d
50 297	0.657 g	-0.016 i	-0.056 i

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRT mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRT menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

Pérez *et al.* (2008), reportaron que la adición de hidrocarburos al suelo provoca una disminución en el número de unidades formadoras de colonias (UFC), evidenciando la toxicidad del queroseno para los microorganismos en el suelo, siendo los resultados obtenidos de IRITBL (Cuadro 19) perjudiciales en el número de UFC al haber presencia de petróleo intemperizado.

6.1.8.3. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en *Vigna unguiculata*

De acuerdo con los índices relativos de impacto fitotóxico (IRIF) (Cuadro 19), se observa que los índices totales de impacto fitotóxico (ITIF) son variables entre los tratamientos evaluados, donde todos son mayores a cero (Figura 22), lo cual indica que el contenido de hidrocarburos totales del petróleo intemperizado afectan las variables emergencia, altura, biomasa y nodulación.

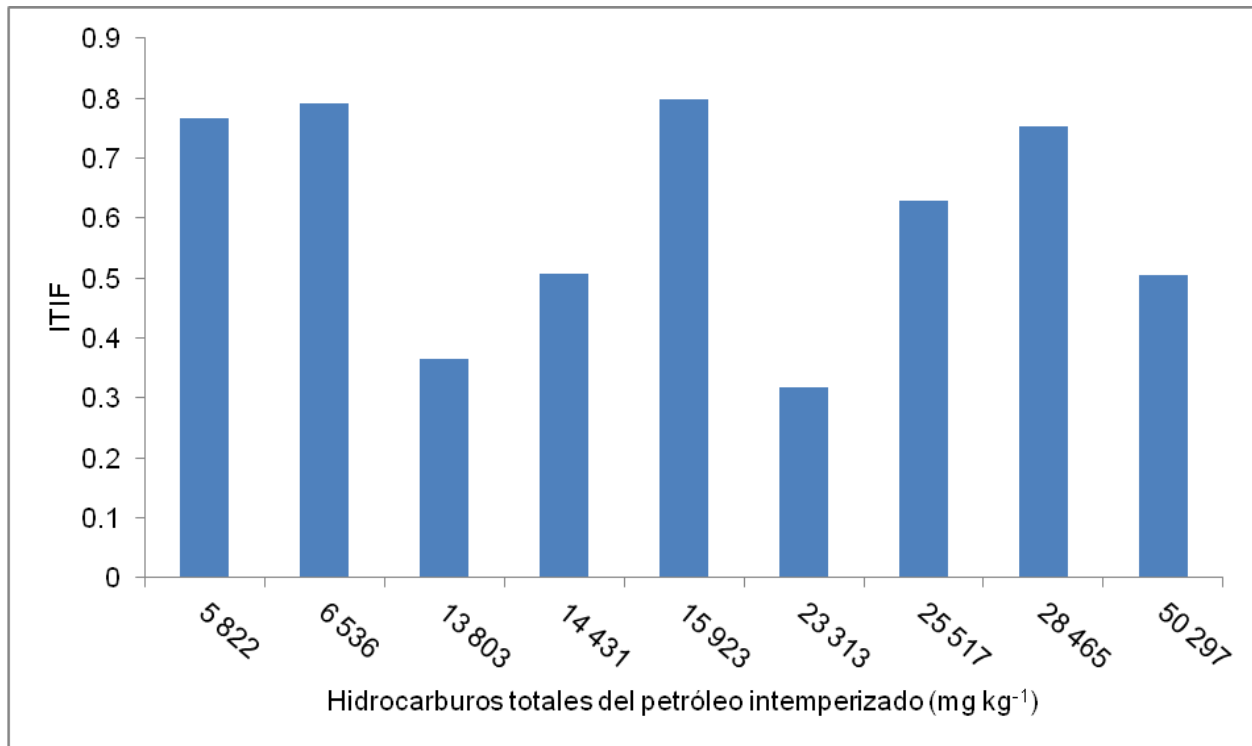


Figura 22. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en el crecimiento de plántulas de frijol pelón (*Vigna unguiculata*).

Estos resultados concuerdan con Vázquez (2006), para algunos tratamientos, ya que indica que a mayor concentración de petróleo incrementa el índice absoluto de fitotoxicidad (IAF) en leguminosas, y en este estudio los valores más altos de fitotoxicidad se presentaron en las dosis de 6 536 mg kg⁻¹ y 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI con 0.79 y 0.80, evidenciando una tendencia poco convencional en los efectos de dosis-respuesta, pero siendo el petróleo intemperizado el factor que provoca toxicidad en el crecimiento de *Vigna unguiculata*.

6.1.8.4. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (ITITBL)

Las bacterias evidenciaron efectos tóxicos en todos los tratamientos (Figura 23), pero no se observó una tendencia marcada entre las dosis, ya que los tratamientos con 5 822 mg kg⁻¹ y 6 536 mg kg⁻¹ de HTPI presentaron los valores más altos de toxicidad, con 0.94 y 0.95, respectivamente, mientras que el tratamiento con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI presentó el valor más bajo de toxicidad con 0.20. Freedman (1989) menciona que algunos microorganismos pueden incrementar su población en presencia de hidrocarburos.

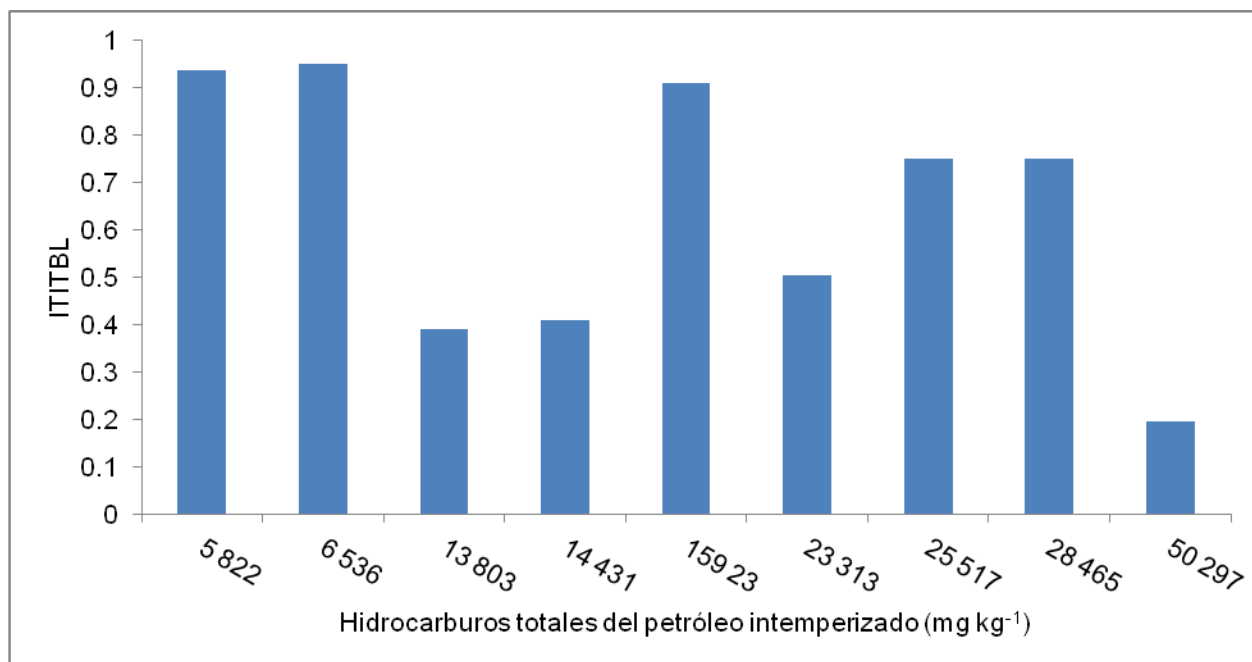


Figura 23. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (ITITBL) en la fase de plántula (30 días).

6.1.8.5. Índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS)

En *Rhizobium*, el índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos con diferentes dosis

de HTPI (Apéndice, Cuadro 12). Su respuesta a la toxicidad fue muy alta (Cuadro 20) en nueve de los diez tratamientos, siendo las dosis de 5 822, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI las que provocaron un 100% de toxicidad, mientras que en las dosis de 6 536, 13 803, 14 431, 15 923 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI se sobrepasó la LD₅₀ mostrando efectos entre el 80 y 99% de la población.

Cuadro 20. Índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e índice de impacto tóxico en suelo (IITS) con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 30 días.

HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	IITBS <i>Rhizobium</i>	IITS Ureasa
5 822	1.000 a*	0.419 b
6 536	0.910 e	0.195 e
13 803	0.996 b	0.370 c
14 431	0.952 c	-0.025 f
15 923	0.940 d	0.332 d
23 313	-10.067 g	0.462 a
25 517	0.877 f	-0.288 g
28 465	1.000 a	-0.797 h
50 297	1.000 a	-0.844 i

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRT mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRT menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

En la dosis de 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI se registró un valor menor a cero (-10.067), indicando estimulación en el crecimiento de *Vigna unguiculata*. Estudios realizados por Rivera-Cruz *et al.* (2005) demostraron que la presencia de hidrocarburos de petróleo en el suelo inhibe el desarrollo de leguminosas, por lo que no existe nodulación y no hay desarrollo de *Rhizobium*, siendo indicadores más sensibles para medir el impacto toxicológico en el suelo.

La toxicidad en la actividad enzimática de la ureasa (IITS) mostró diferencias estadísticas significativas en dosis de HTPI (Apéndice, Cuadro 13), donde no hubo reducción en la actividad de la ureasa al aumentar el contenido de hidrocarburos en el suelo (Cuadro 20), sin embargo, pudo relacionarse con el pH presente en el suelo, ya que Hoffman y Schmidt (1953) mencionaron que el pH óptimo para la actividad enzimática de la ureasa oscila entre 6 y 7, siendo las dosis de 5 822, 13 803 y 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI las que registraron valores de pH menores a 6 y evidenciaron mayores efectos tóxicos.

6.2. Efecto de nueve concentraciones de petróleo intemperizado en el suelo sobre el crecimiento de la planta de frijol pelón

6.2.1. Respuesta en crecimiento de frijol pelón (estado de planta) en nueve concentraciones de petróleo intemperizado

La altura de las plantas de *Vigna unguiculata* se midieron cada 15 días comenzando a los 45 días y terminando a los 120 días, encontrando diferencias estadísticas significativas en cada uno de los períodos evaluados, por efecto de dosis de HTPI en los tratamientos (Apéndice, Cuadro 14) (Figura 24).

En el día 45 la mayor altura se registró en el suelo testigo con 47.83 cm (Figura 24). La dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI que es la mayor de los tratamientos evaluados afectó en un 16.22% la altura de la planta respecto a los demás tratamientos. Las dosis de 5 822, 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI ocasionaron las mayores disminuciones en la altura de las plantas de *Vigna unguiculata*, afectándola en un 48.30, 58.88, 49.76, 56.78, 63.98, 53.79 y 61.47% respectivamente, estadísticamente son iguales pero aritméticamente la dosis de 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI fue la que ocasionó mayor reducción en la altura de planta (Figura 24).

Al día 60 las mayores alturas se registraron en los suelos testigo (90.63 cm) y con 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (63.40 y 69.20 cm), las cuales fueron dosis que representaron un 30.05 y 23.65% menor altura respecto al suelo testigo. Los siete

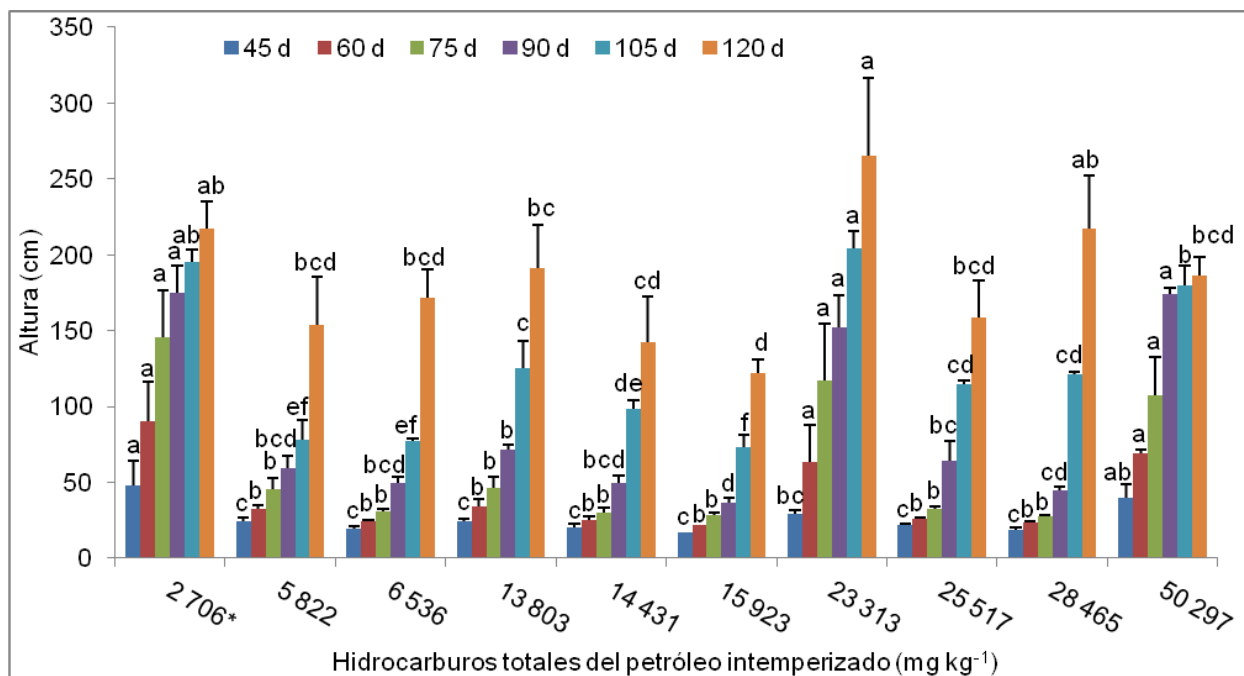
tratamientos restantes fueron estadísticamente iguales, siendo la dosis de 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI la menor aritméticamente y afectando en un 75.99% el crecimiento de la planta.

A los 75 días los valores más grandes de altura se encontraron tanto en el suelo testigo (145.33 cm) como en las dosis de 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (117.10 y 107.57 cm), las cuales solo fueron 19.42 y 25.98% menores respecto al suelo testigo, respectivamente. Las dosis de 5 822, 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI fueron las menores y estadísticamente iguales, siendo la dosis de 28 465 mg kg⁻¹ la menor aritméticamente (27.57 cm) afectando en un 81.03% la altura de *Vigna unguiculata*.

En el día 90 las mayores alturas se encontraron en los suelos testigo (2 706 mg kg⁻¹ HTP biogénico) y con dosis de 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, con valores de 175, 152.33 y 174 cm, respectivamente, siendo solo 12.95 y 0.57% menores que el suelo testigo. El menor valor de altura se registró en la dosis con 15 923 mg kg⁻¹ de HTP (36.20 cm), provocando un efecto negativo del 79.31%.

A los 105 días se presentó una variación en los valores de altura, siendo la mayor (204 cm) registrada en el suelo con 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI, la cual fue 4.44% mayor que la altura del suelo testigo (195.33 cm). El menor valor se encontró en el suelo con 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI, el cual fue 62.46% menor respecto al tratamiento testigo.

Finalmente, al día 120, la mayor altura registrada nuevamente fue en el tratamiento con 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI con 265.33 cm, siendo 22.09% mayor que en el suelo testigo (217.33 cm), seguido de la dosis con 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI que registró una altura de 217 cm. La menor altura se presentó en el suelo con 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI (122 cm) provocando daños en la altura de la planta en un 43.86% respecto al suelo testigo.



Medias con la misma letra dentro de cada tiempo no tienen diferencias significativas (Tukey, $p \leq 0.05$)

*Tratamiento testigo

Figura 24. Variación de la altura a través del tiempo en plantas de *Vigna unguiculata* en suelos con diferentes concentraciones de petróleo intemperizado hasta los 120 días.

En los seis períodos evaluados la mayor altura de la planta de frijol pelón se registró en el suelo testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTP biogénico) y en los tratamientos con 23 313, 28 465 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, siendo una tendencia irregular, resultados que difieren a lo reportado por Chaîneau *et al.* (1997), quienes explican que la inhibición del crecimiento de las plantas muestra relación directa al aumentar la concentración de hidrocarburos.

Pérez *et al.* (2002) indican que los hidrocarburos afectan las propiedades físicas del suelo, donde las partículas del suelo se aglutinan formando estructuras más gruesas que cubren la superficie de las partículas y el espacio poroso, por lo que se afecta la aireación del suelo y se disminuye la retención de agua porque la estructura gruesa que cubre las partículas es hidrófoba, razón por la cual las plantas pueden sufrir estrés hídrico.

6.2.2. Diámetro basal de *Vigna unguiculata*

El diámetro de tallo de *Vigna unguiculata* a los 120 días presentó diferencias estadísticas significativas (Apéndice, Cuadro 15) en los diez tratamientos evaluados, siendo el mayor valor (0.38 mm) el registrado en el suelo testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTPI), mientras que el menor valor (0.24 mm) se registró en el tratamiento con 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI; algunos tratamientos fueron estadísticamente iguales entre sí (Cuadro 21). Vázquez-Luna *et al.* (2010) mencionan que los tallos de *Crotalaria incana* a bajas concentraciones de petróleo crudo presentaron 20% más longitud-diámetro que en concentraciones mayores a 12 000 mg kg⁻¹ de HTP.

Cuadro 21. Diámetro de tallos en *Vigna unguiculata* a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Diámetro basal (mm)
1	2 706	0.38 a*
2	5 822	0.35 ab
3	6 536	0.29 bcde
4	13 803	0.28 bcde
5	14 431	0.33 abcd
6	15 923	0.24 e
7	23 313	0.28 cde
8	25 517	0.26 de
9	28 465	0.30 bcde
10	50 297	0.33 abc

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

6.2.3. Biomasa seca en plantas de frijol pelón

Se obtuvieron diferencias estadísticas significativas en los valores de biomasa foliar, radical, de nódulos y total en plantas de frijol pelón (Apéndice, Cuadro 16) a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado (Cuadro 22). Los valores más altos de

biomasa seca se registraron en las plantas que crecieron en el tratamiento testigo (2 706 mg kg⁻¹ HTP biogénico), resultados que coinciden con los encontrados por Vázquez (2006) donde las plantas de *Leucaena leucocephala* registraron mayor valor de biomasa seca aérea y radical en suelo sin petróleo. Sin embargo, la tendencia no es homogénea ya que a valores de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI mostró el segundo lugar en biomasa seca total.

Cuadro 22. Biomasa seca en *Vigna unguiculata* a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Biomasa (g)			
		Foliar	Radical	Nódulos	Total
1	2 706	24.80 a*	4.38 a	1.22 a	30.40 a
2	5 822	12.23 cd	2.89 b	0.63 b	15.75 c
3	6 536	6.10 f	1.20 c	0.08 e	7.38 e
4	13 803	7.00 ef	1.74 c	0.14 de	8.88 de
5	14 431	6.03 f	1.59 c	0.40 c	8.02 e
6	15 923	7.03 ef	1.78 c	0.16 de	8.97 de
7	23 313	13.55 c	3.28 b	0.33 c	17.16 c
8	25 517	6.07 f	1.37 c	0.09 e	7.53 e
9	28 465	9.50 de	1.96 c	0.14 de	11.60 d
10	50 297	20.50 b	3.05 b	0.20 d	23.75 b

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

En la biomasa foliar los menores valores se registraron en las dosis de 6 536, 14 431 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI, siendo estadísticamente iguales; la dosis de 14 431 mg kg⁻¹ de HTPI fue la menor aritméticamente, ya que presentó un efecto negativo en un 75.69% respecto al suelo testigo.

Los menores valores de biomasa radical se encontraron en las dosis de 6 536, 13 803, 14 431, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI, donde la dosis con 6 536 fue 72.60% menor respecto al suelo testigo. En la biomasa de nódulos, las dosis de 6 536 y 25 517

mg kg⁻¹ de HTPI fueron las menores estadísticamente (0.08 y 0.09 g), provocando un efecto negativo en un 93.44 y 92.62%, respectivamente, de acuerdo al suelo testigo.

La biomasa total fue mayor en el suelo testigo (30.39 g), siendo el tratamiento con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI el que provocó menor efecto tóxico en esta variable respecto a los demás tratamientos con dosis menores de petróleo intemperizado, el cual fue 21.85% menor al tratamiento testigo. Los valores más bajos de biomasa total se registraron en dosis de 6 536, 14 431 y 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI, siendo las dosis de mayor efecto tóxico para *Vigna unguiculata*, porque redujeron la biomasa seca total en 75.72, 73.61 y 75.22% respecto al suelo testigo. Sin embargo, hay tendencias irregulares entre las dosis de hidrocarburos del petróleo intemperizado en cuanto a la producción de biomasa seca.

Adams *et al.* (2008) mencionan que el incremento en la concentración de hidrocarburos está directamente relacionado con la reducción en la capacidad de campo, la cual disminuye la producción de biomasa vegetal, y ocurre en concentraciones mayores de 6 000 mg kg⁻¹, sin embargo, los datos obtenidos muestran una tendencia heterogénea entre dosis y producción de biomasa seca total, pero evidenciando un efecto negativo en contenidos de HTPI.

6.2.4. Número de nódulos en *Vigna unguiculata* con dosis crecientes de HTPI

Las plantas de frijol pelón formaron nódulos en todos los tratamientos y presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado (Apéndice, Cuadro 17), siendo el tratamiento testigo (2 706 mg kg⁻¹) el que presentó el mayor número de nódulos (766), además de ser los de mayor tamaño en comparación con los demás tratamientos (Cuadro 23).

Las dosis de 6 536, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI fueron estadísticamente iguales al presentar el menor número de nódulos (58, 46, 29 y 43, respectivamente), provocando un efecto tóxico del 92.43, 93.99, 96.21 y 94.39% en relación al suelo

testigo. Por su parte, estudios realizados por Rivera-Cruz *et al.* (2005) demostraron que la planta guaje (*Leucaena* sp.) es la más tolerante a la exposición de hidrocarburos, formando nódulos en concentraciones de 79 457 mg kg⁻¹ de HTP intemperizado, mientras que *Vigna unguiculata* mostró alta tolerancia a concentraciones de 23 313 y 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI.

Wetzel y Werner (1995) mencionan que los hidrocarburos aromáticos policíclicos reducen la nodulación antes de que ocurran daños visibles en la planta.

Cuadro 23. Número y viabilidad de nódulos en planta de *Vigna unguiculata* con dosis crecientes de HTPI a los 120 días.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Número de nódulos	Viabilidad de nódulos (%)
1	2 706	766 a*	32.83 de
2	5 822	175 c	54.36 bc
3	6 536	58 d	63.05 ab
4	13 803	152 c	16.30 e
5	14 431	192 c	43.68 cd
6	15 923	46 d	25.34 de
7	23 313	304 b	22.71 e
8	25 517	29 d	75.72 a
9	28 465	43 d	68.61 ab
10	50 297	212 c	52.56 bc

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

La viabilidad de nódulos desarrollados en planta fue mayor en el tratamiento con 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI (Cuadro 23), por lo que se observó una alta heterogeneidad entre los tratamientos. El tratamiento testigo presentó una viabilidad baja a pesar de haber sido el tratamiento con el mayor número de nódulos. No hubo relación directa entre la viabilidad de nódulos y las concentraciones de hidrocarburos del petróleo intemperizado.

La FAO (1995) indica que los nódulos se forman en la parte aireada del suelo, por lo que el anegamiento detiene la fijación y causa degeneración; la presencia de leghemoglobina fue afectada por la concentración de hidrocarburos en algunos tratamientos, ya que no se observó el color rojizo en los nódulos, sino de coloración blanca lo que indicaría que son inactivos (CIAT, 1988), por la ausencia de iones de hierro (Fe), el cual es necesario para la síntesis de hemoproteína.

El hierro (Fe) es un constituyente de la Leg-hemoglobina, y al haber una deficiencia de éste, no hay fijación de nitrógeno en cantidades suficientes y la planta comenzará a mostrar signos de la carencia (González, 2003), por lo que el número de nódulos y viabilidad de nódulos en *Vigna unguiculata* fue heterogénea a las dosis de HTPI presentes en el suelo.

6.2.5. Bacterias en rizosfera y suelo con petróleo intemperizado cultivado con *Vigna unguiculata*

6.2.5.1. Densidad de bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre

Las BFN totales en la fase de planta presentaron diferencias estadísticas significativas en suelo y rizosfera de los diez tratamientos evaluados (Apéndice, Cuadro 18), en la rizosfera el tratamiento testigo presentó la mayor población microbiana (Cuadro 24), mientras que para suelo el valor más alto se registró en el tratamiento con 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI.

Los resultados obtenidos en rizosfera y suelo a distancia pueden explicarse con lo reportado por Freedman (1989), que menciona que algunos microorganismos pueden incrementar su población en presencia de hidrocarburos.

La rizosfera tuvo mayor densidad de BFN totales en el suelo testigo ($7\ 113 \times 10^3$ UFC g⁻¹ s.r.), seguida del tratamiento 10 con dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI ($4\ 816 \times 10^3$ UFC g⁻¹ s.r.). La menor densidad fue encontrada en el tratamiento 2 con 5 822 mg kg⁻¹ de HTPI ($2\ 082 \times 10^3$ UFC g⁻¹ s.r.). En el suelo a distancia la mayor densidad de BFN se

encontró en la dosis con 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI (3 636 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.) que corresponde al tratamiento 9, mientras que la menor densidad fue registrada en el tratamiento 10 con dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (425 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.). Estos resultados muestran una tendencia no convencional en dosis-respuesta, pero se observa un efecto negativo de dosis de petróleo intemperizado al haber reducción de poblaciones de BFN totales.

Cuadro 24. Densidad de bacterias fijadoras de N de vida libre totales en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	BFN totales (10 ³ UFC g ⁻¹ suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [¶]	
1	2 706	7 113 a*	2 515 bc	2.83
2	5 822	2 082 f	1 721 cd	1.21
3	6 536	2 620 ef	1 086 de	2.41
4	13 803	3 658 bcde	1 495 d	2.45
5	14 431	4 129 bcd	1 727 cd	2.39
6	15 923	3 224 cdef	2 678 b	1.20
7	23 313	3 724 bcde	1 554 d	2.40
8	25 517	2 903 def	2 515 bc	1.15
9	28 465	4 492 bc	3 636 a	1.24
10	50 297	4 816 b	425 e	11.33

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

†: Rizósfera. ¶: Suelo a distancia. §: Efecto rizósfera.

El efecto rizosfera más alto (11.33) se encontró en el tratamiento 10 con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (Cuadro 24), mientras que los menores efectos rizosféricos corresponden a los tratamientos 2, 6, 8 y 9 (5 822, 15 923, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI), con valores de 1.21, 1.20, 1.15 y 1.24, respectivamente. González (2003) menciona que la rizosfera es una zona donde se concentra una alta actividad bacteriana, donde el número de bacterias es mayor que en el suelo sin raíces, debido a que la raíz genera una serie de sustancias nutritivas como azúcares, aminoácidos, vitaminas, etc.

6.2.5.1.1. Densidad de bacterias del género *Azospirillum* en suelo y rizosfera de *Vigna unguiculata*

Las medias en las densidades de *Azospirillum* presentaron diferencias estadísticas significativas en los diez tratamientos evaluados en rizosfera y suelo a distancia, con y sin hidrocarburos del petróleo intemperizado (Cuadro 25) por efecto de dosis de HTPI (Apéndice, Cuadro 19).

En rizosfera de la planta de *Vigna unguiculata* la densidad más alta se presentó en el tratamiento 1, perteneciente al suelo testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTP biogénico) con 6 327 x 10³ UFC g⁻¹ s.r., mientras que el tratamiento 4 con dosis de 13 803 mg kg⁻¹ de HTPI se registró una densidad de 895 x 10³ UFC g⁻¹ s.r. Para suelo a distancia las mayores densidades de *Azospirillum* se encontraron en los tratamientos 1, 6 y 9 (2 706, 15 923 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI) con 3 824, 3 563 y 3799 x 10³ UFC g⁻¹ s.s., respectivamente; y la menor densidad se registró en el tratamiento 10 (50 297 mg kg⁻¹ de HTPI) con 555 x 10³ UFC g⁻¹ s.s.

Estos valores de *Azospirillum* fueron heterogéneos en relación a la dosis de hidrocarburos de petróleo intemperizado, pero tanto en rizosfera como en suelo a distancia hubo efecto negativo del petróleo en el crecimiento de densidades bacterianas. Álvarez-Solís y León-Martínez (1997) mencionan que la actividad microbiana es regulada por las características físicas y químicas del suelo, por la composición de los materiales orgánicos y por la naturaleza de la comunidad microbiana.

González (2003) menciona que la relación de *Azospirillum* como bacteria promotora del crecimiento (BPC) no solo se encuentra determinado a la fijación de nitrógeno sino también por ser un fuerte estimulador del crecimiento en las plantas debido a su capacidad de producir giberelinas (fitohormona usada en la planta para el crecimiento).

Cuadro 25. Densidad del grupo de bacterias del género *Azospirillum* en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 120 días.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	<i>Azospirillum</i> (10 ³ UFC g ⁻¹ suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [¶]	
1	2 706	6 327 a*	3 824 a	1.65
2	5 822	3 071 cd	3 169 ab	0.97
3	6 536	2 263 de	1 074 de	2.11
4	13 803	895 f	1 656 cd	0.54
5	14 431	4 309 b	3 191 ab	1.35
6	15 923	1 410 ef	3 563 a	0.40
7	23 313	3 466 bc	2 548 bc	1.36
8	25 517	4 223 bc	2 295 bc	1.84
9	28 465	4 619 b	3 799 a	1.22
10	50 297	3 690 bc	555 e	6.65

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

†: Rizósfera. ¶: Suelo a distancia. §: Efecto rizósfera.

El efecto rizosférico fue mayor en el tratamiento 10 (6.65) con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, mientras que los menores se registraron en los tratamientos 2 (0.97), 4 (0.54) y 6 (0.40) que tienen dosis de 5 822, 13 803 y 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI.

6.2.5.1.2. Densidad de bacterias del género *Azotobacter* en suelo y rizosfera de *Vigna unguiculata*

Las poblaciones de *Azotobacter* presentaron diferencias estadísticas significativas en rizosfera y suelo a distancia (Apéndice, Cuadro 20). La mayor densidad microbiana en rizosfera se registró en el suelo testigo (2 706 mg kg⁻¹ de HTP biogénico) que corresponde al tratamiento 1 (8 242 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.), mientras que la menor densidad se encontró en el tratamiento 2 con 5 822 mg kg⁻¹ de HTPI (1 896 x 10³ UFC g⁻¹ s.r.) (Cuadro 26), indicando que a estas concentraciones de hidrocarburos del petróleo intemperizado en suelo hay un descenso en la actividad microbiana.

Para suelo a distancia las poblaciones más elevadas se registraron en el tratamiento 1 (suelo testigo) con $3\,490 \times 10^3$ UFC g⁻¹ s.s., por su parte, la menor densidad de *Azotobacter* se encontró en el tratamiento 10, que contiene la dosis más alta de petróleo intemperizado (50 297 mg kg⁻¹ de HTPI) con 452×10^3 UFC g⁻¹ s.s.

Jasper (1994) mencionó que los hongos micorrízicos arbusculares, *Rhizobium*, *Azospirillum*, *Azotobacter* y *Frankia* son importantes componentes microbianos que disminuyen las limitaciones para el crecimiento de las plantas en suelos contaminados con elementos potencialmente tóxicos, por lo que el género *Azotobacter* tuvo crecimiento en diferentes concentraciones de petróleo intemperizado.

Cuadro 26. Densidad microbiana de *Azotobacter* en rizosfera y suelo con hidrocarburos del petróleo intemperizado a los 120 días.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	<i>Azotobacter</i> (10 ³ UFC g ⁻¹ suelo seco)		R/SD [§]
		R [†]	SD [¶]	
1	2 706	8 242 a*	3 490 a	2.36
2	5 822	1 896 e	2 563 bcd	0.74
3	6 536	3 137 bcd	825 fg	3.80
4	13 803	2 895 cde	1 738 de	1.67
5	14 431	4 249 b	2 435 cd	1.74
6	15 923	3 819 bc	2 742 abc	1.39
7	23 313	2 776 cde	1 344 ef	2.07
8	25 517	2 721 cde	2 826 abc	0.96
9	28 465	2 315 de	3 286 ab	0.70
10	50 297	3 579 bc	452 g	7.92

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

†: Rizósfera. ¶: Suelo a distancia. §: Efecto rizósfera.

En cuanto al efecto rizosférico, el mayor valor (7.92) se encontró en el tratamiento 10, con 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, lo que indicaría que esta bacteria crece bien en condiciones de contaminación ya que cambia según las condiciones ambientales

existentes según González (2003), donde una de las formas de sobrevivencia de *Azotobacter* en condiciones desfavorables es a través de la formación de quistes, lo que les confiere resistencia.

Se ha asociado también a *Azospirillum* una capacidad de biodegradación, sobre compuestos fenólicos existentes en el suelo, los cuales aumentarían su capacidad de fijación de nitrógeno en suelos agrícolas, pudiéndose sugerir que estos microorganismos pueden contribuir a la biotransformación de este tipo de residuos cuando se usen como fertilizantes (González, 2003).

Los valores más bajos en el efecto rizosférico (0.74, 0.96 y 0.70) se registraron en los tratamientos dos, ocho y nueve, con dosis de 5 822, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI, los cuales provocaron una disminución del 90.66, 88.88 y 91.16% respecto al suelo testigo.

6.2.5.2. Densidad de *Rhizobium* con dosis crecientes de HTPI

La densidad de bacterias fijadoras de nitrógeno de asociación simbiótica *Rhizobium* presentó diferencias estadísticas significativas en los diez tratamientos con diferentes dosis de hidrocarburos del petróleo intemperizado rizósfera y suelo a distancia (Apéndice, Cuadro 21).

La población más alta de *Rhizobium* se encontró en el tratamiento 10, con dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI (2 707 x 10³ UFC g⁻¹ nódulos) (Cuadro 27). En los tratamientos 1, 2, 4, 7, 8 y 9, con contenidos de 2 706, 5 822, 13 803, 23 313, 25 517 y 28 465 mg kg⁻¹ de HTPI respectivamente, se reportaron las densidades más bajas, siendo estadísticamente iguales, pero aritméticamente el tratamiento 1 (suelo testigo) registró el menor valor (3 x 10³ UFC g⁻¹ nódulos). Athar y Johnson (1997), que mencionan que las cepas de *Rhizobium* son muy sensibles a los factores abióticos del medio ambiente, como la salinidad, pH y la temperatura que afectan la fijación de N₂ y por lo tanto, la productividad de las leguminosas.

Cuadro 27. Densidad de *Rhizobium* en nódulos de *Vigna unguiculata* con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Densidad de <i>Rhizobium</i> (10 ³) (UFC g ⁻¹ nódulo)
1	2 706	3 e*
2	5 822	29 e
3	6 536	947 c
4	13 803	165 e
5	14 431	633 d
6	15 923	1603 b
7	23 313	199 e
8	25 517	4 e
9	28 465	65 e
10	50 297	2707 a

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

La contaminación del suelo con hidrocarburos afecta de manera negativa la simbiosis con *Rhizobium* al reducir las poblaciones de rizobios, el número y peso seco de nódulos en leguminosas como *Phaseolus vulgaris* (Hernández, 1997), sin embargo en esta investigación *Vigna unguiculata* no evidenció efectos negativos en las poblaciones de *Rhizobium* al ser expuesta a diferentes concentraciones de hidrocarburos totales del petróleo intemperizado, resultados que tampoco coinciden con lo que menciona Chaudhary *et al.* (2004) que algunas leguminosas cultivadas en suelos contaminados los rizobios aislados de nódulos de raíces y fueron completamente ineficaces para fijar N₂.

Los resultados obtenidos en *Vigna unguiculata* difieren a lo publicado por Figueira (2000), quien menciona que *Rhizobium* probablemente puede ser utilizado como una herramienta eficaz en los ensayos de ecotoxicidad, ya que estas bacterias son conocidas por ser sensibles a una amplia variedad de contaminantes y son muy importantes para la fertilidad del suelo en un amplio rango de ambientes.

6.2.6. Actividad enzimática en suelo con petróleo intemperizado

La actividad enzimática de la ureasa presentó diferencias estadísticas significativas por efecto de dosis de HTPI (Apéndice, Cuadro 22). La mayor actividad de esta enzima se presentó en el suelo con dosis de 25 517 mg kg⁻¹ de HTPI cuyo valor fue de 33.154 μmoles N-NH₃ g⁻¹ h⁻¹. En el cuadro 28 se observa que las mayores actividades enzimáticas se dieron en los tratamientos con dosis altas de hidrocarburos del petróleo intemperizado, en cambio, los suelos con dosis más bajas de HTPI presentaron las menores actividades enzimáticas, siendo algunos estadísticamente iguales. La menor actividad enzimática fue en el tratamiento 6 (15 923 mg kg⁻¹ de HTPI) con un valor de 5.217 μmoles N-NH₃ g⁻¹ h⁻¹.

Cuadro 28. Actividad enzimática de la ureasa en suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.

Tratamiento	HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	Ureasa ($\frac{\mu\text{moles N-NH}_3}{\text{g}\cdot\text{h}}$)
1	2 706	17.641 c
2	5 822	20.593 bc
3	6 536	17.240 c
4	13 803	22.845 bc
5	14 431	19.267 c
6	15 923	5.217 d
7	23 313	24.272 abc
8	25 517	33.154 a
9	28 465	29.426 ab
10	50 297	23.871 bc

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

Los resultados obtenidos no evidenciaron efectos negativos a la exposición de diferentes dosis de HTPI, no mostrando sensibilidad a la presencia de los contaminantes, respuesta que difiere a lo reportado por Martzadori *et al.* (2000) y

Brohon *et al.* (2001), quienes indicaron que la actividad de la enzima ureasa se ve afectada en presencia de contaminantes, como metales pesados.

6.2.7. Relación de variables

La relación de altura de la planta *Vigna unguiculata* (AP), biomasa foliar (BF), biomasa radical (BR), biomasa de nódulos (BNOD), biomasa total (BT) y número de nódulos (NNOD) a los 120 días con las densidades microbianas de BFN totales, *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Rhizobium*, actividad enzimática ureasa y contenidos de HTPI se observan en el Cuadro 29.

Las variables de crecimiento de planta presentaron relaciones positivas significativas (AP) y altamente significativas (BF, BR, BNOD, BT y NNOD) con las BFN totales, *Azospirillum* y *Azotobacter*.

Cuadro 29. Correlación entre variables de crecimiento y actividad microbiana en *Vigna unguiculata* a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado.

	BF	BR	BNOD	BT	NNOD	BFN	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>	<i>Rhizobium</i>	Ureasa	HTPI
AP	.429**	.462**	.191	.434**	.423**	.377	.291	.096	-.258	.304	.145
BF		.884**	.707**	.997**	.807**	.691**	.566**	.590**	.179	-.028	.163
BR			.754**	.917**	.837**	.598**	.470**	.530**	-.041	-.079	-.024
BNOD				.745**	.894**	.590**	.600**	.740**	-.315*	-.184	-.476**
BT					.836**	.691**	.569**	.604**	.132	-.043	.113
NNOD						.739**	.565**	.816**	-.189	-.135	-.290
BFN							.623**	.787**	.031	-.057	.088
<i>Azospirillum</i>								.479**	-.255	.307	.057
<i>Azotobacter</i>									.016	-.334*	-.297
<i>Rhizobium</i>										-.342*	.589**
Ureasa											.401*

** Correlación altamente significativa (p<0.01)

* Correlación significativa (p<0.05)

Las variables BF y BT presentaron relación positiva pero no significativa con la densidad de *Rhizobium*. Por el contrario, las variables AP, BR, BNOD y NNOD presentaron una correlación negativa, siendo BNOD una relación negativa significativa con *Rhizobium*.

Ureasa presenta únicamente relación positiva pero no significativa en las variables de crecimiento con AP (0.304). En las variables microbiológicas sólo se relaciona con *Azospirillum*, mientras que con *Azotobacter* y *Rhizobium* presenta una relación negativa significativa. Las variables más sensibles al contenido de HTPI en el crecimiento de *Vigna unguiculata* son BR, BNOD y NNOD, donde BNOD presenta un efecto negativo altamente significativo a las dosis de petróleo intemperizado (-0.476). *Azotobacter* presentó efectos negativos pero no significativos a los contenidos de HTPI. La ureasa se relaciona significativamente (0.401) a los contenidos de hidrocarburos de petróleo intemperizado.

6.2.8. Índices de toxicidad en suelo con petróleo intemperizado

6.2.8.1. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en crecimiento de *Vigna unguiculata*

Los valores relativos de impacto fitotóxico (Cuadro 30) presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado (Apéndice, Cuadro 23). Los índices de crecimiento evaluados en planta fueron altura, diámetro de tallo, biomasa foliar, biomasa radical, biomasa de nódulos, biomasa total, número y viabilidad de nódulos. Estas variables permiten indicar el efecto de las concentraciones de petróleo intemperizado, pero no se observa la tendencia convencional de dosis-respuesta, puesto que en variables como altura y viabilidad de nódulos se presentaron valores de IRIF que indican que las dosis de petróleo intemperizado en el suelo estimularon el crecimiento de la planta de *Vigna unguiculata*.

En la variable altura los valores de IRIF reflejaron efectos tóxicos en ocho tratamientos, mientras que el tratamiento con 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI estimuló el crecimiento de *Vigna unguiculata*. El diámetro de tallos se vio afectado en todos los tratamientos por las dosis de hidrocarburos en suelo. Pothuluri y Cerniglia (1994) mencionan que el petróleo produce daños en las plantas por el potencial tóxico de los hidrocarburos.

Cuadro 30. Índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) para el crecimiento de *Vigna unguiculata* a los 120 días.

HTPI (mg kg ⁻¹)	IRIF							
	Altura	Diámetro	Biomasa				Número de nódulos	Viabilidad de nódulos
			Foliar	Radical	Nódulos	Total		
5 822	0.281 c*	0.069 i	0.508 g	0.335 g	0.479 i	0.483 g	0.768 f	-0.688 e
6 536	0.204 e	0.244 e	0.753 c	0.726 a	0.931 a	0.757 a	0.923 d	-0.944 g
13 803	0.111 g	0.256 d	0.719 d	0.603 d	0.888 c	0.709 d	0.799 e	0.477 a
14 431	0.342 b	0.142 g	0.756 a	0.636 c	0.671 h	0.735 c	0.750 g	-0.386 d
15 923	0.436 a	0.360 a	0.713 e	0.593 e	0.872 e	0.703 e	0.939 c	0.213 c
23 313	-0.239 i	0.267 c	0.449 h	0.253 i	0.726 g	0.434 h	0.599 i	0.259 b
25 517	0.270 d	0.322 b	0.755 b	0.686 b	0.927 b	0.752 b	0.962 a	-1.360 i
28 465	0.006 h	0.215 f	0.614 f	0.549 f	0.881 d	0.616 f	0.943 b	-1.095 h
50 297	0.137 f	0.118 h	0.168 i	0.300 h	0.836 f	0.215 i	0.721 h	-0.719 f

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRF mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRF menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

En la biomasa seca se observaron efectos tóxicos en todos los tratamientos, llegando a presentar efectos negativos que sobrepasaron la LD₅₀. Rivera-Cruz *et al.* (2005) reportaron índices de fitotoxicidad en leguminosas que mostraron el efecto negativo del petróleo en el crecimiento y en la biomasa vegetal, indicando una tendencia inversamente proporcional al incrementar las concentraciones de petróleo, siendo la biomasa seca total en *Vigna unguiculata* la que presentó mayor efecto fitotóxico en dosis de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI, pero no hubo una tendencia de dosis-respuesta marcada en las diferentes dosis de HTPI.

El número de nódulos se vio fuertemente afectado por el contenido de hidrocarburos en el suelo, donde todos los tratamientos rebasaron la LD₅₀, por su parte, Vázquez (2006) reportó aumento de nódulos respecto al suelo testigo en presencia de petróleo nuevo. La viabilidad de nódulos presentó variación entre tratamientos, ya que en la mayoría de los tratamientos se reportaron valores de IRT menores a cero, que es indicativo de la estimulación del crecimiento de nódulos en la planta de *Vigna unguiculata*,

sobrepasando el 100% de estimulación en el crecimiento de los tratamientos mayores a 20 000 mg kg⁻¹ de HTPI.

6.2.8.2. Índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (IRITBL)

Los IRITBL para las bacterias fijadoras de nitrógeno totales, *Azotobacter* y *Azospirillum* presentaron diferencias estadísticas significativas (Apéndice, Cuadro 24), donde los tratamientos con 5 822 y 13 803 mg kg⁻¹ de HTPI presentaron los valores más elevados de toxicidad en los géneros bacterianos evaluados (Cuadro 31). Al respecto, Benavides *et al.* (2006) indican que los microorganismos pueden degradar los constituyentes y tienen una gran tolerancia a la toxicidad.

Cuadro 31. Índices relativos de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en la rizosfera de suelos contaminados con petróleo intemperizado a los 120 días.

HTPI (mg kg ⁻¹)	IRITBL		
	BFN	<i>Azospirillum</i>	<i>Azotobacter</i>
5 822	0.708 a*	0.496 d	0.766 a
6 536	0.629 b	0.641 c	0.610 f
13 803	0.482 e	0.856 a	0.639 e
14 431	0.417 g	0.297 h	0.472 i
15 923	0.547 d	0.773 b	0.530 h
23 313	0.476 f	0.440 e	0.657 d
25 517	0.590 c	0.328 g	0.665 c
28 465	0.366 h	0.250 i	0.714 b
50 297	0.323 i	0.400 f	0.550 g

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRF mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRF menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

Azotobacter fue la especie bacteriana más sensible a la exposición de hidrocarburos del petróleo intemperizado, donde en la mayoría de los tratamientos se rebasó la LD₅₀. Los valores de toxicidad oscilaron entre 0.47 y 0.76. Rhodes y Hendricks (1990) mencionan que las concentraciones grandes de petróleo inhiben el crecimiento de las poblaciones y disminuye la biodiversidad de las comunidades microbianas.

6.2.8.3. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en crecimiento de *Vigna unguiculata*

Los índices totales de impacto fitotóxico (ITIF) se calcularon a partir de los índices relativos de impacto fitotóxico (IRIF), y se observaron variaciones marcadas entre los tratamientos (Figura 25), donde las dosis mayores de petróleo intemperizado presentaron menor valor de toxicidad, habiendo diferentes grados de sensibilidad a las diferentes concentraciones de hidrocarburos.

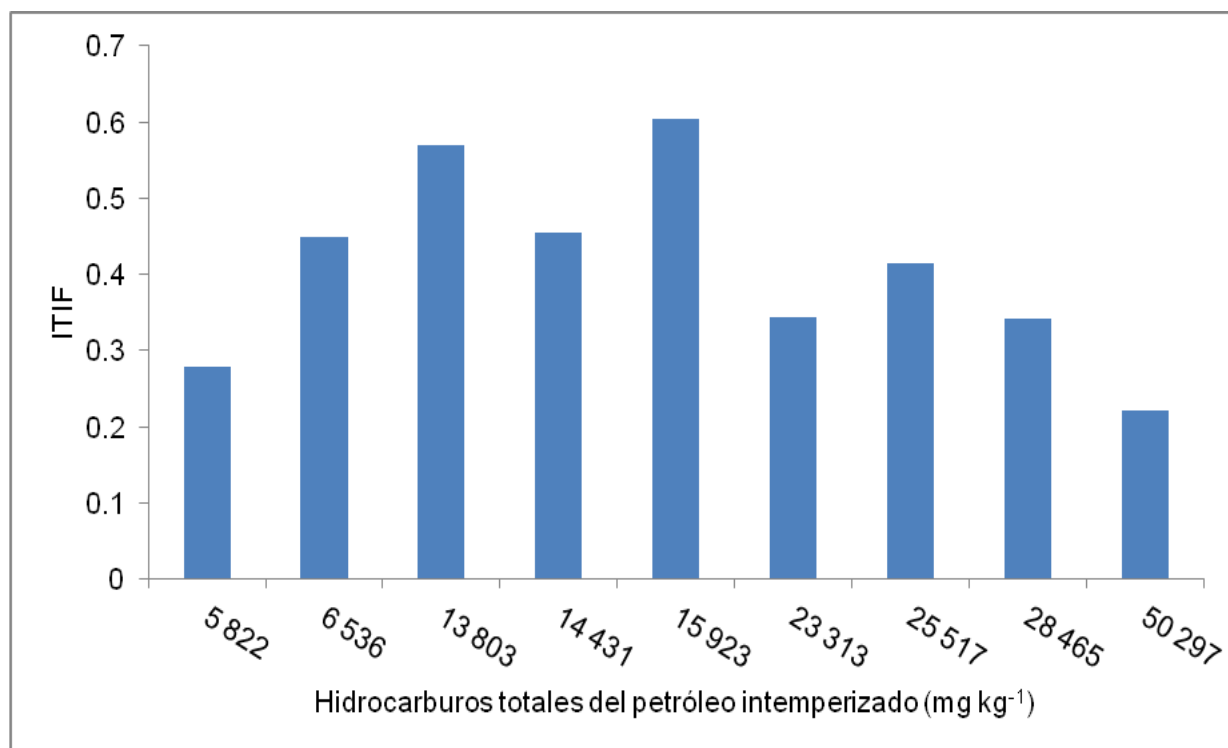


Figura 25. Índice total de impacto fitotóxico (ITIF) en el crecimiento de la planta de frijol pelón (*Vigna unguiculata*) al día 120.

Todos los valores de ITIF en planta de frijol pelón son mayores a cero, indicando una inhibición en el crecimiento y desarrollo de la planta por el grado de toxicidad presente en el suelo, lo que se relaciona a lo mencionado por Benavides *et al.* (2006), quienes indican que en el suelo los hidrocarburos inician una serie de procesos físico-químicos simultáneos como evaporación y penetración, que dependiendo del tipo de hidrocarburo, temperatura, humedad y textura del suelo puede ser más o menos lentos, ocasionando una mayor toxicidad, por lo que la textura presente en los suelos evaluados (Cuadro 8) pudo provocar heterogeneidad en la relación dosis-respuesta.

6.2.8.4. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de Nitrógeno de vida libre (ITITBL)

Estos valores se calcularon a partir de los índices relativos de impacto tóxico en bacterias de vida libre (IRITBL) en los tres géneros de bacterias fijadoras de Nitrógeno en la rizosfera de suelos contaminados con hidrocarburos del petróleo intemperizado (Figura 26). Se observó una tendencia inversamente proporcional entre la toxicidad y las concentraciones de hidrocarburos a partir de los 15 923 mg kg⁻¹ de HTPI, pero evidenciando toxicidad en todos los tratamientos evaluados.

6.2.8.5. Índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de impacto tóxico en suelo (IITS)

El índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica presentó diferencias estadísticas significativas (Apéndice, Cuadro 25). La toxicidad en *Rhizobium* no evidenció efectos negativos (Cuadro 32) ni se observó una tendencia convencional entre la toxicidad y las dosis de hidrocarburos presentes en el suelo, reportando que las dosis de HTPI hasta de 50 297 mg kg⁻¹ de HTPI estimulan el crecimiento de esta bacteria en los nódulos de la planta de *Vigna unguiculata*, estos resultados no concuerdan con lo que encontró Pereira *et al.* (2006), e indica que *Rhizobium* es un género muy sensible al estrés ambiental, por lo tanto un buen indicador de la contaminación del suelo, también González-Chávez (2005), indica que los mutualistas

de la rizosfera como *Rhizobium* y *Azospirillum* representan un promisorio elemento microbiológico en la recuperación de suelos contaminados.

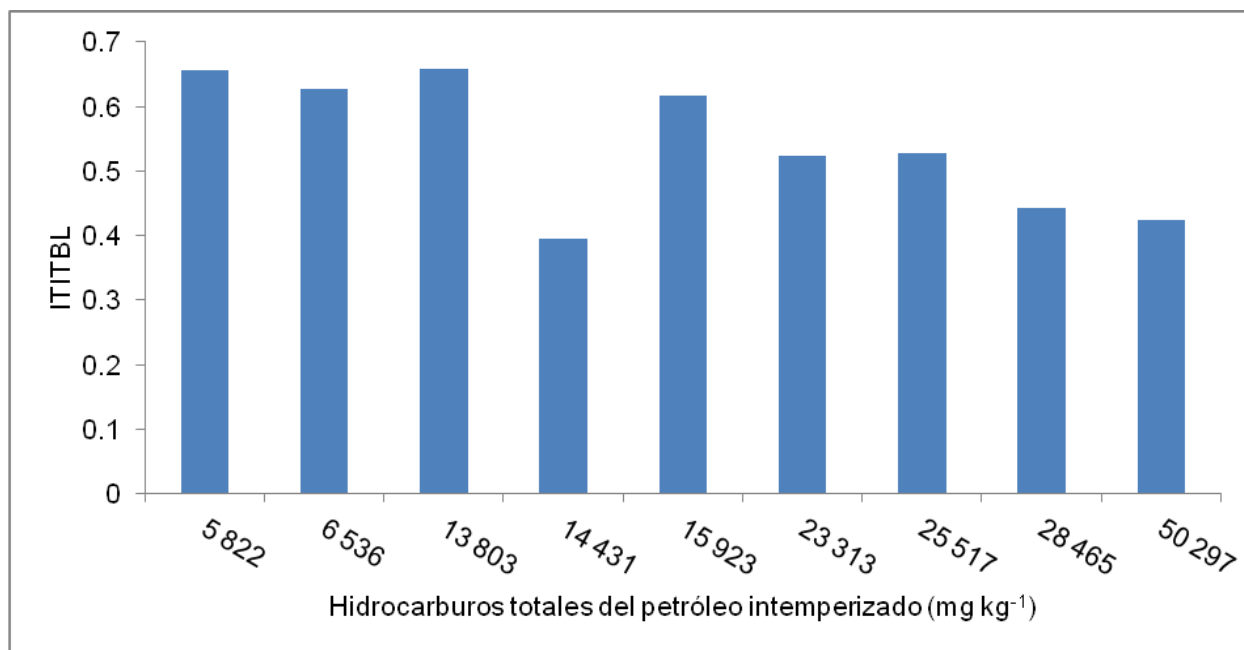


Figura 26. Índice total de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (ITITBL) en la fase de planta (120 días).

Los valores de IITS en la actividad enzimática de la ureasa presentó diferencias estadísticas significativas (Apéndice, Cuadro 26), donde no hubo relación inversamente proporcional de dosis-respuesta, siendo las dosis de 6 536 y 15 923 mg kg⁻¹ las que presentaron efecto tóxico y afectaron la actividad enzimática, mientras que las dosis mayores a 23 313 mg kg⁻¹ de HTPI estimularon la actividad enzimática de la ureasa (Cuadro 32).

Cuadro 32. Índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) e Índice de Impacto Tóxico en suelo (IITS) con hidrocarburos del petróleo intemperizado al día 120.

HTPI (mg kg ⁻¹ base seca)	IITBS <i>Rhizobium</i>	IITS Ureasa
5 822	-7.970 b*	-0.179 d
6 536	-293.509 g	0.012 b
13 803	-49.602 d	-0.305 e
14 431	-194.532 f	-0.098 c
15 923	-494.804 h	0.691 a
23 313	-60.941 e	-0.383 g
25 517	-0.225 a	-0.904 i
28 465	-19.381 c	-0.711 h
50 297	-835.053 i	-0.362 f

*Cifras con la misma letra dentro de cada variable son estadísticamente iguales (Tukey, p≤0.05)

IRF mayores a cero indican que la dosis de HTPI afecta la variable respuesta.

IRF menores a cero indican que la dosis de HTPI estimula la variable respuesta.

SECCIÓN VII. CONCLUSIONES

1. Los diferentes parámetros del crecimiento vegetativo en plántula y planta evidenciaron efecto negativo a la presencia de hidrocarburos del petróleo intemperizado en suelo, pero la relación del efecto de cada parámetro no fue inversamente proporcional a la dosis de HTPI, esta relación fue no convencional según la teoría de toxicidad (dosis-respuesta).
2. La altura, biomasa foliar, total y número de nódulos en plántula al día 30, así como biomasa foliar, radical, nódulos y total al día 120 presentaron alta sensibilidad a las dosis de HTPI, parámetros que permiten proponer a los dos estados de crecimiento vegetativo de la leguminosa *Vigna unguiculata* como indicador total del impacto fitotóxico del petróleo crudo intemperizado.
3. La densidad de bacterias fijadoras totales de N de vida libre por su alta sensibilidad a la presencia de HTPI, pueden utilizarse como indicadores relativas de la toxicidad del impacto toxico del petróleo al día 30.
4. La densidad del grupo *Azospirillum* y *Azotobacter* en la rizosfera de *Vigna unguiculata* al día 30 y 120 presentaron efecto a las dosis de HTPI, parámetros de utilidad para formular el índice total de impacto tóxico en bacterias de vida libre (ITITBL), el cual fue mayor a cero e indica inhibición por la toxicidad presente en el suelo.
5. La densidad de *Rhizobium* en nódulos de plántula al día 30, tiene efectos a las dosis de los HTPI, parámetro que se propone como índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica. Sin embargo, este parámetro al día 120, fue estimulado por las dosis de HTPI, se obtuvo un índice de impacto tóxico de bacterias de asociación simbiótica (IITBS) menor a cero, estimulando la variable respuesta.
6. La actividad enzimática de la ureasa en suelo plantado con *Vigna unguiculata* al día 30 y 120 no muestra efectos negativos a las dosis de HTPI, por lo que no resulta ser buen indicador de toxicidad, ya que su índice de impacto tóxico en suelo (IITS) presenta valores menores a cero, lo que indica que contenidos altos de hidrocarburos del petróleo intemperizado estimulan la actividad de la ureasa.

SECCIÓN VIII. ANEXOS

Cuadro 1. Medio de cultivo Carbón combinado (Rennie, 1981).

Solución A

Reactivo	Cantidad
KH_2PO_4	0.2 g
K_2HPO_4	0.8 g
NaCl	0.1 g
Fe EDTA	4.9 ml
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.025 g
Extracto de levadura	0.1 g
Manitol	5.0 g
Sacarosa	5.0 g
Lactato de sodio (60% v/v)	0.5 ml
Agar	15 g
Agua destilada	900 ml

pH 7.0 las dos soluciones A y B. Por separado esterilizar a 18 libras por 18 min. A la solución B se le agregan $5 \mu\text{g L}^{-1}$ biotina y $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ácido p-aminobenzóico y posteriormente se incorporan a la solución A.

Solución B

Reactivo	Cantidad
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0.06 g
Agua destilada	100 ml

Cuadro 2. Medio de cultivo Rojo Congo (Rodríguez, 1982).

Componente	Cantidad (g)
Ácido málico	5.0
K ₂ HPO ₄	0.5
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.1
Extracto de levadura	0.5
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.015
KOH	4.8
Agar-agar	20
Rojo Congo	15 mL
H ₂ O destilada	1.0 L

Cuadro 3. Medio de cultivo Ashby (Rao, 1999).

Componente	Cantidad (g)
Manitol	20.0
K ₂ HPO ₄	0.2
MgSO ₄ • 7H ₂ O	0.2
NaCl	0.2
K ₂ SO ₄	0.1
CaCO ₃	5.0
Agar	15.0
H ₂ O destilada	1.0 L

Cuadro 4. Medio de cultivo Extracto de Levadura-Manitol-Agar-Rojo Congo (ELMARC) (CIAT, 1988).

Reactivo	Cantidad
K_2HPO_4	0.5 g
$MgSO_4$	0.2 g
NaCl	0.1 g
Manitol	1 g
Extracto de levadura	1 g
Rojo Congo	10 ml
Agar	20 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7

SECCIÓN IX. APÉNDICES

9.1. Efecto a los 30 días de exposición al petróleo intemperizado en plántulas de *Vigna unguiculata*

Cuadro 1. Análisis de varianza de la variable emergencia acumulada a través del tiempo de plántulas de *Vigna unguiculata* en suelos con petróleo intemperizado.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Día 1					
Tratamiento	9	5626.953	625.217	4.317	0.000
Error	70	10136.719	144.810		
Total	79	15763.672			
R cuadrada	0.357				
Día 2					
Tratamiento	9	18806.641	2089.627	6.134	0.000
Error	70	23847.656	340.681		
Total	79	42654.297			
R cuadrada	0.441				
Día 3					
Tratamiento	9	15359.375	1706.597	5.571	0.000
Error	70	21445.313	306.362		
Total	79	36804.688			
R cuadrada	0.417				
Día 4					
Tratamiento	9	10900.391	1211.155	4.251	0.000
Error	70	19941.406	284.877		
Total	79	30841.797			
R cuadrada	0.353				
Día 5					
Tratamiento	9	9382.813	1042.535	3.908	0.000
Error	70	18671.875	266.741		
Total	79	28054.688			
R cuadrada	0.334				

Cuadro 2. Análisis de varianza de la altura de plántulas de *Vigna unguiculata* en suelo con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Altura (15 d)					
Tratamiento	9	60.747	6.750	11.216	0.000
Error	30	18.053	0.602		
Total	39	78.800			
R cuadrada	0.771				

Altura (30 d)					
Tratamiento	9	604.854	67.206	63.137	0.000
Error	30	31.933	1.064		
Total	39	636.787			
R cuadrada	0.950				

Cuadro 3. Análisis de varianza de la biomasa foliar, radical, de nódulos y total en plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Biomasa foliar					
Tratamiento	9	23.952	2.661	113.047	0.000
Error	30	0.706	0.02354		
Total	39	24.658			
R cuadrada	0.971				
Biomasa radical					
Tratamiento	9	2.122	0.236	55.453	0.000
Error	30	0.128	0.004252		
Total	39	2.250			
R cuadrada	0.943				
Biomasa nódulos					
Tratamiento	9	0.04063	0.004515	193.986	0.000
Error	30	0.0006982	0.00002327		
Total	39	0.04133			
R cuadrada	0.983				
Biomasa total					
Tratamiento	9	36.699	4.078	96.661	0.000
Error	30	1.266	0.04219		
Total	39	37.965			
R cuadrada	0.967				

Cuadro 4. Análisis de varianza del número y viabilidad de nódulos en plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Número nódulos					
Tratamiento	9	14672.100	1630.233	94.233	0.000
Error	30	519.000	17.300		
Total	39	15191.100			
R cuadrada	0.966				
Viabilidad nódulos					
Tratamiento	9	39513.084	4390.343	136.397	0.000
Error	30	965.641	32.188		
Total	39	40478.725			
R cuadrada	0.976				

Cuadro 5. Análisis de varianza en la densidad de BFN totales en rizosfera y suelo a distancia de plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	8373894192740.270	930432688082.252	74.920	0.000
Error	30	372572313466.667	12419077115.556		
Total	39	8746466506206.930			
R cuadrada	0.957				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	1557307015786.845	173034112865.205	58.019	0.000
Error	30	89471659685.333	2982388656.178		
Total	39	1646778675472.178			
R cuadrada	0.946				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 6. Análisis de varianza en la densidad de *Azospirillum* en rizosfera y suelo a distancia de plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	17727118802272.710	1969679866919.190	281.424	0.000
Error	30	209969373813.333	6998979127.111		
Total	39	17937088176086.040			
R cuadrada	0.988				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	836376685413.155	92930742823.684	38.309	0.000
Error	30	72775270520.000	2425842350.667		
Total	39	909151955933.155			
R cuadrada	0.920				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 7. Análisis de varianza en la densidad de *Azotobacter* en rizosfera y suelo a distancia de plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	7784452272366.930	864939141374.104	73.430	0.000
Error	30	353374903850.667	11779163461.689		
Total	39	8137827176217.600			
R cuadrada	0.957				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	567620173110.044	63068908123.338	125.171	0.000
Error	30	15115817589.333	503860586.311		
Total	39	582735990699.378			
R cuadrada	0.974				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 8. Análisis de varianza en la densidad de *Rhizobium* en nódulos de plántulas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	9	321039757192942.300	35671084132549.140	73.430	0.000
Error	30	13040184726666.750	11779163461.689		
Total	39	334079941919609.000			
R cuadrada	0.961				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 9. Análisis de varianza en actividad enzimática de la ureasa en plántulas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	9	2918.779	324.309	26.509	0.000
Error	30	367.018	12.234		
Total	39	3285.797			
R cuadrada	0.888				

Cuadro 10. Análisis de varianza en el índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en plántulas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Emergencia					
Tratamiento	8	0.638	0.0798	8.4E+33	0.000
Error	27	2.567E-34	9.506E-36		
Total	35	0.638			
R cuadrada	0.932				

Altura					
Tratamiento	8	0.446	0.0558	4.5E+32	0.000
Error	27	3.339E-33	1.236E-34		
Total	35	0.446			
R cuadrada	0.909				
Biomasa foliar					
Tratamiento	8	1.102	0.138	2.6E+32	0.000
Error	27	1.437E-32	5.324E-34		
Total	35	1.102			
R cuadrada	0.855				
Biomasa radical					
Tratamiento	8	7.702	0.963	5.1E+33	0.000
Error	27	5.141E-33	1.904E-34		
Total	35	7.702			
R cuadrada	0.621				
Biomasa nódulos					
Tratamiento	8	2.078	0.260	6.1E+32	0.000
Error	27	1.155E-32	4.279E-34		
Total	35	2.078			
R cuadrada	0.649				
Biomasa total					
Tratamiento	8	1.349	0.169	2.8E+32	0.000
Error	27	1.643E-32	6.086E-34		
Total	35	1.349			
R cuadrada	0.811				
Número nódulos					
Tratamiento	8	1.809	0.226	7.4E+32	0.000
Error	27	8.213E-33	3.042E-34		
Total	35	1.809			
R cuadrada	0.734				
Viabilidad nódulos					
Tratamiento	8	18.002	2.250	1.2E+34	0.000
Error	27	5.198E-33	1.925E-34		
Total	35	18.002			
R cuadrada	0.731				

Cuadro 11. Análisis de varianza en el índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en plántulas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BFN totales					
Tratamiento	8	1.688	0.211	4.0E+32	0.000
Error	27	1.438E-32	5.325E-34		
Total	35	1.688			
R cuadrada	0.844				

Azospirillum					
Tratamiento	8	3.261	0.408	1.1E+34	0.000
Error	27	1.028E-33	3.808E-35		
Total	35	3.261			
R cuadrada	0.805				
Azotobacter					
Tratamiento	8	4.881	0.610	2.3E+33	0.000
Error	27	7.255E-33	2.687E-34		
Total	35	4.881			
R cuadrada	0.875				

Cuadro 12. Análisis de varianza en el índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) en plántulas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	8	432.338	54.042	5.5E+33	0.000
Error	27	2.642E-31	9.787E-33		
Total	35	432.338			
R cuadrada	0.377				

Cuadro 13. Análisis de varianza en el índice de impacto tóxico en suelo (IITS) en plántulas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	8	8.407	1.051	5.2E+33	0.000
Error	27	5.456E-33	2.021E-34		
Total	35	8.407			
R cuadrada	0.807				

9.2. Efecto a los 120 días de exposición al petróleo intemperizado en plantas de *Vigna unguiculata*

Cuadro 14. Análisis de varianza en la altura de plantas de *Vigna unguiculata* en suelo con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Altura (45 d)					
Tratamiento	9	3627.067	403.007	10.869	0.000
Error	30	1112.360	37.079		
Total	39	4739.427			
R cuadrada	0.765				
Altura (60 d)					
Tratamiento	9	21299.360	2366.596	17.802	0.000
Error	30	3988.107	132.937		
Total	39	25287.467			
R cuadrada	0.842				
Altura (75 d)					
Tratamiento	9	71059.847	7895.539	24.981	0.000
Error	30	9481.747	316.058		
Total	39	80541.594			
R cuadrada	0.882				
Altura (90 d)					
Tratamiento	9	112942.114	12549.124	116.431	0.000
Error	30	3233.453	107.782		
Total	39	116175.567			
R cuadrada	0.972				
Altura (105 d)					
Tratamiento	9	88580.217	9842.246	101.354	0.000
Error	30	2913.240	97.108		
Total	39	91493.457			
R cuadrada	0.968				
Altura (120 d)					
Tratamiento	9	64540.489	7171.165	8.776	0.000
Error	30	24514.000	817.133		
Total	39	89054.489			
R cuadrada	0.725				

Cuadro 15. Análisis de varianza en el diámetro basal de plantas de *Vigna unguiculata* en suelo con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	9	0.07052	0.007836	7.833	0.000
Error	30	0.03001	0.001000		
Total	39	0.101			
R cuadrada	0.701				

Cuadro 16. Análisis de varianza de la biomasa foliar, radical, de nódulos y total en plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Biomasa foliar					
Tratamiento	9	1579.694	175.522	119.574	0.000
Error	30	44.037	1.468		
Total	39	1623.730			
R cuadrada	0.973				
Biomasa radical					
Tratamiento	9	37.747	4.194	30.607	0.000
Error	30	4.111	0.137		
Total	39	41.858			
R cuadrada	0.902				
Biomasa nódulos					
Tratamiento	9	4.483	0.498	247.170	0.000
Error	30	0.06046	0.002015		
Total	39	4.544			
R cuadrada	0.987				
Biomasa total					
Tratamiento	9	2221.913	246.879	143.258	0.000
Error	30	51.70	1.723		
Total	39	2273.613			
R cuadrada	0.977				

Cuadro 17. Análisis de varianza del número y viabilidad de nódulos en plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Número nódulos					
Tratamiento	9	1728362.900	192040.322	137.639	0.000
Error	30	41857.500	1395.250		
Total	39	1770220.400			
R cuadrada	0.976				

Viabilidad nódulos					
Tratamiento	9	15305.242	1700.582	27.035	0.000
Error	30	1887.070	62.902		
Total	39	17192.312			
R cuadrada	0.890				

Cuadro 18. Análisis de varianza en la densidad de BFN totales en rizosfera y suelo a distancia de plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	72179821168355.600	8019980129817.280	25.165	0.000
Error	30	9560747998933.330	318691599964.444		
Total	39	81740569167288.900			
R cuadrada	0.883				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	30179607148544.710	3353289683171.635	23.598	0.000
Error	30	4263039975925.335	142101332530.844		
Total	39	34442647124470.050			
R cuadrada	0.946				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 19. Análisis de varianza en la densidad de *Azospirillum* en rizosfera y suelo a distancia de plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	93085701127908.300	10342855680878.700	44.100	0.000
Error	30	7035931268810.670	234531042293.689		
Total	39	100121632396719.000			
R cuadrada	0.930				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	480901172611812.300	5343352512423.590	33.851	0.000
Error	30	4735492027274.670	157849734242.489		
Total	39	52825664639086.900			
R cuadrada	0.910				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 20. Análisis de varianza en la densidad de *Azotobacter* en rizosfera y suelo a distancia de plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Rizosfera					
Tratamiento	9	114879589097884.400	12764398788653.820	52.955	0.000
Error	30	7231337934933.330	241044597831.111		
Total	39	122110927032817.700			
R cuadrada	0.941				
Suelo a distancia					
Tratamiento	9	38406039050678.050	4267337672297.561	35.320	0.000
Error	30	3624568740789.333	120818958026.311		
Total	39	42030607791467.390			
R cuadrada	0.914				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 21. Análisis de varianza en la densidad de *Rhizobium* en nódulos de plantas de *Vigna unguiculata* con petróleo intemperizado.

Fuente de variación	GL	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	9	28907500736000.000	3211944526222.222	314.090	0.000
Error	30	306785366666.667	10226178888.889		
Total	39	29214286102666.670			
R cuadrada	0.989				

GL: Grados de libertad.

Cuadro 22. Análisis de varianza en actividad enzimática de la ureasa en plantas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	9	2070.098	230.011	16.828	0.000
Error	30	410.051	13.668		
Total	39	2480.149			
R cuadrada	0.835				

Cuadro 23. Análisis de varianza en el índice relativo de impacto fitotóxico (IRIF) en plantas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Altura					
Tratamiento	8	1.290	0.161	3.1E+33	0.000
Error	27	1.412E-33	5.229E-35		
Total	35	1.290			
R cuadrada	0.904				
Diámetro basal					
Tratamiento	8	0.294	0.03679	1.3E+33	0.000
Error	27	7.710E-34	2.856E-35		
Total	35	0.294			
R cuadrada	0.925				
Biomasa foliar					
Tratamiento	8	1.265	0.158	6.7E+32	0.000
Error	27	6.420E-33	2.378E-34		
Total	35	1.265			
R cuadrada	0.766				
Biomasa radical					
Tratamiento	8	1.000	0.125	6.3E+32	0.000
Error	27	5.392E-33	1.997E-34		
Total	35	1.000			
R cuadrada	0.842				
Biomasa nódulos					
Tratamiento	8	0.716	0.08947	1.0E+32	0.000
Error	27	2.362E-32	8.747E-34		
Total	35	0.716			
R cuadrada	0.794				
Biomasa total					
Tratamiento	8	1.114	0.139	4.3E+32	0.000
Error	27	8.798E-33	3.258E-34		
Total	35	1.114			
R cuadrada	0.796				
Número nódulos					
Tratamiento	8	0.507	0.06343	2.4E+32	0.000
Error	27	7.191E-33	2.663E-34		
Total	35	0.507			
R cuadrada	0.864				
Viabilidad nódulos					
Tratamiento	8	13.668	1.709	2.2E+33	0.000
Error	27	2.105E-32	7.795E-34		
Total	35	13.668			
R cuadrada	0.892				

Cuadro 24. Análisis de varianza en el índice relativo de impacto tóxico en bacterias fijadoras de N de vida libre (IRITBL) en plantas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
BFN totales					
Tratamiento	8	0.508	0.06356	4.8E+32	0.000
Error	27	3.596E-33	1.332E-34		
Total	35	0.508			
R cuadrada	0.940				
Azospirillum					
Tratamiento	8	1.471	0.184	9.1E+32	0.000
Error	27	5.455E-33	2.020E-34		
Total	35	1.471			
R cuadrada	0.885				
Azotobacter					
Tratamiento	8	0.275	0.0344	1.5E+32	0.000
Error	27	6.163E-33	2.283E-34		
Total	35	0.275			
R cuadrada	0.941				

Cuadro 25. Análisis de varianza en el índice de impacto tóxico en bacterias de asociación simbiótica (IITBS) en plantas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	8	2590545	323818.167	6.1E+33	0.000
Error	27	1.432E-27	5.303E-29		
Total	35	2590545			
R cuadrada	0.760				

Cuadro 26. Análisis de varianza en el índice de impacto tóxico en suelo (IITS) en plantas de *Vigna unguiculata* con dosis de petróleo intemperizado.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F calculada	P>F
Tratamiento	8	6.622	0.828	1.7E+34	0.000
Error	27	1.348E-33	4.992E-35		
Total	35	6.622			
R cuadrada	0.895				

SECCIÓN X. LITERATURA CITADA

- Adams H.R., Zavala C.J. y Morales G.F. 2008. Concentración residual de hidrocarburos en suelo del trópico. II: afectación a la fertilidad y a su recuperación. *Interciencia* 33: 483-489.
- Agnello M.A. 2000. Petroleum derived spray soils: Chemistry, history, refining and formulation. Cornell Edition. Cornell University. New York. USA. 15 p.
- Alcántar G.G., Etchevers B.J.D. y Aguilar S.A. 1992. Los análisis físicos y químicos: su aplicación en Agronomía. 1ª edición. Centro de Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Estado de México. 108-125 p.
- Alexander M. 1994. Introducción a la Microbiología del Suelo. Editorial AGT, S.A. México. 791 p.
- Álvarez M. 2006. Césped. Editorial Albatros. 1ra. Edición. Buenos Aires, Argentina. 112 p.
- Álvarez-Solís J.D. y León-Martínez N.S. 1997. Fertilidad del suelo y sistemas simbióticos. *In: Parra M. y Díaz B.M. (eds). Los Altos de Chiapas: Agricultura y crisis rural. El colegio de la Frontera Sur, San Cristóbal de las Casas, Chiapas, México. 43-64 pp.*
- Anderson T.A., Guthrie E.A. y Walton B.T. 1993. Bioremediation the rhizosphere. *Environ. Sci. Technol.* 27: 2630-2636.
- Andrews R.K., Blakeley R.L. y Zerner B. 1984. Urea and urease. En: Eichhorn L., Marzilli L.G. (Eds), *Advances in inorganic Biochemistry*. Elsevier Science Publishing, New York. 6: 245-283.
- Arias T.A. 2008. Evaluación toxicológica de suelos afectados por petróleo a partir de plantas y plántulas de frijol negro (*Phaseolus Vulgaris* L.). Tesis de Ingeniero Químico Petrolero. Universidad Popular de la Chontalpa. H. Cárdenas, Tabasco. 68 p.
- Athar M. y Johnson D.A. 1997. Effects of drought on the growth and survival of *Rhizobium meliloti* strains from Pakistan and Nepal. *J. Arid Environ.* 35: 335-400
- Atlas M.R., Horowitz A., Krichevly M. y Bej K.A. 1991. Response of microbial population to environmental disturbance. *Microbiological Ecology.* 22: 249-256

- Atlas R.M. y Bartha R. 2002. Ecología microbiana y Microbiología ambiental. Cuarta edición. Editorial Pearson Educación, S.A. Madrid, España. 677p.
- Benavides L.M.J., Quintero G., Guevara V.A.L., Jaimes C.D.C., Gutiérrez R.S.M. y Miranda G.J. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo. Nova-Publicación científica 4: 82-90
- Bernal B.L.C. 2007. Efectos de las mezclas de las leguminosas *Calliandra calothyrsus*, *Flemingia macrophylla*, *Cratylia argentea* y *Vigna unguiculata* ensiladas y henificadas sobre los parámetros de fermentación ruminal *in vitro* y producción de leche en bovinos. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias Producción Animal Tropical. Universidad Nacional de Colombia. facultad de Ciencias Agropecuarias. 119 p.
- Bosisio A.C. 2007. Catálogo de la Familia Fabaceae representada en el Herbario del Museo Provincial de Ciencias Naturales "Florentino Ameghino" de Santa Fe. Serie Catálogos No. 17. Santa Fe, Argentina. 31 p.
- Botello V.A. 1996. Características, composición y propiedades fisicoquímicas del petróleo. In Botello V.A., Rojas G.J.L., Benitez J.A., Zarate L. (ed). Golfo de México. Contaminación e Impacto Ambiental: Diagnóstico y Tendencias. Universidad Autónoma de Campeche. p. 2003-2010.
- Bravo E. 2007. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. Acción Ecológica. 61 p.
- Brohon V., Delilme C. y Gourdon R. 2001. Complementarity of biossays and microbial activity measurements for the evaluation of hydrocarbon contaminated soils quility. *Soil Biology & Biochemistry* 33: 883-891
- Burns R.G. 1982. Enzyme Activity in soil: Location and a possible role in microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry* 14: 423-427
- Burns, R.G. 1986. Interaction of enzymes with soil mineral and organic colloids. In: P.M. Huang y M. Schnitzer (eds.). Interactions of soil minerals with natural, organics and microbes. Soil Science Society of America. Madison, WI. 429-445 p.
- Calvo V.P., Reymundo M.L. y Zúñiga D.D. 2008. Estudio de las poblaciones microbianas de la rizósfera del cultivo de papa (*Solanum tuberosum*) en zonas altoandinas. *Ecología Aplicada* 7: 141-148

- Camacho R.J. 2006. Estadística con SPSS para Windows versión 12. 1a. edición. Alfaomega, Grupo Editor, S.A. de C.V. México D.F. 410 p.
- Campbell R. y Greaves M.P. 1990. Anatomy and community structure of the rhizosphere. John Wiley and Sons. New York, USA. pp. 11-34.
- Cerón R.L.E. y Melgarejo M.L.M. 2005. Enzimas del suelo: indicadores de salud y calidad. *Acta Biológica Colombiana* 10: 5-18
- Chaîneau H.C., Morel L.J. y Oudot J. 1997. Phytotoxicity and plant uptake of fuel oil hydrocarbons. *J. Envir. Qual.* 26: 1478-1483
- Chaudhary P., Dudeja S.S. y Kapoor K.K. 2004. Efectivity of host-*Rhizobium leguminosarum* symbiosis in soils receiving sewage water containing heavy metals. *Microbiological Research* 159:121-127
- Chediack S.E. 2009. Conceptos generales sobre biodiversidad y manejo de recursos naturales. En: Chediack S.E. (Ed.). Monitoreo de Biodiversidad y Recursos Naturales: ¿Para qué? Corredor Biológico Mesoamericano. Serie Diálogo/número 3. Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la Biodiversidad. SEMARNAT. México D. F. 14-29 pp.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1988. Simbiosis Leguminosa-Rizobio; manual de métodos de evaluación, selección y manejo agronómico. Ed. rev. Proyecto CIAT-UNDP de evaluación, selección y manejo de la simbiosis leguminosa-rizobio para aumentar la fijación de nitrógeno. Sección de Microbiología de suelos del programa de Frijol (comps.). Cali, Colombia. 178 p.
- Contreras A.P.A. 2005. Suelos contaminados con hidrocarburos: RNA 16S como indicador de impacto. Tesis de Ingeniería Civil en Biotecnología. Universidad de Chile. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas. Departamento de Ingeniería Química y Biotecnología. Santiago de Chile. 75 p.
- Coyne M. 2000. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. 1ra. ed. Editorial Paraninfo. Madrid, España. 416 p.
- De la Cruz L.N. 2010. Especies de leguminosas como fitorremediadoras en suelos contaminados. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus Montecillo*. Montecillos, Texcoco. Estado de México. 124 p.

- Delgado J.G. 2006. Asfaltenos. Composición, agregación, precipitación. Laboratorio de formulación, interfases, reología y procesos. Versión 1. Universidad de los Andes. Facultad de Ingeniería. Escuela de Ingeniería Química. Mérida, Venezuela. 36 p.
- Dobson L. y Wilson H.A. 1964. Respiration studies on soil treated with some hydrocarbons. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 21: 536-539
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2002. NOM-021-RECNAT-2000. Establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos, estudio, muestreo y análisis. Martes 31 de diciembre de 2002. 85 p.
- DOF (Diario Oficial de la Federación). 2005. Norma Oficial Mexicana NOM-138-SEMARNAT/SS-2003. Límites máximos permisibles de hidrocarburos en suelos y las especificaciones para su caracterización y remediación. 29 de Marzo de 2005. 21 p.
- Echegaray-Alemán A. 1995. El ciclo del nitrógeno y fases que lo constituyen. *In: Ferrera-Cerrato R. y Pérez-Moreno J. (ed.). Agromicrobiología, elemento útil en la agricultura sustentable.* Ed. Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas. Montecillo, Edo. de México. 77-82 p.
- Ellis R. y Adams R.S. 1960. Contamination of soils by petroleum hydrocarbons. Department of Agronomy, Kansas State University, Manhattan. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 26: 197-216
- EPA. 1986. *Method 418.1 mod. Petroleum hydrocarbons. Total Recoverable Spectrophotometric Infrared.* Environmental Protection Agency. Washington, DC. EEUU. 8 p.
- Espíndola M. y Fernández G. 1994. Procesos Físicoquímicos para la Estabilización de Residuos Peligrosos. Cuaderno de Investigación 3. CENAPRED. México D.F. 20 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 1995. Manual técnico de la fijación simbiótica del nitrógeno. Leguminosa/Rhizobium. Roma, Italia.

- Fenchel T., King G.M. y Blackburn T.H. 2000. Bacterial Biogeochemistry: The Ecophysiology of Mineral Cycling. 2ª ed. Academic Press, San Diego. 43-59, 117-161 p.
- Fernández L.L.C., Rojas A.G.N., Roldán C.G.T., Ramírez I.E.M., Zegarra M.G.H., Hernández U.R., Reyes A.J.R., Hernández F.D. y Arce O.M.J. 2006. Manual de técnicas de análisis de suelos aplicadas a la remediación. Instituto Mexicano del Petróleo. 1a. ed. México, D.F. 180 p.
- Figueira E.M.A.P. 2000. Aspectos da tolerância salina em *Pisum sativum* L.: influencia da nutrição azotada. PhD Tesis. Universidade de Aveiro.
- Freedman B. 1989. Environmental Ecology: the impacts of pollution and other stresses on ecosystem structure and function. Academic Press, Inc. San Diego, California. USA. 424 p.
- Froni L. 1999. Procesos microbianos. Editorial de la fundación Universidad Nacional de Río Cuarto, Argentina. 332 p.
- García R.D.E. 2005. Estudio de la toxicidad de los petróleos nuevo e intemperizado en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Ingeniería Ambiental. División Académica de Ciencias Biológicas. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco. Villahermosa, Tabasco. 87 p.
- Garrido R.M.F. 2007. Aislamiento e identificación de bacterias diazotróficas rizosféricas y endófitas asociadas a suelos y pastos del valle y sabana del Cesar en dos épocas climáticas. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, D. C. 70 p.
- González-Chávez M. del C.A. 2005. Recuperación de suelos contaminados con metales pesados utilizando plantas y microorganismos rizosféricos. *Terra Latinoamericana*. 23: 29-37.
- González-López J. 1992. Microorganismos diazotrofos asociados a raíces de plantas no-leguminosas. En: Interacción Planta-Microorganismo. Biología del Nitrógeno. González-López J. y Lluch P.C. (coord.). Editorial Rueda. Madrid, España. 71-96 p.

- González P.A.R. 2003. Factibilidad del uso de rizobacterias como biofertilizantes en plantas. Universidad de Santiago de Chile. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ingeniería Geográfica. 73 p.
- Goyoaga J.C. 2005. Estudio de factores no nutritivos en *Vicia faba* L. Influencia de la germinación sobre su valor nutritivo. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. Madrid, España. 254 p.
- Grageda-Cabrera O.A., Vera-Núñez J.A., Castellanos J.Z. y Peña-Cabriales J.J. 2003. Comparación de métodos para estimar la fijación de N₂ en frijol en condiciones de campo. *Revista Terra Latinoamericana* 21: 65-71
- Hernández A.E. 1997. Influencia de un complejo de hidrocarburos en poblaciones rizosféricas y en el crecimiento del frijol variedad Michoacán 12-A3. Tesis Maestría en Ciencias en Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 131 p.
- Hernández A.E. 2002. La rizosfera de plantas gramíneas y leguminosas en la fitorremediación de suelos contaminados por petróleo. Tesis Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Texcoco, Estado de México. 267 p.
- Hirsch M.A. 1992. Developmental biology of legume nodulation. Department of Biology, University of California-Los Angeles. Los Angeles, CA. *Tansley Review*. 40: 211-237
- Hoffman E. y Schmidt W. 1953. Über das Enzym-system unserer Kulturböden. II. Urease. *Biochem Z.* 323: 125-127.
- Huesemann H.M. 1994. Guidelines for land-treating petroleum hydrocarbon-contaminated soils. *J. Soil Contam.* 3: 299-318.
- IUSS Grupo de Trabajo WRB. 2007. Base Referencial Mundial del Recurso Suelo. Primera actualización 2007. Informes sobre Recursos Mundiales de Suelos No. 103. FAO, Roma.
- Jasper D.A. 1994. Management of mycorrhizas in vegetation. 211-219 p. *In*: Robson A.D., Abbott L.K. y Malajczuk N. (eds.). Management of mycorrhizas in agriculture, horticulture and forestry. Kluwer. Dordrecht, The Netherlands.

- Kandeler E., Stemmer M. y Klimanek E.M. 1999. Response of soil microbial biomass, urease and xylanase within particle size fraction to long-term soil management. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 261-273.
- Kavimandan S.K., Lakshmi K.M. y Rao N.S. 1978. Non-symbiotic nitrogen fixing bacteria in the rizosphere of wheat, maize and sorghum. *Proc. Indian Acad. Sci.* 878: 299-302
- Kirk J.L., Klironomos J.N., Lee H. y Trevors J.T. 2002. Phytotoxicity assay to assess plant species for phytoremediation of petroleum-contaminated soil. *Biorem. J.* 6: 57-63
- Lakshmi V., Kavimandan S.K., Vijayalakshmi M., Lakshmi K.M., Tilak K.V.B.R. y Subba Rao N.S. 1977. Establishment and survival of *Spirillum lipoferum*. *Proc. Indian Acad. Sci.* 86(8):392-404
- Lal R. 1988. Nature and hábitats of microbes of nitrogen cycle. *In:* R. Lal and S. Lal (eds.). *Pesticides and Nitrogen Cycle*. Vol. I. CRC Press. Inc. Boca Raton, FLA, USA. pp. 1-73.
- Lavin M., Herendeen P.S. y Wojciechowski M.F. 2005. Evolutionary rates analysis of Leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the tertiary. *Syst. Biol.* 54: 575-594
- Leahy J.G. y Colwell R.R. 1990. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. *Microbiol. Rev.* 54: 305-315
- Li, X., Feng Y. y Sawatsky N. 1997. Importance of soil-water relations in assessing the endpoint of bioremediated soils: plant growth. *Plant Soil* 192: 219-226
- Lindau C.W. y Delaune R.D. 2000. Vegetative response of *Sagittaria lancifolia* to burning of applied crude oil. *Water, Air, Soil Pollut.* 121: 161-172
- Lindeman R.L. 1942. The trophic dynamic aspect of ecology. *Ecology* 23: 399-418
- Liste H.H. y Alexander M. 2000. Plant-promoted pyrene degradation in soil. *Chemosphere* 40: 7-10
- Maass J.M. y Martínez-Yrizar A. 1990. Los ecosistemas: definición, origen e importancia del concepto. *Ciencias* 4: 10-20

- Madigan M.T., Martiko J.M., Dunlap P.V. y Clark P.D. 2009. Brock. Biología de los microorganismos. 12th ed. Rev. Pearson Educación, S. A. Madrid, España. 1259 p.
- Maldonado C.E. 2006. El uso del pasto egipto *Brachiaria mutica* (Forsskal) Staff. y la leguminosa guaje *Leucaena leucocephala* Lam. en la toxicidad y biodegradación de petróleos crudos nuevo e intemperizado en suelo. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 184 p.
- Mantilla L.C., Villalba A.M. y Oviedo Z.L.E. 2007. Bacterias fijadoras asimbióticas de nitrógeno de la zona agrícola de San Carlos. Córdoba, Colombia. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología* 9: 6-14
- Marroquín S.G.J. 2007. Formación de sedimentos durante el hidrotreamiento catalítico de crudos pesados. Tesis Doctor en Tecnología Avanzada. Instituto Politécnico Nacional. Centro de Investigación en Ciencia Aplicada y Tecnología Avanzada. México, D. F. 129 p.
- Martínez M. 1998. Manual de Microbiología Ambiental. Pontificia Universidad Javeriana. Primera edición.
- Martínez M.V.E. y López S.F. 2001. Efecto de hidrocarburos en las propiedades físicas y químicas de suelo arcilloso. *Terra* 19: 9-17
- Marwood T.M., Knoke K., Yau K., Lee H., Trevors J.T., Suchorski-Tremblay A., Flemming C.A., Hodge V., Liu D.L. y Seech A.G. 1998. Comparison of toxicity detected by five bioassays during bioremediation of diesel fuel-spiked soils. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13:117–126
- Martzadori C., Francioso O., Ciavatta C, Gessa, C. 2000. Influence of the content of heavy metals and molecular weight of humic acids fractions on the activity and stability of urease. *Soil Biology & Biochemistry* 32, 1893-1898
- Méndez-Natera J.R., Roque C., Zapata K. y Otahola-Gómez V.A. 2004. Efecto de la concentración y tiempo de contaminación de un suelo por petróleo en la germinación de semillas de maíz (*Zea mays* L.) cv. Himeca 95. *Revista UDO agrícola* 4: 66-71

- Mishustin E.N. y Shilnikova V.K. 1969. Free-living nitrogen-fix by bacteria of the genus *Azotobacter*. Soil Biology. UNESCO. 72-124 p.
- Montoya C.M.A. 2010. Toxicología clínica. Méndez editores. Tercera edición. México, D.F. 399 p.
- Morales G.G. 2007. La fitorremediación de suelos contaminados con petróleo mediante la utilización de la planta de arroz (*Oriza sativa* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. H. Cárdenas, Tabasco. 71 p.
- Nadal M.S., Moreno Y.M.T. y Cubero S.J.I. 2004. Las leguminosas grano en la agricultura moderna. Ediciones Mundi-Prensa. Coedición Junta de Andalucía, Consejería de Agricultura y Pesca. Madrid, España. 318 p.
- O'Neill R.V., DeAngelis D.L., Waide J.B. y Allen T.F.H. 1986. A hierarchical concept of ecosystems. Princeton Univ. Press. Princeton. 253 pp.
- O'Reilly K. y Thorsen W. 2010. Impacto de la meteorización del petróleo crudo en la solubilidad efectiva calculada de compuestos aromáticos: Evaluación de suelos de yacimientos petrolíferos ecuatorianos. *Soil and Sediment Contamination* 19: 391-404
- Odum E.P. 1972. Ecología. Editorial Interamericana. Tercera edición. México, D. F. 639 p.
- Oliveira A., Canuto E., Silva E., Reis V. y Baldani J. 2004. Survival of endophytic diazotrophic bacteria in soil under different moisture levels. *Brazilian Journal of Microbiology*. 35: 295-299
- Ortíz B.O., Ize L.I. y Gavilán G.A. 2003. La restauración de suelos contaminados con hidrocarburos en México. *Gaceta Ecológica* 69: 83-92
- Ortiz O.M. 2001. Bioensayos con *Cyperus elegans* para la determinación del potencial fitotóxico de suelos contaminados con hidrocarburos en el pantano de Santa Alejandrina, Veracruz. Tesis para obtener el título de Licenciado en Biología Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México. 112p.
- Ortiz-Villanueva B. y Ortiz-Solorio C.A. 1990. Edafología. Patronato Universitario. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de suelos. Séptima edición. México. 394 p.

- Palma-López D.J., Moreno C.E., Rincón-Ramírez J.A. y Shirma T.E.D. 2008. Degradación y conservación de los suelos del estado de Tabasco. Colegio de Postgraduados, CONACYT, CCYTET. Villahermosa, Tabasco, México. 74 p. + anexos.
- Pelczar M.J., Reid R.D. y Chan E.C.S. 1982. Microbiología. Segunda edición en español. Editorial McGraw-Hill. México, D.F. 826 p.
- Peña C.E., Carter D.E. y Ayala-Fierro F. 2001. Toxicología Ambiental. Evaluación de Riesgos y Restauración Ambiental. Distributed on the Internet via the Southwest Hazardous Waste Program website at <http://superfund.pharmacy.arizona.edu/toxamb/>
- Pereira S.I.A., Lima A.I.G. y Figueira E.M.A.P. 2006. Screening possible mechanisms mediating cadmium resistance in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* isolated from contaminated portuguese soils. *Microbial Ecology* 52:176-186
- Pérez E., Garrido P. y Laca M. 2008. Indicadores microbiológicos como marcadores de la contaminación y recuperación de suelos contaminados con queroseno. *Ecosistemas* 17: 133-138
- Pérez-Mateos M. y González-Carcedo S. 1988. Assay of urease activity in soil columns. *Soil Biol. Biochem.* 20: 567-572.
- Pérez V.J., García E.G. y Esparza G.F. 2002. Papel ecológico de la flora rizosférica en fitorremediación. *Avances y perspectivas* 21: 297-300
- Peters M., Franco L., Schmidt A. e Hincapié B. 2003. Especies forrajeras multipropósito: opciones para productores de América. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 113 p.
- Porta A., Filliat N. y Plata N. 1999. Phytotoxicity and phytoremediation studies in soils polluted by weathered oil. *In*: Lesson A. Alleman BC (Eds.) Phytoremediation and Innovative Strategies for Specialized Remedial Applications. Batelle. Columbus, Ohio. EEUU. 51-56 p.
- Porta J., López-Acevedo M. y Roquero C. 2003. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Tercera edición. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid, España. 960 p.

- Pothuluri V.J. y Cerniglia C.E. 1994. Microbial metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons. *In: Chaudry, R.G. (ed.). Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals.* Dioscorides Press Portland. Oregon, USA. pp: 92-123.
- Quintero L.R. 1998. Potencial agropecuario de Azolla en los trópicos. pp. 71-91. *In: R. Ferrera-Cerrato y J. Pérez-Moreno (eds.). Manejo de agroecosistemas sostenibles. Textos universitarios.* Universidad Veracruzana. Xalapa, Veracruz, México.
- Quintero L.R., Ferrera-Cerrato R., Etchevers B.J.D., García C.N.E., Rodríguez K.R., Alcántar G.G. y Aguilar S.A. 2003. Enzimas que participan en el proceso de vermicompostaje. *Revista Terra Latinoamericana* 21: 73-80.
- Quiñones A.E.E., Ferrera-Cerrato R., Gavi R.F., Fernández L.L., Rodríguez V.R. y Alarcón A. 2003. Emergencia y crecimiento de maíz en un suelo contaminado con petróleo crudo. *Agrociencia* 37: 585-594
- Rao N.S. 1999. Soil Microbiology (fourth edition of soil microorganisms and plant growth). Science Publishers, Inc. USA. 407 pp.
- Rennie R.J. 1981. A single medium for the isolation of acetylenereducing (dinitrogen-fixing) bacteria from soils. *Can. J. Microbiol.* 27: 8-14.
- Repetto M. 1997. Toxicología Fundamental. Tercera edición. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. 406 p.
- Reyes I., Valery A. y Valduz Z. 2006. Phosphate-solubilizing microorganisms isolated from rhizospheric and bulk soils of colonizer plants at an abandoned rock phosphate mine. *Plant and Soil* 287: 69-75
- Rhodes A.N. y Hendricks C.W. 1990. A Continuous-flow method for measuring effects of chemical on soil nitrification. *Toxicity Assess* 5:77-89
- Rich J., Heichen R., Bottomley P., Cromack J. y Myrold D. 2000. Community composition and functioning of denitrifying bacteria from adjacent meadow and forest soil. *Applied and Environmental Microbiology.* 69: 5974-5982.
- Rick P.S.P. 2000. La Ciencia de las Plantas. Thomson. Paraninfo. Madrid, España. 628 p.

- Rivera C.M. del C. 2001. Microorganismos rizosféricos de los pastos alemán [*Echinochloa polystachya* (H. B. K.) Hitchc] y cabezón (*Paspalum virgatum* L.) en la degradación del petróleo crudo y el venzo(a)pireno. Tesis Doctorado en Ciencias en Edafología. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México. 348 p.
- Rivera-Cruz M. del C. y Trujillo-Narcía A. 2004. Estudio de toxicidad vegetal en suelos con petróleos nuevo e intemperizado. *Interciencia* 29: 369-376
- Rivera-Cruz M. del C., Trujillo-Narcía A., Miranda de la C.M.A. y Maldonado C.E. 2005. Evaluación toxicológica de suelos contaminados con petróleos nuevo e intemperizado mediante ensayos con leguminosas. *Interciencia* 30: 326-331
- Rivera C.M. del C., Ramírez M.A.G. y Trujillo N.A. 2011. La planta de chipilín silvestre (*Crotalaria retusa* L): indicadora de toxicidad del petróleo intemperizado. XXIV Reunión Científica-Tecnológica Forestal y Agropecuaria Veracruz y III del Trópico Mexicano. 545-549 pp.
- Rodríguez C.E.A. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Applied and Environmental Microbiology* 44: 990-991
- Rodríguez B.C., Sevillano G.F. y Subramaniam P. 1984. La fijación de Nitrógeno atmosférico. Una biotecnología en la producción agraria. Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología. Temas de divulgación. 1ª edición. Salamanca, España. 65 p.
- Sastre C.I. y Lobo B.M. del C. 2003. Determinación de la actividad ureasa del suelo. En García I.C., Gil S.F., Hernández F.T. y Trasar C.C. (eds). Técnicas de análisis de parámetros bioquímicos en suelos: Medida de actividades enzimáticas y biomasa microbiana. Mundi-Prensa. Madrid, España. 125-147 p.
- Schwarzenbach R.P. y Westall J. 1981. Transport of nonpolar organic compounds from surface water to groundwater: Laboratory sorption studies. *Environ. Sci. Technol.* 15: 1350-1367
- SEMARNAP. 1996. Los suelos de Tabasco. Restauración, conservación y uso. Gobierno Constitucional del Estado de Tabasco, México.

- Silva L.J.C. 2007. Potencial de bacterias en suelo y rizosfera del limón persa para la formulación de biofertilizantes. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados. H. Cárdenas, Tabasco. 96 p.
- Sinsabaugh R.L., Carreiro M.M. y Alvarez S. 2002. Enzyme and microbial dynamics of litter decomposition. In: Burns R.G., Dick R.P. (eds) *Enzymes in the environment-activity, ecology, and applications*. Dekker, New York, pp 249-265.
- Soil Survey Staff. 2010. *Keys to Soil Taxonomy*. United States Department of Agriculture. Natural Resources Conservation Services. Eleventh edition. Washington, DC. 338 p.
- Steenhoudt O. y Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. *FEMS Microbiology Reviews* 24: 487-506.
- Subba Rao N.S. 1999. *Soil Microbiology (Fourth edition of Soil Microorganisms and Plant Growth)*. Science Publishers, Inc. USA. 407 p.
- Tabatabai M.A. y Bremner J.M. 1972. Assay of urease activity in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4: 479-487
- Valdés M. y Medina J.N. 2005. *Ecología microbiana del suelo. Compendio práctico*. Instituto Politécnico Nacional. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Departamento de Microbiología. México. 67 p.
- Vargas G.P.A., Cuéllar R.R. y Dussán J. 2004. Biorremediación de residuos del petróleo. *Hipótesis. Apuntes Científicos Uniandinos* 4: 44-49.
- Vázquez L.D. 2006. Fitotoxicidad en *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae) por suelo contaminado con petróleos nuevo e intemperizado. Tesis Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus* Tabasco. H. Cárdenas, Tab. 126 p.
- Vázquez-Luna D., Castelán-Estrada M., Rivera-Cruz M. del C., Ortiz-Ceballos A.I. e Izquierdo R.F. 2010. *Crotalaria incana* L. y *Leucaena leucocephala* Lam. (Leguminosae): especies indicadoras de toxicidad por hidrocarburos de petróleo en el suelo. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 26: 183-191.
- Velasco A.N. 2004. Efecto de pretratamientos fisicoquímicos en la biodegradación de hidrocarburos del petróleo en un suelo intemperizado, por composteo. Tesis de

- Especialista en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México, D. F. 43 p.
- Villamar F. y Tapia M. E. 2003. Determinación de la toxicidad en dispersantes de petróleo mediante bioensayos para calcular el CL₅₀. *Acta Oceanográfica del Pacífico* 12: 147-154
- Villarreal R. 1980. Tomatoes in the tropics. International Agriculture Development Service. Colorado, USA. 174 p.
- Wang X. y Bartha R. 1990. Effects of bioremediation on residues, activity and toxicity in soil contaminated by fuel spills. *Soil Biol Biochem* 22:501–505
- Wetzel A. y Werner D. 1995. Ecotoxicological evaluation of contaminated soil using the legume of nodule symbiosis as effect parameter. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10: 127-133
- White Jr. M.P., Wolf C.D., Thoma J.G. y Reynolds M.C. 2003. Influence of organic and inorganic soil amendments on plant growth in crude oil-contaminated soil. *Intern. J. Phytorem.* 5: 381-397.
- Zavala C.J. 2004. Índices de contaminación por petróleo y prácticas de recuperación de suelos con pastizales en el Activo Cinco Presidentes, Tabasco. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados *Campus* Montecillo. Montecillo, Texcoco. Edo. de México. 156 p.